

UNIVERSITE MONTPELLIER II
Sciences et Techniques du Languedoc

N° d'ordre

année 2004

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Physiologie, Biologie des Organismes et des Populations

Formation Doctorale : Biologie de l'Evolution et Ecologie

Ecole Doctorale : Biologie Intégrative

Présentée et soutenue publiquement

par

Frédéric ZAKHIA

le 15 janvier 2004

**DIVERSITE DES BACTERIES HÔTES DE LEGUMINEUSES
MEDITERRANEENNES EN TUNISIE ET AU LIBAN**

Directeur de thèse : M. Philippe de Lajudie

JURY

Pr Bruno Touraine	Professeur – Université Montpellier II	Président
Dr Anne Willems	Chercheuse – Université de Gand, Belgique	Rapporteur
Dr Philippe Normand	Directeur de Recherche – CNRS, Lyon	Rapporteur
Dr Bernard Dreyfus	Directeur de Recherche – IRD, Montpellier	Examineur
Dr Philippe de Lajudie	Chargé de Recherche – IRD, Montpellier	Examineur

Dr Josep Escarrié chargé de Recherche - CNRS Montpellier Examineur

Dédié à Jésus Christ

***« Seigneur, tu m'as confié cinq talents ; voilà, j'en ai gagné cinq autres » !
(Matthieu 25, 20)***

A la mémoire de Louis Thaler

REMERCIEMENTS

Je voudrais commencer par remercier M. Bruno Touraine, pour l'honneur qu'il me fait de présider mon jury de thèse.

Mes remerciements vont ensuite à Mme Anne Willems pour avoir accepté de lire mon manuscrit et pour les précieux conseils qu'elle m'a toujours donnés. Je remercie également M. Philippe Normand d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Une nouvelle page s'ouvrait dans ma vie quand M. Louis Thaler, ancien Président de l'Université Montpellier II m'a recommandé en concertation avec MM. Bernard Delay et Gérard Lefranc, pour venir étudier à Montpellier. C'était le 18 Juillet 1998. J'étais alors jeune diplômé de maîtrise de l'Université Libanaise (Campus de Fanar, Beyrouth). Je leur exprime ma profonde gratitude.

A Montpellier, après un séjour de quelques mois au laboratoire de Botanique de la faculté de pharmacie, sous la direction du M. Claude Andary (le nom est libanais !) et de Mme Laurence Mondolot, ma destinée m'a conduit dans un laboratoire de Microbiologie, le L.S.T.M. (Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes) dont le responsable est M. Bernard Dreyfus. Je profite pour le remercier de son attention, de son caractère humain bien compréhensif face aux attentes des étudiants.

Pendant trois ans, j'ai eu la chance d'effectuer ma thèse sous la direction de M. Philippe de Lajudie, mon directeur de thèse, ou bien mon père scientifique (comme cela se dit en allemand « Doktorarbeit Vater »). Ecole en taxonomie non pas sans renom, il m'a appris la patience et la rigueur scientifique. Je le remercie beaucoup pour la confiance qu'il m'a accordée. De toi Philippe, j'ai été enrichi non seulement au niveau scientifique, mais aussi au niveau culturel général. Comment pourrais-je oublier la main qui m'a fait voler et mon oreille oublierait-il la voix qui l'a enseigné ?

Le mot LSTM signifie pour moi aujourd'hui beaucoup de choses. Je remercie l'IRD pour la bourse de thèse qu'il m'a accordée. Je remercie Nathalie Pujet, secrétaire (première classe !), pour les innombrables services qu'elle m'a rendus (merci aussi pour les conseils personnels...). Je remercie Odile Domergue de m'avoir initié aux techniques de la biologie moléculaire, Lucette Mauré pour son dévouement, Eric Giraud, Gilles Bena, Pierre Beunard, Brigitte Brunel, Yves Prin, Antoine Galiana, Alba Zaremski, Sophie Nourrissier, Fabienne Cartieux, Joël Fardoux, Laure Hannibale et Philippe Jourand de qui j'ai appris beaucoup de choses. Merci à Marc Ducouso et Jean-Claude Cleyet-Marel qui m'ont encadré pendant les stages de maîtrise et D.E.A. et qui ont continué à m'encourager pendant ma thèse.

Je remercie Renata Copman de m'avoir appris des méthodes pour l'extraction de l'ADN, merci à Moniek Gillis, Sylvie Rapior et Kristina Lindström.

Je tiens aussi à remercier Christine Leroux, pour son grand cœur et son amitié envers moi (*«J'étais un étranger et vous m'avez accueilli [...] Chaque fois que vous l'avez fait à l'un de ces petits qui sont mes frères, c'est à moi que vous l'avez fait»* (Matthieu, 25, 34).

Je remercie les écologues Gustave Gintzberger et Edourd le Floc'h d'avoir identifié les plantes étudiées dans cette thèse et aussi de m'avoir fourni beaucoup de documents utiles sur la Tunisie et le Liban.

Mes remerciements vont également à l'équipe de la Faculté d'Agronomie de l'Université Libanaise, pour le dynamisme et la disponibilité de ses membres : Dr Thérèse Atallah, Dr Samih El Hajj, Dr Hélène Rizk et Carole El Hachem.

Je voudrais remercier les étudiants ou anciens étudiants avec qui j'ai partagé des moments d'amitié inoubliables : Clémence Chaintreuil, Laye Sy, Marièle Larcher, Lionel Moulin, Antonio et Carmen Munive, Taiana Rivière, Sophie Mantelin, Cyril Bontemps, Xavier Bailly, Félix Müller, Marianne Jaubert, Céline Contesto, Nicolas Fourier, Jean Weber et Jean-Christophe Avarre.

Une pensée toute particulière à mes collaborateurs : Cathy Vadala (qui lisait dans mes pensées), Emmanuel Protière et Magali Roussel.

Je remercie aussi mes collègues Virginie Chareyron et Pascal Salar, Diégane Diouf, Abdallah Diédou, Moussa Diabate, Rado Rassolomapiana et Philippe Bague.

Ensuite je souhaite exprimer ma gratitude envers mes amis libanais, Johnny Wehbé (L'amitié reste dans le cœur, malgré les distances géographiques), Georges el Hajj Moussa (très accueillant), Chafic Merhi, Georges el Ahmar, Pierre abi Nakhoul, Aziz el Hajj, Ara Parlakian, Elias Assaf, Joseph Salameh, Julien Lteif, Ragheb el Jamal. Hala et Charbel Zgheib, Carla Khater, Nabil Nassif et Hicham Dib.

Nombreux sont ceux qui m'ont soutenu ou aidé, comme Nadine et Jean-François (merci pour tout), Dacian Miloss, Fabrice Garcia et les frères Dominicains de Montpellier.

Enfin, je ne peux terminer sans m'envoler vers cette maison familiale d'Amchit (Liban), où je suis né. Je salue mes parents Guy et Eléonore, mes frères et sœurs, tantes Christine, Nazha et oncle Michel. J'évoque le souvenir de mes tantes Abla, Olga et de mon oncle Frédéric. Il m'ont tous appris, dès mon petit âge, le sens du sacrifice et l'amour du travail. Celui qui sème dans la fatigue, récoltera dans la joie...

Fait à Montpellier, le 24 novembre 2003

Frédéric Zakhis

TABLE DES MATIERES

Introduction générale	2
Chapitre I : Synthèse Bibliographique	
1^{ère} Partie : Présentation de la symbiose BNL-Légumineuse, techniques de la taxonomie moderne et aperçu sur les différents genres de BNL	6
I) La fixation biologique de l'azote : Généralités	6
II) La symbiose BNL – légumineuse	7
II.1) Généralités	7
II.2) Partenaire bactérien : Les BNL	9
II.3) Partenaire végétal : les légumineuses	9
II.4) Mécanisme d'établissement de la symbiose	10
II.5) Spécificité de la symbiose BNL-Légumineuse	11
III) La taxonomie bactérienne	11
III.1) Les méthodes génotypiques	15
III.1.1) Détermination du pourcentage Guanine + Cytosine (% G + C)	15
III.1.2) L'hybridation ADN / ADN	15
III.1.3) Le séquençage de l'ADNr 16S et d'autres gènes	16
III.1.4) Les méthodes de typage basées sur la PCR	18
III.1.4.1) Polymorphisme de fragments de restriction (PCR-RFLP)	18
III.1.4.2) AFLP	18
III.1.4.3) RAPD ou AP-PCR	19
III.1.4.4) REP-PCR	20
III.1.5) LMW RNA staircase electrophoresis	20
III.1.6) PFGE	21
III.2) Les méthodes phénotypiques	21
III.2.1) L'analyse phénotypique classique	21
III.2.2) Les systèmes commerciaux	21
III.2.3) La composition des parois cellulaires	22
III.2.4) FAME ou Les acides gras cellulaires	22
III.1.2.5) SDS-PAGE des protéines cellulaires totales	22
III.2.6) MLEE	23
III.3) Conclusion	23
IV) Revue des 11 genres de Bactéries Nodulant les Légumineuses (BNL)	23
Article N°1 Taxonomy of Rhizobia	25
IV.1) Actualisation de l'article « Taxonomy of Rhizobia »	33
IV.1.1) Le genre <i>Sinorhizobium</i>	33
IV.1.2) Le genre <i>Methylobacterium</i>	33
IV.1.3) Le genre <i>Blastobacter</i>	33
IV.1.4) Le genre <i>Burkholderia</i>	34
IV.1.5) Le genre <i>Ralstonia</i>	34

IV.1.6) Le genre <i>Devosia</i>	35
IV.2) Conclusion	35

2^{ème} Partie : Le milieu méditerranéen, caractéristiques écologiques et aperçu sur les légumineuses

locales	38
I) Conditions climatiques des pays méditerranéens	38
II) Définition de l'aridité	38
Zone aride en Tunisie	38
III) Place des légumineuses dans la flore de Tunisie	40
IV) Caractéristiques du climat du Liban et bref aperçu sur la végétation	40
V) Rôle des légumineuses spontanées en Méditerranée	41

Chapitre II : Matériels et Méthodes

I) Espèces végétales	43
II) Souches bactériennes	43
III) Milieux de culture	43
III.1) Milieux de culture des bactéries	43
a) Milieu YMA	43
b) Milieu TY tamponné	43
b) Milieu E'	43
III.2) Milieux de culture des plantes	45
a) Milieu Campbell	45
b) Milieu Jensen	45
c) Milieu de culture pour légumineuses méditerranéennes	45
IV) Isolement de bactéries à partir de nodules	46
IV.1) Isolement des bactéries	46
IV.2) Vérification de la pureté des souches	46
IV.2.1) Vérification de la pureté des souches par repiquage et microscopie	46
IV.2.2) Vérification de la pureté des souches par Coloration Gram	46
V) Tests de nodulation	47
V.1) Stérilisation et germination des graines	47
V.2) Culture des plantes	47
V.2.1) Culture en tubes Gibson	47
V.2.2) Culture en pots	47
V.3) Inoculation des plantes	47
VI) Analyse des protéines cellulaires totales par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS	49
VI.1) Principe	49
VI.2) Protocole	49
VI.2.1) Culture des bactéries	49
VI.2.2) Récolte des bactéries	49

VI.2.3) Electrophorèse des extraits protéiques	49
VI.2.3.1) Préparation d'un gel résolutif à 12 %	50
VI.2.3.2) Préparation d'un gel de concentration à 5 %	51
VI.2.3.3) Application des échantillons et électrophorèse	51
VI.2.3.4) Fixation, coloration et décoloration	51
VI.2.4) Analyse des profils protéiques	52
VI.3) solutions	52
VII) Extraction de l'ADN génomique	54
VII.1) Méthode utilisant l'éclatement des cellules	55
VII.2) Méthode utilisant la protéinase K	55
VII.3) Méthode de Sambrook	55
VII.4) Méthode de Pitcher	56
VII.4.1) Protocole	57
VII.4.2) Solutions	58
VIII) Amplification de l'ADN par PCR	60
VIII.1) PCR de l'ADNr 16S	60
VIII.2) PCR de l'ADNr 16S-IGS	61
VIII.3) PCR de l'intergène IGS séparant l'ADNr 16S du 23S	62
VIII.4) Recherche de gènes de nodulation par PCR	62
VIII.5) Recherche des régions symbiotiques <i>nod box</i> chez <i>Rhizobium galegae</i>	62
VIII.6) Recherche de gènes de fixation d'azote <i>nifH</i> par nested PCR	63
IX) La technique ARDRA	65
IX.1) Hydrolyse des produits d'amplification de l'ADNr 16S et de la région ADNr 16S – IGS	65
IX.2) Electrophorèse des fragments de restriction de l'ADNr16S et 16S-IGS	66
IX.3) Analyse des données de PCR-RFLP par GelCompar	66
IX.4) Séquençage de l'ADN	66
IX.4.1) Séquençage de l'ADNr 16S	66
IX.4.2) Séquençage des gènes <i>NodA</i> et <i>NifH</i>	67
IX.4.3) Identification des séquences corrigées	67

**Chapitre III : caractérisation de bactéries associées aux nodules de légumineuses
spontanées de la Tunisie pré-saharienne**

Introduction	69
Article N°2 Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia	71-95
Article N°3 Unusual bacteria associated to root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and First report for <i>nifH</i> gene-like within the genera <i>Microbacterium</i> and <i>Starkeya</i>	96-121

Résultats complémentaires au Chapitre III

Tests de nodulation	122
Introduction	123

Résultats	123
Discussion	124
Conclusion	127

Recherche de régions symbiotiques *nodbox* chez *Rhizobium galegae* 129

Introduction 130

Résultats et discussion 130

**Chapitre IV :Caractérisation de bactéries associées aux nodules de légumineuses
spontanées du Liban**

Introduction 134

Article N°4 Preliminary characterisation of root nodule isolates from wild legumes in Lebanon by

16S-IGS ARDRA and 16S rDNA sequencing 136-
156

Discussion générale et perspectives 158

Références 162

Liste des tableaux

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Tableau 1a	Critères de définition de nouveaux taxons de BNL	p. 24
Tableau 1b	Pourcentages de G+C chez des genres connus comme BNL	p. 24
Tableau 2	Bactéries fixatrices d'azote symbiotiques des légumineuses	p. 36

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Tableau 1	Plantes étudiées dans cette thèse. Origine géographique et biologie	p. 44
Tableau 2	Conditions pour la stérilisation et la germination des graines étudiées	p. 48
Tableau 3	Amorces utilisées dans cette thèse	p. 64
Tableau 4	Enzymes utilisées et sites de restriction correspondants	p. 65

Chapitre III : Caractérisation de bactéries associées aux nodules de légumineuses spontanées de la Tunisie pré-saharienne

Article N°2 : Characterisation of wild Legume Nodulating Bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia

Tableau 1	New isolates and results of ARDRA and SDS-PAGE protein profile analysis	p. 82
Tableau 2	Reference strains used in this study	p. 85
Tableau 3	Primers used for DNA amplification and sequencing	p. 88
Tableau 4	Recapitulative results of root nodule symbionts from arid wild legumes In Tunisia	p. 89

Article N°3 : Unusual bacteria associated to root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH gene-like within the genera Microbacterium and Starkeya

Tableau 1	New isolates and main results	p.111
Tableau 2	Reference strains used in this study	p.113
Tableau 3	Primers used for DNA amplification and sequencing	p.116
Tableau 4	Results for <i>nifH</i> gene sequencing	p.116

Résultats complémentaires au Chapitre III

Tests de nodulation

Tableau 1	Tests de nodulation négatifs	p.123
Tableau 2	Résultats des tests de nodulation positifs	p.124

Recherche de régions nodbox chez *Rhizobium galegae*

Tableau 1	Présence ou absence d'amplification par PCR du nodbox sur les 2 biovars de <i>R. galegae</i> (bv. orientalis et officinalis)	p.130
-----------	--	-------

Chapitre IV : Caractérisation de bactéries associées aux nodules de légumineuses spontanées du Liban

Article N°4 : Preliminary characterisation of root nodule isolates from wild legumes in Lebanon by 16S-IGS ARDRA and 16S rDNA sequencing

Tableau 1	New isolates and main results	p.146
Tableau 2	Reference strains used in this study and their corresponding IGS size	p.150
Tableau 3	Primers used in this study	p.153
Tableau 4	Recapitulative results of root nodules symbionts from diverse sites in Lebanon	p.154

Liste des figures

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

- Figure 1. Arbres phylogénétiques des êtres vivants (A) et des eubactéries (B) p. 8
- Figure 2. Cordon d'infection dans un poil absorbant de *Medicago laciniata* p. 12
- Figure 3. Nodules racinaires de *Medicago laciniata* p. 12
- Figure 4. Pouvoirs discriminants des différentes techniques de la taxonomie polyphasique p. 14
- Figure 5. Moyennes mensuelles minimales de températures et de précipitations (1984-1985) dans des sites variés du Bassin Méditerranéen p. 39

Chapitre II : Matériels et Méthodes

- Figure 1. Représentation schématique de la région de l'ADNr 16S et 23S avec l'emplacement des amorces utilisées p. 60
- Figure 2. Programme de *nested PCR* pour l'amplification des gènes *nifH* p. 63

Chapitre III : Caractérisation de bactéries associées aux nodules de légumineuses spontanées de la Tunisie pré-saharienne

Article N°2 : Characterisation of wild Legume Nodulating Bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia

- Figure 1. Bioclimatic map of Tunisia p. 91
- Figure 2. Dendrogram of normalised 16S ARDRA profiles of tunisian isolates and reference strains p. 92
- Figure 3. Dendrogram of SDS-PAGE analysis of tunisian isolates and reference strains p. 94
- Figure 4. 16S rDNA sequence-based dendrogram of isolates from Tunisia p. 95

Article N°3 : Unusual bacteria associated to root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for *nifH* gene-like within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*

Figure 1	Dendrogram of normalised 16S ARDRA profiles of tunisian isolates and reference strains	p.117
Figure 2	Dendrogram of SDS-PAGE analysis of tunisian isolates and reference strains	p.119
Figure 3	16S rDNA sequence-based dendrogram of isolates from Tunisia	p.120
Figure 4	Phylogenetic tree based on nearly full length <i>nifH</i> sequences of some new isolates from Tunisia	p.121

Résultats complémentaires au Chapitre III

Tests de nodulation

Figure 1	Tests de nodulation en Tubes	p.128
Figure 2	Tests de nodulation en pots	p.128
Figure 3	Tests de nodulation en sachets	p.128

Recherche de régions *nodbox* chez *Rhizobium galegae*

Figures 1A, 1B et 1C	Essais d'amplification des régions <i>nodbox</i> chez <i>R. galegae</i>	p.132
----------------------	---	-------

Chapitre IV : Caractérisation de bactéries associées aux nodules de légumineuses spontanées du Liban

Article N°4 : Preliminary characterisation of root nodule isolates from wild legumes in Lebanon by 16S-IGS ARDRA and 16S rDNA sequencing

Figure 1.	Map of Lebanon	p.155
Figure 2	Dendrogram of normalised 16S-IGS ARDRA profiles of isolates from Lebanon	p.156

Liste des abréviations

% G+C	Pourcentage molaire en guanine plus cytosine
ADN et ADNr	Acide déoxyribonucléique et ADN ribosomique
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AP-PCR	Arbitrarily Primed PCR
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
ARN et ARNr	Acide ribonucléique et ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
CEDRE	Coopération pour l'Evaluation et le Développement de la Recherche (programme franco-libanais)
FAME	Fatty Acid Methyl Ester
LMW RNA	Low Molecular Weight RNA
MLEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
REP-PCR	Repetitive Extragenic Palindromic PCR
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
Rnase	Ribonucléase
SDS-PAGE	Electrophorèse sur Gel de polyacrylamide en présence de Sodium Dodécyl Sulfate

W / m² Watts par mètre carré

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Dans les pays du pourtour du bassin méditerranéen, les légumineuses occupent une place importante tant au niveau économique qu'au niveau écologique. Elles constituent une source d'alimentation pour l'homme (légumineuses à graines, pois chiche, haricot, lentille...) et fourrage pour les animaux (luzernes, trèfles, sulla...). Les plantes de cette famille sont capables d'établir des symbioses fixatrices d'azote atmosphérique avec des bactéries du sol appelées BNL ou « Bactéries Nodulant les Légumineuses » (Moulin, 2002). Ces bactéries induisent sur la racine de la plante hôte la formation d'un organe spécialisé appelé nodule. Chez certaines légumineuses tropicales des genres *Sesbania*, *Aeschynomene*, *Neptunia* ou *Discolobium*, la nodulation concerne les tiges (Boivin *et al.*, 1997). À l'intérieur des nodules, la bactérie subit des transformations et fixe l'azote moléculaire de l'atmosphère en le convertissant en ammonium, directement assimilable par la plante. C'est la fixation biologique de l'azote, opérée par le système Légumineuse – BNL. Cette symbiose permet aux légumineuses de coloniser des milieux dégradés ou pauvres et d'enrichir le sol en matière organique, facilitant ainsi l'implantation d'autres espèces végétales et la réhabilitation de l'écosystème dégradé. D'autre part, cette fixation d'azote est importante sur le plan agroéconomique, car elle conduit à un enrichissement du sol en azote, jouant ainsi le rôle d'engrais naturel.

Les BNL connues à ce jour, sont des bactéries gram négatives, appartenant à la sous-classe α (Young et Haukka, 1996 ; Sy *et al.*, 2001) ou β des protéobactéries (Moulin *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2001).

Le climat méditerranéen qui règne sur les pays du bassin méditerranéen et sur une partie de l'Australie, est caractérisé par une sécheresse estivale due à un été sec et long et un hiver froid et humide (Quatrini *et al.*, 2002). Il peut présenter des variantes arides (par exemple la Tunisie pré-saharienne) ou semi-aride (la vallée de la Békaa au Liban) (Emberger, 1938). Certains écosystèmes méditerranéen présentent des problèmes particuliers comme par exemple des sols affectés par la salinité ou pauvres en matière organique, dégradation du couvert végétal et érosion des sols suite à la pression zooanthropique (surpâturage, abattement d'arbres pour bois de chauffe, percements de voies de communication, exploitation de carrières...). D'autre part il existe un déficit en fourrage dans de nombreux pays de la région.

Les légumineuses constituent une des plus grandes familles de plantes, adaptés à de nombreuses situations pédoclimatiques (aridité, salinité...) et leur association symbiotique avec les BNL est un élément important à prendre en compte pour introduire l'azote combiné dans les sols pauvres (Franco et de Faria, 1997). Des programmes d'habilitation de carrières sont actuellement mis en place. Ces interventions impliquent l'introduction dans les milieux pauvres de l'association BNL-légumineuses en synergie avec d'autres plantes comme les

graminées. L'identification de la bactérie symbiotique constitue un préalable à toute application.

Notre zone d'étude concerne le milieu méditerranéen. Jusqu'à présent, les études dans ce milieu ont été principalement focalisées sur les légumineuses cultivées et leur symbiotes. On connaît mal les BNL associées aux légumineuses spontanées.

Au cours de cette thèse, nous avons caractérisé des BNL associées aux légumineuses spontanées poussant dans différents sites de deux pays méditerranéens : la Tunisie et le Liban. Dans le premier pays, les investigations ont concerné la région de l'étage aride inférieur, caractérisée par des précipitations annuelles inférieures à 180 mm. Au Liban, les investigations ont porté sur des carrières, une zone semi-aride (la Békaa) et des sites plus humides (département de Jbeil). Du point de vue fondamental, il est important d'explorer et de caractériser taxonomiquement les symbiotes de nouvelles légumineuses non étudiées encore. Cette nouvelle exploration peut conduire à l'identification de nouvelles associations BNL – Légumineuses, plus performantes que d'autres en termes que fixation d'azote ou d'enrichissement de sols en matières organiques. Ces symbiotes non caractérisés jusqu'à ce jour peuvent comporter de nouvelles espèces ou genres de BNL, comportant peut-être des fonctions nouvelles.

Pour atteindre notre objectif, nous avons constitué une collection d'environ 150 isolats bactériens à partir de nodules racinaires de 24 espèces végétales de Tunisie et de 21 espèces végétales du Liban. Ces isolats ont été caractérisés par une approche polyphasique combinant une technique phénotypique (SDS-PAGE des protéines totales) et des techniques génotypiques (PCR-RFLP de l'ADNr 16S, de la région ADNr 16S-IGS, séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, de l'intergène IGS correspondant à la région de l'ADN entre les gènes ribosomiques 16S et 23S).

Les résultats montrent que ces isolats appartiennent à des genres déjà connus de BNL comme *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* trouvés ainsi dans des sites diversifiés du milieu méditerranéen. D'autres bactéries, associées aux nodules, ont été identifiées comme appartenant à d'autres genres, comme *Inquilinus*, *Bosea*, *Rhodopseudomonas*, *Paracraurococcus*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Starkeya*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Agromyces*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Paenibacillus* et *Ornithinicoccus*. Ces bactéries non connues jusqu'à présent comme capables de noduler les légumineuses peuvent être présentes dans les tissus nodulaires comme endophytes.

Pour ces dernières, nous avons procédé à la recherche de gènes de nodulation (*nodA*) ou de fixation d'azote (*nifH*). Des tests de nodulation sur *Macroptilium atropurpureum*, légumineuse à large spectre d'hôte ont été entrepris. Des séquences de *nifH* analogues à la séquence *nifH* de *Sinorhizobium* ont été mises en évidence pour la première fois chez les genres *Microbacterium*, *Agromyces*-like, *Starkeya* et *Phyllobacterium*-like.

Présentation des différentes parties de cette thèse

Cette thèse est divisée en 4 chapitres :

Dans le **premier chapitre** nous présentons une synthèse bibliographique sur la symbiose BNL – légumineuse, les différents genres et espèces de BNL actuellement décrits ainsi que les méthodes de caractérisation employées dans la taxonomie moderne. Ce chapitre inclue aussi un article bibliographique donnant un aperçu sur les différents genres et espèces de BNL connus jusqu'à la date de sa publication (2001)

Le **chapitre Matériels et méthodes** contient la liste des 47 espèces végétales étudiées et détaille les techniques que nous avons employées. Les isolats de Tunisie ont été caractérisés par SDS – PAGE des protéines totales et PCR – RFLP de l'ADNr 16S. Le séquençage partiel ou complet de l'ADNr 16S a été utilisé. D'autres isolats (Liban) ont été caractérisés par PCR – RFLP de la région ADNr 16S – IGS.

Le **troisième chapitre** intitulé « Caractérisation de bactéries associées aux nodules de légumineuses spontanées de la Tunisie pré-saharienne » concerne l'étude de la diversité de bactéries associées aux nodules de légumineuses d'un milieu méditerranéen aride. Dans ce chapitre, *Rhizobium galegae* est identifiée comme symbiote de quelques légumineuses méditerranéennes. Cette espèce a été décrite jusqu'à présent comme symbiote de légumineuses du Caucase. Ce chapitre s'organise autour de deux articles.

Le **quatrième chapitre** intitulé « Caractérisation de bactéries associées aux nodules de légumineuses spontanées du Liban » comporte une étude par PCR-RFLP de la région ADNr 16S-IGS. C'est la toute première étude concernant la caractérisation de BNL isolées de légumineuses spontanées effectuée au Liban. Cette étude a été réalisée majoritairement dans le cadre d'un projet « CEDRE » franco – Libanais au cours duquel un recensement de légumineuses poussant sur divers sites du Liban a été effectué. La caractérisation des bactéries symbiotiques de ces légumineuses a commencé avec cette thèse, et elle est en cours dans le cadre d'une collaboration entre le LSTM et la Faculté d'Agronomie de l'Université Libanaise.

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce chapitre comprend une synthèse bibliographique sur la symbiose BNL-Légumineuse et une revue de la taxonomie des BNL sous forme d'article .

Article N°1 : Zakhia, F. and de Lajudie, P, 2001. Taxonomy of rhizobia. *Agronomie*, **21** : 569 - 576

1^{ère} Partie :

Présentation de la symbiose BNL-Légumineuse, techniques de la taxonomie moderne et aperçu sur les différents genres de BNL

I) La fixation biologique de l'azote : Généralités

L'azote est un des éléments majeurs de la matière vivante, végétale et animale. Les plantes, en particulier, puisent dans le sol l'azote combiné nécessaire à leur croissance alors que leurs feuilles sont directement en contact avec l'air qui contient en volume 79% d'azote moléculaire (N_2). Ce dernier constitue la principale réserve naturelle d'azote pour la biosphère mais il n'est pas assimilable par la plupart des êtres vivants. Les formes de l'azote combiné, représentent l'infime pourcentage de 0,001 % de l'azote total de la biosphère (Newton, 1998). La fixation d'azote s'opère via un processus naturel biologique (certains microorganismes) ou non biologique (éclaircs, combustions et volcanisme) et via un procédé artificiel de synthèse (production d'engrais chimiques).

La fixation biologique de l'azote est responsable de 65 % de la fixation annuelle au niveau de la planète, alors que la production industrielle d'ammoniaque n'en est responsable que de 25 % (Newton, 1998). Cette fixation biologique de l'azote s'opère par certains micro-organismes qui possèdent un complexe enzymatique appelé nitrogénase, qui catalyse la réduction de l'azote atmosphérique N_2 en ammoniaque NH_3 . Phylogénétiquement ces micro-organismes fixateurs d'azote appartiennent à deux des trois règnes primaires, les archaebactéries et les eubactéries. Ils sont très diversifiés de part leur écologie, leur métabolisme (aérobies, anaérobies, chimioautotrophes, chimiohétérotrophes, photoautotrophes, photohétérotrophes) et leur type d'association avec certains organismes supérieurs, principalement des végétaux. Ainsi, les gènes impliqués dans la fixation d'azote et la symbiose sont présents dans des génomes très différents les uns des autres. On recense plus de 200 espèces bactériennes fixatrices d'azote parmi les 8 grands groupes phylogénétiques suivants : Bactéries vertes sulfureuses, Firmibactéries, Thallobactéries, Héliobactéries, Cyanobactéries, Campylobacter, Protéobactéries et Archaebactéries (Young, 1992). Certaines sont des fixateurs libres, tels que *Azospirillum*, bactérie colonisatrice des racines de nombreuses graminées, *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis *et al.*, 1989), endophyte de la canne à sucre, *Burkholderia vietnamiensis*, associé aux racines de riz (Gillis *et al.*, 1995), *Azoarcus*, associé au Kallar grass (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993), *Azotobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, des cyanobactéries (*Anabaena*, *Nostoc*) et des bactéries aquatiques photosynthétiques (*Rhodobacter*, *Rhodospirillum*). D'autres s'associent avec les plantes et forment des organes différenciés, les nodules, sur leurs racines : c'est le cas de certaines bactéries Gram négatif, collectivement appelées "rhizobium" (Dans cette thèse nous reprenons le terme BNL proposé par Moulin, (2002) pour Bactéries Nodulant les Légumineuses, afin d'éviter la confusion avec le genre *Rhizobium*), avec des plantes de la famille des légumineuses et d'Actynomycètes du genre *Frankia* (bactéries Gram positif) qui nodulent des plantes

ligneuses appartenant à différentes familles de dicotylédones dont les genres *Alnus*, *Eleagnus*, *Casuarina* ou *Myrica* (Benson et Silvester, 1993, pour revue). En dehors de la famille des Légumineuses, plusieurs espèces de *Parasponia*, de la famille des *Ulmaceae*, peuvent également développer des nodules fixateurs d'azote avec certaines bactéries (Young et Johnston, 1989).

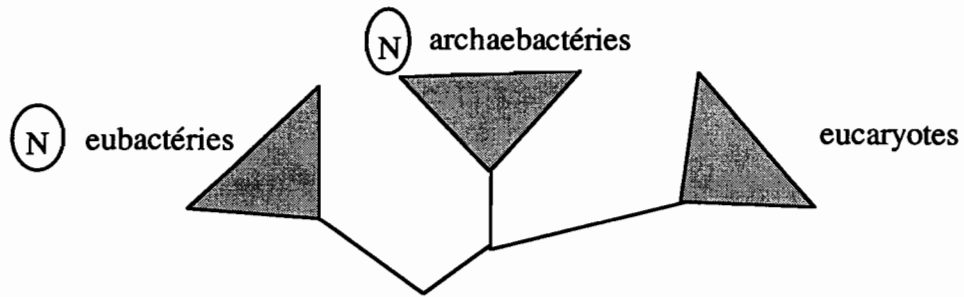
L'estimation du taux de fixation d'azote par les bactéries libres du sol est de l'ordre de moins de 1 kg par hectare (Elmerich, 1993). Les symbioses fixatrices d'azote (BNL-légumineuses, *Frankia*-plantes actinorhiziennes, cyanobactéries-fougères) sont beaucoup plus efficaces. Par exemple, la quantité d'azote fixée par une culture de *Medicago littoralis* en Australie Méridionale à climat méditerranéen peut atteindre 102 Kg d'azote ha⁻¹ an⁻¹ (Butler, 1988).

Des classifications des microorganismes fixateurs d'azote ont été proposées à partir de l'analyse comparative de leurs ARN ribosomiques puis des gènes codant pour eux (ADNr 16S) (Young, 1992 ; 2000). La figure 1 présente la dispersion de la fonction biologique de fixation d'azote chez les prokaryotes (fig.1A) et chez les eubactéries (fig.1B). Dans les classifications actuelles des prokaryotes, les micro-organismes fixateurs d'azote occupent des positions phylogénétiques proches de micro-organismes non fixateurs, tel *Acetobacter diazotrophicus* qui se place parmi des espèces non fixatrices du même genre (Caballero-Mellado *et al.*, 1999), ou *Paenibacillus* qui est proche des Firmicutes aérobies formant des endospores (Achouak *et al.*, 1999). Parmi le règne des archaebactéries, la fixation d'azote est commune au groupe des méthanogènes et des halophiles ; cependant aucun fixateur d'azote n'a été décrit parmi les archaebactéries croissant obligatoirement sur milieu soufré. Le groupe des bactéries symbiotiques des légumineuses (BNL) est étroitement lié à des bactéries non symbiotiques et non fixatrices d'azote (Segovia *et al.*, 1991; Young, 1992). De tels liens phylogénétiques suggèrent que la fixation d'azote est une propriété facilement acquise par les microorganismes (Martinez-Romero *et al.*, 1999).

II) La symbiose BNL - légumineuse

II.1) Généralités

La symbiose BNL – légumineuse, décrite pour la première fois par Frank (1889), présente un modèle d'étude d'association entre eucaryote et procaryote. elle présente un intérêt agronomique considérable. En effet, l'azote minéral du sol, principale ressource azotée des plantes est, dans le cas des plantes cultivées, fourni principalement par des engrais chimiques qui posent des problèmes de pollution, en particulier des nappes phréatiques par le lessivage des nitrates. La symbiose permet l'enrichissement naturel du sol en azote et la réduction des apports d'engrais. L'azote fixé par la symbiose est restitué au sol après la décomposition de la matière végétale (racines, nodules, parties aériennes), ou via les déjections des animaux ayant pâture (Ndiaye, 1996). Les légumineuses sont traditionnellement utilisées comme fourrage



A

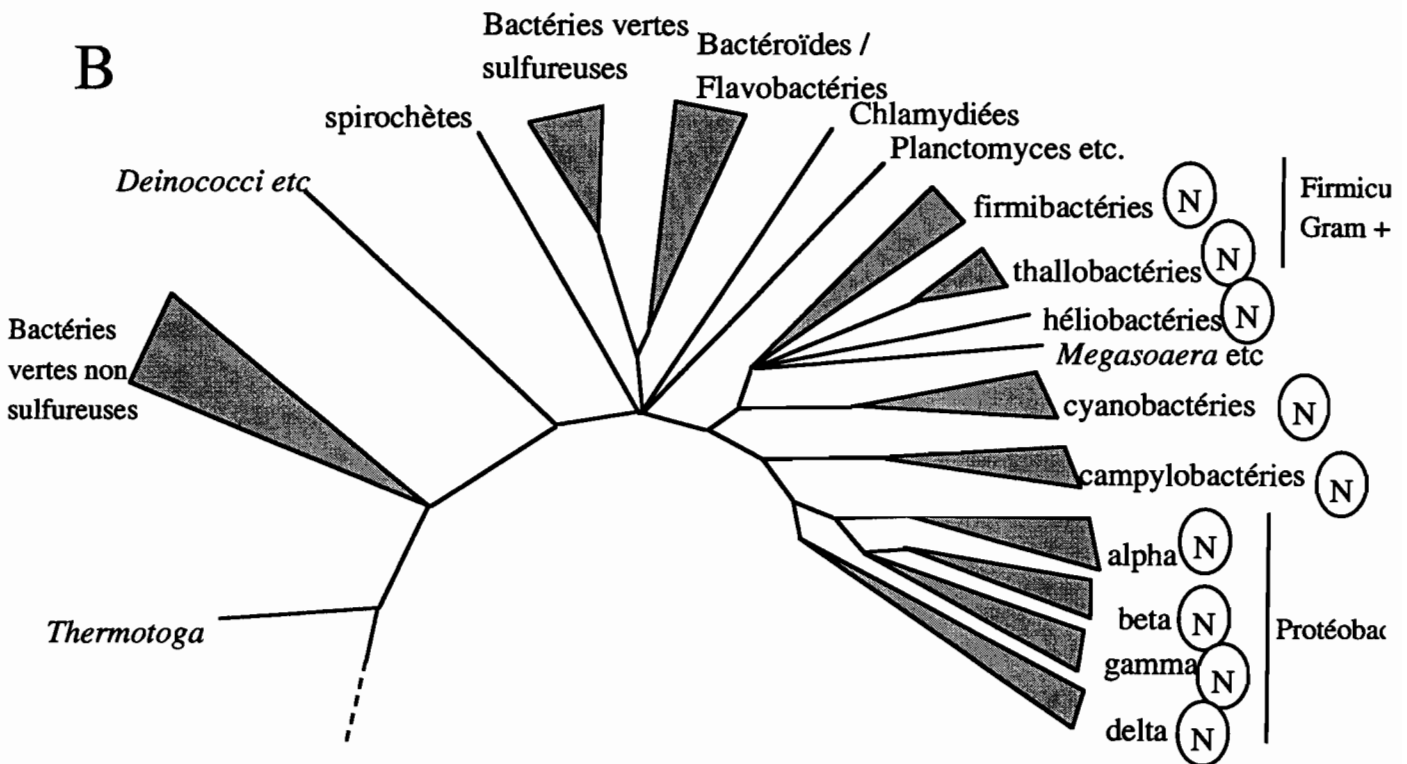


Figure 1 (d'après Young, 1992)

(A) : Arbre phylogénétique universel basé sur les séquences d'ADNr 16S et 18S. (N = fixateurs d'azote).
 (B) : Grands groupes phylogénétiques des eubactéries (séquences d'ADNr 16S). (N = fixateurs d'azote).

(Zoghلامي *et al.*, 1996), plantes de couverture, dans la rotation des cultures, dans les systèmes de cultures associées, en agroforesterie (Peoples *et al.*, 1995) et comme engrais vert (Peoples et Craswell, 1992). Par ailleurs, les légumineuses sont utilisées pour la réhabilitation de milieux perturbés dans certains pays du bassin méditerranéen (Requena *et al.*, 2001) ou bien la végétalisation de sites miniers après exploitation à ciel ouvert (Jaffré *et al.*, 1995 ; Franco et de Faria, 1997 ; Dommergues *et al.*, 1998, pour revue).

Nous présentons ici les deux partenaires de la symbiose : le partenaire bactérien et le partenaire végétal, ainsi que le mécanisme d'établissement de cette symbiose.

II.2) Partenaire bactérien : Les BNL

Le terme de Rhizobium a été utilisé en premier pour désigner ces bactéries formant des nodules sur les légumineuses. Du grec, « Rhizo » = racine et « bium » = vivant. Dénommé ainsi par Franck car ce microorganisme vit dans les racines. Les bactéries fixatrices d'azote associées aux légumineuses ou BNL sont des bactéries aérobies, Gram négatives, mobiles, sans spores dont la vitesse de croissance sur le milieu YMA (Vincent, 1970) est variable. Ainsi, Jordan (1984) attribue le nom de *Bradyrhizobium* aux souches qui sont à croissance lente. Du point de vue phylogénétique, elles font partie de la sous-classe alpha (Stackebrandt *et al.*, 1988) ou Bêta des protéobactéries (Moulin *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2001). Les BNL se mêlent avec les genres *Agrobacterium* et *Phyllobacterium* qui sont tous impliqués dans des interactions spécifiques avec des plantes (Jordan, 1984). Certaines souches de *Phyllobacterium* ont un effet améliorateur de la croissance de certaines plantes (PGP pour Plant Growth Promoting) (Larcher *et al.*, 2003), alors que les souches d'*Agrobacterium* induisent des tumeurs sur les racines et les tiges de plusieurs plantes. Nous présentons plus loin dans ce chapitre les différents genres de bactéries nodulant les légumineuses (Article N°1).

II.3) Partenaire végétal : les légumineuses

Les légumineuses sont des végétaux supérieurs qui appartiennent à la famille des Leguminosae (ou Fabaceae), de l'ordre des Fabales. Elles forment l'une des plus grandes familles de plantes (Broughton, 1983) et se divisent en trois sous-familles : les Papilionacées, les Mimosacées et les Césalpiniacées. On y trouve 674 genres (Van Berkum et Eardly, 1998) et approximativement 19700 espèces (Polhill et Raven, 1981). Les espèces de la sous-famille Papilionacées sont présentes dans le monde entier (Rachie, 1979) alors que les deux autres sous-familles sont principalement constituées d'espèces ligneuses de régions tropicales ou sub-tropicales.

Sur la totalité des légumineuses recensées, on estime à 20% celles qui ont été étudiées du point de vue de leur nodulation. Parmi les espèces examinées, 97% des Papilionacées (pois, haricot, fève, lentille,...), 90% des Mimosacées (robinier, *Glycine*, *Acacia*,...) et 23% des Césalpiniacées ont été trouvées capables de noduler (Dommergues *et al.*, 1998). Parmi ces

trois sous-familles, il existe quelques espèces non-nodulantes (Dommergues *et al.*, 1998), mais la très grande majorité des légumineuses sont nodulées (de Faria *et al.*, 1989 ; Allen and Allen, 1981).

La famille des légumineuses est très diversifiée dans les différentes régions du globe, avec des sites spécifiques pour certaines espèces. Par exemple, l'Afrique est la seule région d'origine de *Vigna subterranea* et de *Vigna unguiculata*. En revanche, le genre *Acacia* est représenté par environ 1500 espèces distribuées dans le monde entier. Il est généralement admis que la famille des Légumineuses est d'origine tropicale et subtropicale et que la colonisation et l'adaptation à des régions tempérées a eu lieu ultérieurement (Martinez-Romero et Caballero-Mellado, 1996, pour revue).

II.4) Mécanisme d'établissement de la symbiose

Les BNL, présents à l'état saprophytique dans la rhizosphère, répondent par un chimiotactisme positif aux exsudats racinaires de la plante. Ainsi, la rhizosphère contient des substrats qui vont attirer les BNL comme des acides aminés, des sucres, des acides dicarboxyliques mais aussi des composés plus spécifiques tels que certains flavonoïdes qui sont présents en faible concentration dans les exsudats racinaires des légumineuses (Van Rhijn and Vanderleyden, 1995 pour revue). Le catabolisme de ces substrats permet aux BNL de proliférer autour des racines de la plante (Hynes et O'Connell, 1990; Boivin *et al.*, 1991; Goldman *et al.*, 1991).

Un véritable dialogue moléculaire va alors s'établir entre la bactérie et la plante-hôte. Les flavonoïdes excrétés par la plante induisent l'expression des gènes bactériens, appelés gènes *nod*, impliqués dans le contrôle des différentes étapes de l'établissement de la symbiose. Ces gènes codent pour des enzymes responsables de la synthèse de lipooligosaccharides spécifiques, les facteurs Nod qui déterminent la spécificité d'hôte de la symbiose. En effet ces molécules induisent la formation des nodosités sur les racines de la plante-hôte.

Tous les facteurs Nod ont une structure commune : ce sont des lipochitoooligosaccharides constitués d'un squelette de base lui-même constitué de quelques résidus (3 à 5) de N-acétyl-D-glucosamine, liés en β -1,4 et monoacylé sur le groupe amino de la glucosamine terminale non réductrice (Spaink *et al.*, 1992). Selon la bactérie, ce squelette est décoré par des groupes chimiques variés (fucose, carbamate, méthyl, arabinose) présents sur les glucosamines situées aux deux extrémités. Ces décorations jouent un rôle - clé dans le spectre d'hôte des bactéries.

Dans le cas particulier de *Bradyrhizobium japonicum*, les facteurs Nod présentent un sucre supplémentaire, le 2-O méthylfucose à l'extrémité réductrice. Ce résidu fucosyl joue un rôle important dans la spécificité de la symbiose *Bradyrhizobium japonicum* - soja (Sanjuan *et al.*, 1992).

La double glycosylation a été décrite chez une fraction minoritaire des facteurs Nod de *Bradyrhizobium elkanii* où le carbone C1 de l'extrémité réductrice porte un groupement glycérol (Carlson *et al.*, 1993).

Les BNL sont capables de pénétrer à l'intérieur des légumineuses via deux modes d'infection distincts : via les poils absorbants il y a alors formation de cordons d'infection (pois, luzerne, soja)(voir fig. 2); ou via des blessures occasionnées par des éléments extérieurs ou des brèches créées par la croissance de racines secondaires (*Arachis hypogaea*, *Stylosanthes*) (Sprent et Raven, 1992; Sprent, 1993).

On distingue les nodules de type indéterminés (fig. 3), qui maintiennent un méristème à l'extrémité du nodule et continuent à s'allonger au cours du temps; et les nodules de type déterminés qui ne gardent pas de méristème persistant et qui sont sphériques (voir Patriarca *et al.*, 2002 pour revue). La localisation intracellulaire des bactéroïdes n'est pas caractéristique de toutes les légumineuses. En effet chez quelques Caesalpinales et la non-légumineuse *Parasponia*, les BNL ne pénètrent pas à l'intérieur des cellules, mais fixent l'azote de l'air dans les cordons d'infection, appelés dans ce cas cordons fixateurs (Sprent *et al.*, 1993).

II.5) Spécificité de la symbiose BNL-Légumineuse.

La plante exerce un strict contrôle sur les différents processus conduisant à l'établissement et au déroulement de la symbiose. La spécificité d'hôte est une des caractéristiques majeures de la symbiose BNL-légumineuse. Chaque espèce bactérienne possède un spectre d'hôte bien défini, mais dont l'étendue est très variable. Ainsi certains BNL ont un spectre d'hôte très limité, comme *Sinorhizobium meliloti*, les différents biovars de *Rhizobium leguminosarum* (Jordan, 1984) ou *Mesorhizobium huakuii* (Chen *et al.*, 1991). A l'inverse, d'autres ont un spectre d'hôte très étendu, comme la souche de *Sinorhizobium* sp. NGR 234 qui peut noduler plus de 70 genres différents ainsi que *Parasponia* (Broughton *et al.*, 1986 ; Lewin *et al.*, 1987). C'est également le cas des souches isolées de ou nodulant le haricot, dont le spectre s'étend à de nombreuses légumineuses tropicales (Hernandez-Lucas *et al.*, 1995). Parallèlement, certaines légumineuses ne peuvent former des nodules fixateurs d'azote qu'en association avec une gamme très étroite de symbiotes. C'est le cas par exemple de *Galega* qui ne forme des nodules qu'avec des souches de *Rhizobium galegae* (Lindström *et al.*, 1989). D'autres légumineuses acceptent au contraire une variété beaucoup plus large d'espèces, comme *Vigna unguiculata* (Lewin *et al.*, 1987), *Phaseolus vulgaris*, *Glycine* (Martinez-Romero, 1994 pour revue) *Acacia* et *Sesbania* (de Lajudie *et al.*, 1994, 1998a, 1998b; Nick *et al.*, 1999). Un groupe d'inoculation croisée a ainsi été défini comme un ensemble de légumineuses nodulées indifféremment par des bactéries isolées des nodules d'une plante de ce groupe (Fred *et al.*, 1932). Des BNL non symbiotiques existent dans le sol (Segovia *et al.*, 1991 ; Laguerre *et al.*, 1993, Sullivan *et al.*, 1996), et semblent même être en nombre plus importants que les BNL symbiotiques (Segovia *et al.*, 1991).

III) La taxonomie bactérienne

La taxonomie qui se définit comme l'étude des relations qui existent entre les organismes, englobe la classification, la nomenclature et l'identification. Ces trois parties consistent respectivement à classer et à arranger les organismes dans des groupes sur la base de

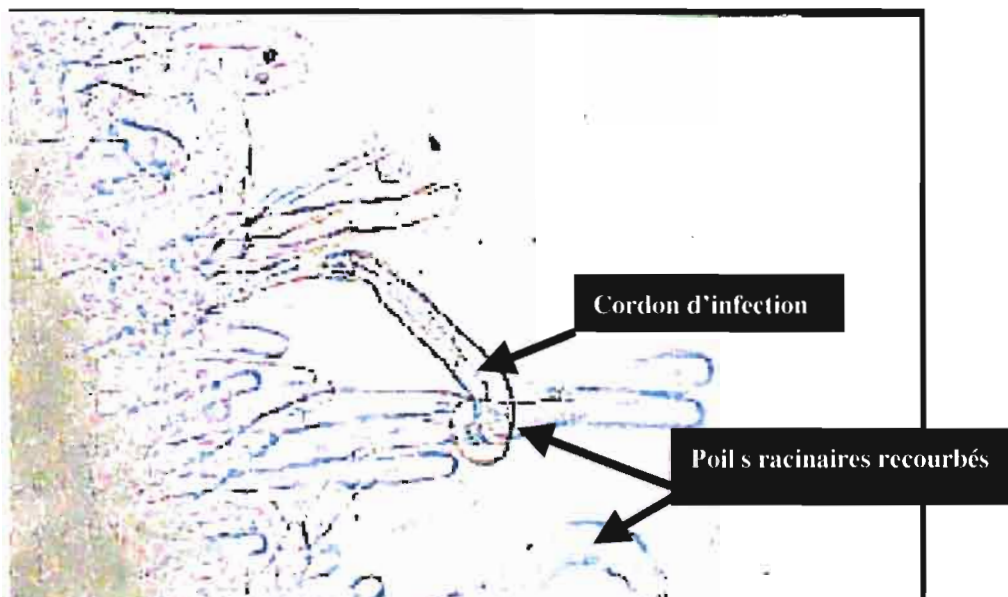


Fig 2. Cordon d'infection dans un poil absorbant de *Medicago laciniata* inoculée par *Sinorhizobium meliloti* (Zakhia, 2000)

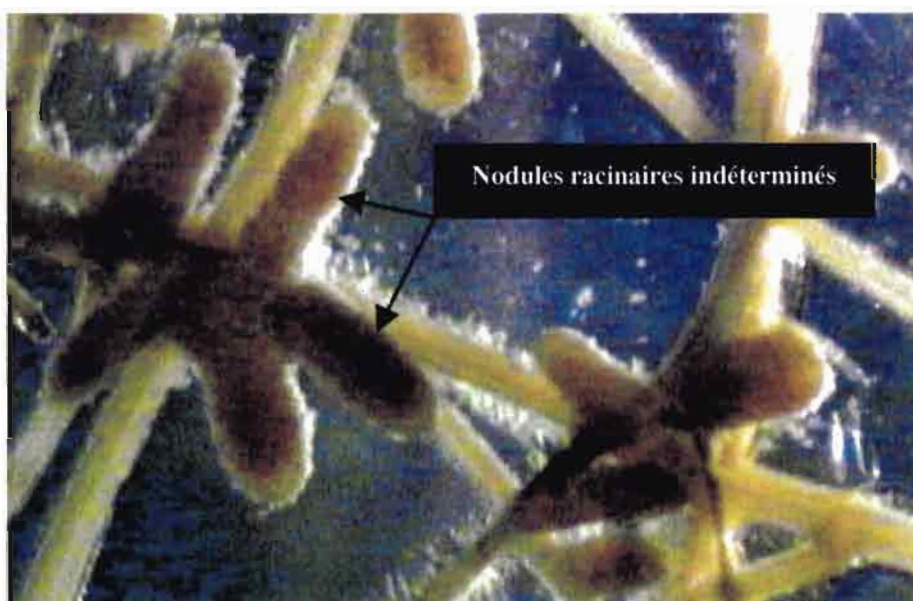


Fig 3. Nodules racinaires de *Medicago laciniata* induit par *Sinorhizobium meliloti* souche C1-4. (Zakhia et al., 2003)

similarités (classification), à donner des noms aux groupes trouvés (nomenclature) et enfin à identifier des organismes inconnus pour déterminer s'ils appartiennent aux groupes déjà définis (Vandamme *et al.*, 1996). Dans la taxonomie bactérienne, l'identification d'une bactérie à une espèce donnée reste un des aspects les plus délicats mais aussi des plus importants. En effet, si les animaux et les plantes sont riches en détails morphologiques qui constituent la base de leur classification, les bactéries de leur côté possèdent des caractéristiques morphologiques simples qui ne peuvent pas être utilisées pour les classer (Woese, 1987). Différents schémas de classification ont existé. Ces classifications reflétaient l'état des connaissances du moment, en particulier le manuel Bergey's (Krieg et Holt, 1984), qui était basé sur l'observation au microscope et sur différents tests biochimiques permettant de classer de façon séquentielle les microorganismes : photosynthétiques ou non, gram + ou non, respiration aérobie ou non, etc.

Depuis plus d'une vingtaine d'années, les taxonomistes bactériens reconnaissent la nécessité de ne plus baser le système de classification des bactéries sur des similarités de fonction (diazotrophes, phototrophes, nodulation) et d'adopter une approche nécessitant la convergence du maximum de données (phénotypiques, génotypiques, phylogénétiques) pour déterminer les groupes taxonomiques ou taxons bactériens. Cette approche, appelée taxonomie polyphasique a considérablement modifié la perception que les taxonomistes bactériens avaient des relations entre divers groupes de microorganismes (Olsen *et al.*, 1994). Progressivement il a été reconnu que la classification bactérienne devait également refléter le plus fidèlement possible les relations naturelles entre les bactéries. En effet, ces organismes présentent entre eux des relations de parenté ou de phylogénie. Ces relations phylogénétiques entre les bactéries ont été difficiles à appréhender, mais les progrès de la biologie moléculaire ont permis d'estimer l'évolution bactérienne à l'aide de molécules qualifiées "d'horloges moléculaires universelles". Il s'agit de molécules présentes partout, avec la même fonction, très conservées et qui accumulent les mutations (variations de séquences) au cours du temps, permettant d'établir la phylogénie entre des organismes éloignés. En 1987, Woese a montré que les ARNr remplissaient ces conditions. Ces molécules, en particulier l'ARNr 16S se sont vite imposées comme étant de bons chronomètres moléculaires : les gènes ribosomiaux ont en effet l'avantage de contenir des séquences de différents niveaux de conservation entre organismes, allant des séquences très conservées à des séquences très variables.

De nombreuses techniques basées sur l'approche moléculaire présentant différents niveaux d'expression et de discrimination ont été développées (fig. 4) (Vandamme *et al.*, 1996). Ainsi la combinaison de plusieurs techniques permet de révéler à la fois des diversités génétiques au sein de groupes bactériens considérés jusqu'alors comme homogènes et des relations taxonomiques entre groupes très éloignés. Les caractéristiques phénotypiques et chimiotaxonomiques devant être en accord avec cette définition.

La taxonomie de type polyphasique a été proposée par Colwell *et al.* (1970) et est utilisée pour désigner des taxa à tous les niveaux (Murray *et al.*, 1990). Elle intègre toutes les informations génotypiques, phénotypiques et phylogénétiques recueillies sur la cellule bactérienne.

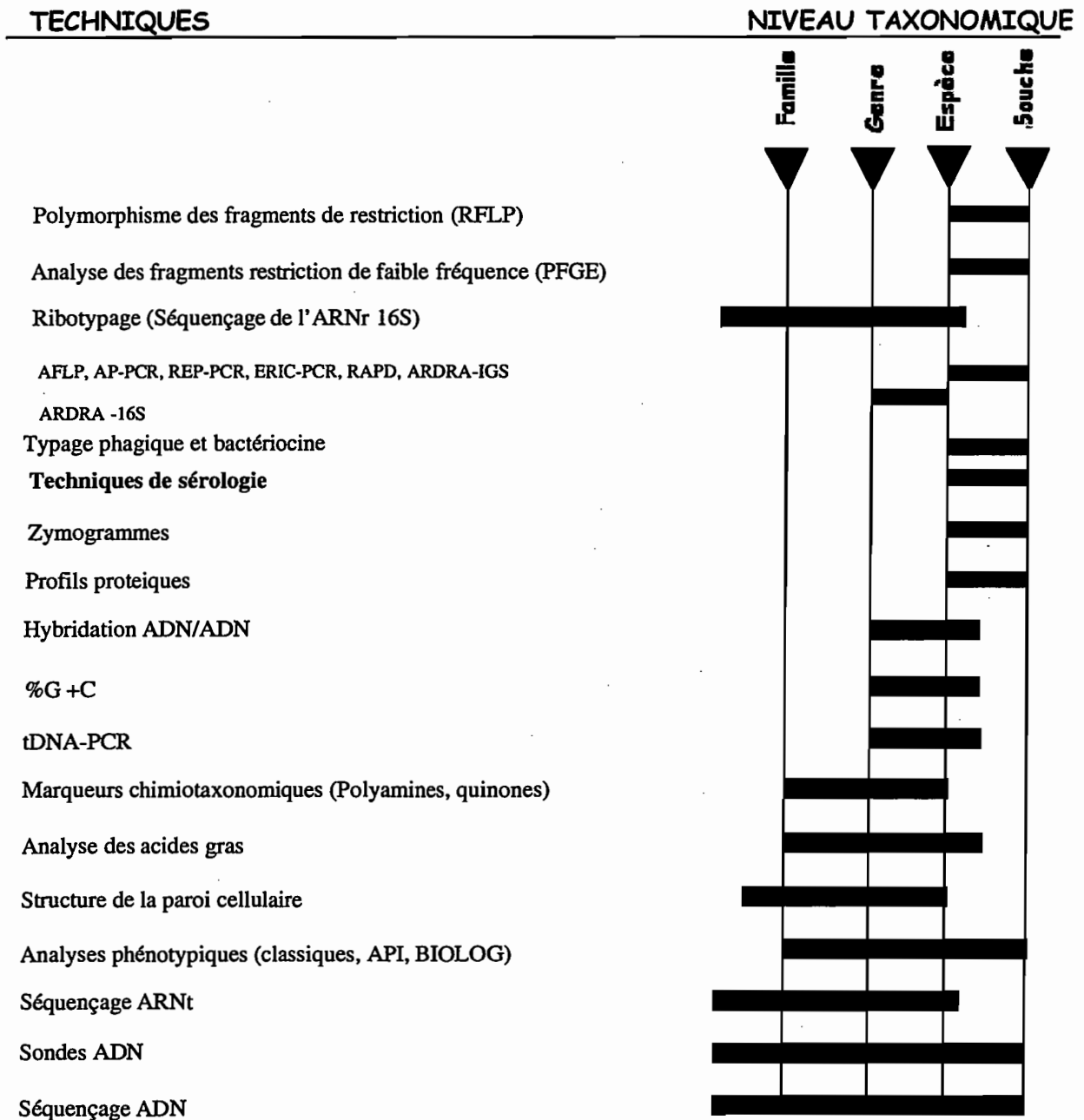


Fig.4. Pouvoirs discriminants des différentes techniques de la taxonomie polyphasique (D'après Vandamme *et al.*, 1996, modifié)

L'information génotypique est fournie par les acides nucléiques (ADN et ARN) présents dans les cellules, tandis que l'information phénotypique est donnée par les protéines et leurs fonctions, par différents marqueurs chimiotaxonomiques et plusieurs autres caractères exprimés (Vandamme *et al.*, 1996).

III.1) Les méthodes génotypiques

Il s'agit de techniques qui ciblent directement les molécules d'ADN et d'ARNr. Elles sont actuellement les méthodes dominantes de la taxonomie moderne. Ceci est la conséquence des progrès technologiques, mais également et surtout du fait que la nouvelle conception de la taxonomie est qu'elle doit refléter les similarités entre les génomes. La classification des bactéries basée sur les acides nucléiques présente plusieurs avantages : le concept de l'espèce bactérienne est possible, cette classification ne subira pas des modifications fréquentes ou radicales, des systèmes d'identification fiables peuvent être établis après la classification des microorganismes, l'information obtenue est utile pour comprendre l'évolution des différents groupes bactériens et comment les arranger selon leurs relations de parenté.

Dans cette partie, nous donnons un aperçu sur les méthodes employées pour l'analyse des acides nucléiques, appelées méthodes génotypiques. Le pouvoir taxonomique de chaque technique est souligné et des exemples d'application à la taxonomie des BNL sont donnés.

III.1.1) Détermination du pourcentage Guanine + Cytosine (% G + C)

Le premier élément des acides nucléiques à avoir été utilisé en taxonomie est le pourcentage (mole %) de bases Guanine et cytosine (Johnson, 1984). Ce pourcentage varie chez les bactéries de 25 à 75 % et cette valeur est constante pour un organisme donné. Deux organismes proches phylogénétiquement ont des valeurs de mol % G + C voisines mais deux organismes qui ont les mêmes valeurs de mol % G + C ne sont pas nécessairement proches phylogénétiquement. En effet, la détermination du % G + C ne prend pas en compte l'arrangement des nucléotides dans les molécules d'ADN. Les valeurs de ce pourcentage d'une souche à une autre au sein d'une même espèce ne doivent pas présenter une variation supérieure à 3 %. Les valeurs de ce pourcentage des espèces d'un genre donné ne doivent pas présenter une variation supérieure à 10 % (Stackebrandt et Liesack, 1993). Pour les BNL, ce taux varie de 59% (*Rhizobium*) à 72,4% (*Methylobacterium*) (voir tableau 1).

III.1.2) L'hybridation ADN / ADN

Le pourcentage d'hybridation ADN/ADN et la stabilité thermique de l'hybride sont utilisés pour décrire l'espèce (Wayne *et al.*, 1987). La valeur d'hybridation ADN/ADN est un indicateur de la similarité des séquences entre génomes entiers (De Ley *et al.*, 1970 ; Grimont *et al.*, 1980). L'espèce bactérienne doit contenir des souches présentant une valeur d'association de leur ADN supérieure ou égale à 70 % et une stabilité de l'hybride de 5°C ou moins (Stackebrandt et Goebel, 1994). Plusieurs techniques d'hybridation ADN/ADN ont été décrites, mais les plus couramment utilisées sont la méthode sur l'hydroxyapatite (Brenner *et al.*, 1969) ; la méthode de détermination par spectrophotométrie du taux de renaturation

initiale (De Ley *et al.*, 1970) et la méthode de la nucléase S1 (Crosa *et al.*, 1973 ; Grimont *et al.*, 1980). Plus récemment, de nouvelles techniques plus rapides et nécessitant moins d'ADN ont été décrites (Ezaki *et al.*, 1989 ; Jahnke, 1994 ; Goris *et al.*, 1998) qui devraient remplacer les techniques classiques qui demandent d'importantes quantités d'ADN et beaucoup de temps.

III.1.3) Le séquençage de l'ADNr 16S et d'autres gènes

La percée dans l'étude de la phylogénie des procaryotes a commencé dans les années 70 avec les travaux de Woese et collaborateurs (Woese et Fox, 1977 ; Fox *et al.*, 1977 ; Woese, 1991) qui ont mis au point des méthodes rapides d'analyse de séquences et de construction d'arbres phylogénétiques. Leurs résultats ont permis dans un premier temps d'avoir un aperçu global de la phylogénie des procaryotes.

Comme nous l'avons souligné, l'ARNr (5S, 16S et 23S) constitue un outil de choix pour étudier les relations phylogénétiques grâce à sa présence chez toutes les bactéries, sa fonction constante et la présence de zones très conservées ainsi que des parties à séquences variables (Woese, 1987 ; Schleifer et Ludwig, 1989 ; Stackebrandt et Goebel, 1994). Le développement de nouvelles techniques moléculaires a permis aux microbiologistes de faire l'étude comparative des molécules d'ARNr. Le séquençage croissant de ces molécules a abouti à la constitution d'une banque de données sur l'ARNr 5S (Wolters et Erdmann, 1988) qui a été la première molécule à être séquençée pour plusieurs bactéries grâce à ses structures primaires et secondaires moins complexes.

L'utilisation de primers conservés et de la transcriptase reverse pour séquençer l'ARNr 16S a constitué une avancée importante dans la phylogénie bactérienne en permettant l'augmentation spectaculaire du nombre de séquences. Actuellement, toutes ces techniques sont principalement remplacées par le séquençage direct de toute ou partie de l'ADNr 16S ou 23S en utilisant les techniques de PCR et des primers appropriés. Les résultats obtenus avec d'autres macromolécules conservées comme la sous unité β de l'ATP synthase (Amann *et al.*, 1988 ; Klugbauer *et al.*, 1992) sont conformes à ceux obtenus par l'ARN 16S. Cependant il est clair que plus les éléments conservés sont longs, plus ils portent d'informations et plus les conclusions sont fiables. En effet, au niveau moléculaire, l'identité de séquences indique une origine commune des gènes correspondant et de leurs produits. Le nombre et la nature des différences de séquences entre des gènes ou des molécules contemporaines reflètent leur histoire évolutive. Par conséquent, le nombre de changements peut être utilisé pour mesurer le temps qui s'est écoulé depuis le dernier ancêtre commun.

Avec le développement rapide des techniques de séquençage de l'ADNr 16S et la mise en place d'importantes banques de données, il a été nécessaire de bien définir la place de l'analyse des séquences 16S dans la description de l'espèce. Ces dernières années la position phylogénétique de plusieurs espèces a été définie exclusivement sur la base de séquences d'ADNr 16S. Or, il a été démontré que le pouvoir résolutif de cette technique devient limité quand il s'agit d'étudier des souches ou des espèces très proches dont la divergence est très récente (Fox *et al.*, 1992 ; Stackebrandt et Goebel, 1994). La question a donc été de savoir si l'analyse des séquences d'ADNr 16S pouvait remplacer l'hybridation ADN/ADN dans la

description de l'espèce, ou si elle devait être utilisée comme un critère supplémentaire. Pour répondre à cette interrogation, les taxonomistes bactériens sont aujourd'hui unanimes que le séquençage de l'ADNr 16S est le critère taxonomique le plus précieux de la classification bactérienne, et qu'au niveau de l'espèce, il reste salutaire pour décider ou non de l'opportunité de faire de l'hybridation ADN/ADN. Après l'analyse des données disponibles dans les banques, il est actuellement bien établi que deux organismes qui présentent moins de 97% d'homologie de séquences d'ADNr 16S n'associent pas leur ADN à plus de 60% et dans ce cas selon la définition de l'espèce (Stackebrandt et Goebel, 1994), il n'est pas nécessaire de recourir à l'hybridation ADN / ADN.

Cependant la phylogénie de l'ADNr 16S est la phylogénie d'un seul gène et chez certains BNL à croissance rapide, il existe plusieurs copies de l'ADNr 16S. Ainsi, la souche type de *S. saheli* en présente deux séquences différentes (Haukka *et al.*, 1996). Les bradyrhizobia, à l'inverse, ont une seule copie de ce gène (Kündig *et al.*, 1995). Pour les BNL, il existe d'autres tentatives de classification phylogénétiques qui sont basées sur le séquençage d'autres gènes que l'ADNr 16S. Par exemple, la phylogénie basée sur les séquences du gène *atpD* donne une classification identique à celle de l'ADNr 16S dans les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* et *Agrobacterium* (Gaunt *et al.*, 2001). La phylogénie basée sur l'étude des séquences du gène *glnII*, codant pour la glutamine synthétase II, donne un arbre phylogénétique où *Mesorhizobium huakuii* occupe une position au sein du clade du groupe *Rhizobium*. Ce qui suggère que ce gène a été acquis par *M. huakuii* de *Rhizobium* il y a très longtemps. De même, pour ce gène le genre *Bradyrhizobium* apparaît plus proche du genre *Mesorhizobium*.

Les phylogénies des BNL basées sur d'autres gènes de l'opéron ribosomique (gènes codant pour l'ARNr 23S ou pour l'ARNr 5S ou l'intergène entre le 23S et le 5S) ne donnent pas des arbres de topologies identiques. Ainsi, Van Berkum *et al.* (2003) ont réalisé des arbres phylogénétiques de certaines BNL en utilisant les séquences de trois loci (ADNr 16S, ADNr 23S et l'ITS séparant le 23S du 5S). Des discordances ont été trouvées entre les différentes topologies, par exemple, dans l'arbre construit à partir de séquences de l'ADNr 23S, les espèces de *Sinorhizobium* viennent occuper un clade au sein des espèces du genre *Rhizobium*. Les auteurs suggèrent que cette discordance pourrait trouver son origine dans les phénomènes de conversions de gènes (phénomènes qui se déroulent lors de la mitose et qui consistent en un don non réciproque de segment d'ADN d'un gène à un autre) ou l'existence de plusieurs allèles de l'ADNr 16S hétérogènes et qui subissent des recombinaisons.

Finalement, la classification actuelle des BNL basée sur les séquences du 16S est satisfaisante car elle permet la séparation des différents genres : *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Blastobacter*, *Devosia*, *Burkholderia* et *Ralstonia* mais Van Berkum *et al.* (2003) proposent comme démarche pour les décisions en taxonomie d'élaborer des phylogénies basées sur plusieurs loci et qu'une comparaison analytique soit adoptée pour estimer les relations phylogénétiques au moment de la description de nouvelles espèces.

III.1.4) Les méthodes de typage basées sur la PCR :

Les méthodes de typage génétique utilisent des techniques qui permettent de subdiviser l'espèce en un nombre distinct de types. La PCR a permis le développement de nombreuses méthodes de typage génétique. Les techniques basées sur la PCR ont l'intérêt d'être universelles, simples et rapides. Des techniques de caractérisation de bactéries se sont développées après la découverte de la PCR. Elles ont beaucoup servi pour la description de nouveaux taxons de BNL. Nous énumérons ici certaines de ces techniques.

III.1.4.1) Polymorphisme de fragments de restriction (PCR-RFLP)

Dans la méthode PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), la PCR est combinée avec les enzymes de restriction. Le produit de la PCR qui correspond à l'ADNr 16S ou le 23S avec ou sans l'IGS, ou bien d'autres régions comme des gènes impliqués dans la symbiose ou la fixation d'azote, est amplifié avec des amorces universelles définies en alignant les séquences disponibles, puis digéré par des enzymes de restriction. Cette technique fournit principalement des profils spécifiques (Gurtler *et al.*, 1991 ; Jayaro *et al.*, 1991 ; Vaneechoutte *et al.*, 1992 ; Ralph *et al.*, 1993 ; Laguerre *et al.*, 1994). Dans l'étude des collections de BNL isolés de nodules, la PCR-RFLP du gène codant pour l'ARNr 16S (ADNr 16S) est employée pour grouper les souches. Plusieurs gènes peuvent être ciblés, l'ADNr 16S (Laguerre *et al.*, 1994 ; cette thèse), les gènes de nodulation *nodC*, de fixation d'azote *nifH* (Laguerre *et al.*, 2001).

III.1.4.2) AFLP

L'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) est une approche moléculaire pour explorer le polymorphisme de séquences représentatives d'un génome entier. Elle a été décrite par Zabeau et Vos (1993).

L'ADN génomique total est digéré par des enzymes de restriction de deux sortes : une qui reconnaît un site de coupure fréquent (4 bases d'ADN) et une autre qui reconnaît un site de coupure rare (6 à 8 bases). Ensuite il y a ligation des fragments de restriction avec deux adaptateurs dont les extrémités 3' sont homologues aux sites de restriction et contenant une base différente pour empêcher la restriction d'avoir lieu de nouveau. Cette étape est suivie d'une amplification sélective des fragments de restriction par l'utilisation d'amorces homologues aux adaptateurs et contenant chacun une base sélective à leur extrémité 3'. De ce fait, une partie seulement des fragments de restriction sera amplifiée. Le marquage au ³²P de l'amorce correspondant au site rare de coupure permet de visualiser les bandes par autoradiographie.

La technique AFLP est considérée comme une technique fine dans la taxonomie microbienne, son pouvoir résolutif est plus élevé que la technique ARDRA et va jusqu'au niveau infraspécifique.

Comme application sur la taxonomie des BNL, cette technique a été très utile dans l'étude des bradyrhizobia pour pallier aux limites de la technique SDS-PAGE (Willems *et al.*, 2000 ; Doignon-Bourcier *et al.*, 2000). Willems *et al.*, (2000), ont utilisé cette technique pour étudier la diversité des isolats du genre *Bradyrhizobium* associés à *Faidherbia albida* et des espèces

d'*Aschenomene*. Le pouvoir discriminatif de cette technique dans l'étude de la biodiversité des isolats de bradyrhizobia a été évalué en comparant les résultats avec ceux obtenus par le séquençage de l'ITS (16S-23S) et les hybridations ADN-ADN (Willems *et al.*, 2001). Pour *Bradyrhizobium*, il s'est avéré que les souches appartenant au même groupe AFLP et les souches ayant des séquences de l'IGS présentant une divergence inférieure à 4 % appartiennent à la même espèce génomique. Les auteurs déduisent qu'étant donnée la lourdeur de la technique AFLP, le séquençage de l'IGS pourrait guider vers les souches à étudier en hybridation ADN – ADN et donc limiter le nombre de souches à examiner en hybridation, surtout que l'obtention de l'ADN en bonne quantité et qualité à partir des bradyrhizobia est difficile. La technique AFLP a été aussi appliquée pour étudier la diversité génétique de BNL à croissance rapide comme des populations de *Rhizobium galegae* (Terefework *et al.*, 2001).

III.1.4.3) RAPD ou AP-PCR

La technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) appelée aussi AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) a été introduite en 1990 (Williams *et al.* 1990 ; Welsh et McClelland, 1990). Le principe de la méthode est d'effectuer des réactions de PCR avec une seule amorce dont la séquence est courte (9 à 10 pb) et choisie au hasard. Le nombre de sites correspondant à l'amorce utilisée peut varier d'une souche à une autre au sein de la même espèce. Après séparation des produits de PCR sur gel d'agarose, on obtient un profil de bandes caractéristique de la souche étudiée. Le choix des amorces est empirique.

Vila *et al.* (1996), a évalué le pouvoir taxonomique de cette technique dans l'étude du complexe *Acinetobacter calcoaceticus* et *A. Baumannii*. Il s'avère que la méthode RAPD est plus discriminante que la méthode RFLP de l'ADNr 16S ou bien de la zone intergénique 16S-23S. Cependant, les auteurs trouvent que la méthode RAPD est moins discriminante que la REP-PCR (voir le paragraphe suivant). De plus, on a rapporté le manque de reproductibilité dans la méthode RAPD qui peut-être lié au fait que les séquences des amorces sont choisies au hasard donc peuvent s'hybrider avec des zones non spécifiques de l'ADN génomique. Cette technique ne permettait pas la distinction de souches au sein de la même espèce (Versalovic *et al.*, 1991 ; Welsh *et al.*, 1990).

Cette méthode est rapide et simple à condition de standardiser les conditions de PCR qui ne nécessitent pas une quantité et une qualité d'ADN élevées (Sikora *et al.*, 1997). Les applications de cette méthode en rhizobiologie concernent plutôt les bradyrhizobia. (Nuntagij *et al.*, 1997 ; Saeki *et al.*, 2000 ; Saleena *et al.*, 2001 ; Sikora *et al.*, 2002) et des isolats d'*Acacia tortilis subsp raddiana* (de Lajudie *et al.*, sous presse). Outre son intérêt taxonomique, cette technique est utile pour l'étude de la diversité infra-spécifique des bradyrhizobia (Lunge *et al.*, 1994 ; Nishi *et al.*, 1996). La technique de AP - PCR a été aussi appliquée pour l'étude des BNL à croissance rapide. C'est ainsi que Selenska Pobell (1995) a caractérisé des souches de *Rhizobium galegae*.

III.1.4.4) REP-PCR

La méthode de REP-PCR (Repetitive extragenic palindromic) a été introduite par Versalovic *et al.* (1991). Le but de cette méthode est de caractériser des souches bactériennes par des profils électrophorétiques obtenus en amplifiant des séquences répétitives appelées séquences REP. Ce sont des séquences répétitives de 38 pb de longueur, ayant 6 positions dégénérées et une boucle de 5 pb variable se trouvant entre les deux séquences palindromiques conservées.

Versalovic *et al.* (1991), ont pu définir des amorces pour explorer la présence de séquences qui ressemblent aux séquences REP et ils ont trouvé que ces séquences peuvent se trouver chez plusieurs genres de bactéries dont les entérobactéries (Gilson *et al.*, 1984).

Cette méthode a été appliquée sur les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* et *Agrobacterium*. (de Brujn, 1992). L'étude a montré que des séquences REP sont présentes chez ces bactéries. D'autre part, pour étudier la diversité de souches de *Bradyrhizobium japonicum*, Sikora *et al.* (2002), ont employé la REP-PCR, avec la technique RAPD. Les auteurs ont trouvé que ces techniques étaient capables de révéler la diversité des souches étudiées, la technique RAPD ayant un pouvoir discriminant légèrement plus élevé. La REP-PCR a aussi été employée pour beaucoup d'étude de diversité d'isolats de BNL (Judd *et al.*, 1993 ; Nick *et al.*, 1994 ; Hamill *et al.*, 1995 ; Schneider *et al.*, 1996 ; de Lajudie *et al.*, 1998a ; Chen *et al.*, 1988 ; Niemann *et al.*, 1999).

L'avantage de cette méthode est sa simplicité et sa rapidité. Un simple gel d'agarose peut permettre de séparer les fragments d'ADN obtenus. De plus, ces réactions de PCR peuvent donner de bons profils analysables si elles sont réalisées à partir d'un petit nombre de cellules mises en suspension dans le mix de PCR (de Brujn, 1992).

III.1.5) LMW RNA staircase electrophoresis

La méthode LMW (Low Molecular Weight) a été décrite par Höfle (1988). Les molécules de l'ARN ayant un faible poids moléculaire sont extraites. La séparation de ces molécules par électrophorèse à gradient de voltage croissant (augmentation de 50 Volts chaque 10 min, de 100 à 2300 volts) sur gel de polyacrylamide donne des profils caractéristiques de chaque souche étudiée (Cruz-Sanchez *et al.*, 1997). Les profils se divisent en 3 zones : zone correspondante à l'ARNr 5S. Les bandes de cette zone sont communes pour les souches appartenant au même genre. La zone des profils correspondante à la sous-classe 2 des ARNr donnerait des informations au niveau spécifique, alors que la zone de profils correspondante à la sous-classe 1 des ARNr donnerait des informations à un niveau infraspécifique (pour une étude populationnelle). (Velazquez *et al.*, 1998).

Velazquez *et al.* (1998) décrivent cette technique comme une technique de typage rapide des BNL. Ils ont choisi des souches types appartenant aux différents genres : *Agrobacterium*, *Phyllobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* *Sinorhizobium*. Les zones des profils situées au niveau de l'ARNr 5S étaient caractéristiques de chaque genre étudié. Les résultats obtenus montrent que cette technique donne des résultats identiques aux résultats classiques de la phylogénie des BNL. Cependant, cette technique présente des limites : *B. liaoningense* avait un profil ARNr 5S différent des autres bradyrhizobia ; une souche de *Sinorhizobium meliloti*, se groupe avec cette technique avec le genre

Mesorhizobium. D'autre part, Velazquez *et al.*, 2001) ont caractérisé avec cette technique des isolats de nodules de *Phaseolus vulgaris*, ils ont trouvé qu'elle est plus discriminante que les séquences de l'ADNr 16S quand il s'agissait de biovars de *Rhizobium leguminosarum*. Par ailleurs, cette technique a été utilisée pour l'étude de la diversité de souches de *Bradyrhizobium* sp (Jarabo-Lorenzo *et al.*, 2000) et des souches d'*Agrobacterium* (Velazquez *et al.*, 2001). Cette technique a aussi permis de mettre en évidence une nouvelle espèce du genre *Mesorhizobium* (*M. chacoense*) (Velazquez *et al.*, 2001).

III.1.6) PFGE

La technique PFGE (Pulsed-Field Gel electrophoresis) (Colrich *et al.*, 1991), est l'analyse de génomes par électrophorèse en champs pulsés après hydrolyse par des enzymes de restriction qui coupent peu (ce qui va générer de grands fragments). Elle permet la séparation de fragments de génomes bactérien en vue d'une détermination de sa taille mais aussi en vue de typage d'isolats bactériens. D'après Tenover *et al.*(1995), les isolats ayant les mêmes profils PFGE sont considérés comme étant la même souche. Dans certains cas, cette technique a un pouvoir résolutif supérieur au REP-PCR (Grundmann *et al.*, 1995). L'application de cette technique pour caractériser des isolats de *R. leguminosarum* a donné des résultats concordants avec la technique RAPD (Corich *et al.*, 2001).

III.2) Les méthodes phénotypiques

Les méthodes phénotypiques sont celles qui ne sont pas directement basées sur l'ADN ou ARN. Elles font appel principalement aux caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des bactéries en utilisant des techniques standardisées. Dans la majorité des laboratoires de microbiologie les tests phénotypiques classiques sont utilisés pour l'identification et constituent la base de la description formelle des taxa. Le développement des systèmes miniaturisés et automatisés tels que les API ou BIOLOG, la généralisation du traitement des données par ordinateur et l'analyse numérique ont rendu plus aisée la classification des microorganismes par l'approche phénotypique. Cependant pour certains groupes de bactéries, le manque de caractéristiques phénotypiques pose souvent des problèmes pour leur description ou leur différenciation. Dans ces cas, les méthodes génétiques ou chimiotaxonomiques sont nécessaires pour identifier de manière sûre les souches. Actuellement les techniques phénotypiques les plus couramment utilisées par les microbiologistes sont :

III.2.1) L'analyse phénotypique classique

Elle concerne la caractérisation des BNL par une série de tests sur la base de critères de vitesse de croissance, de pH, de tolérance à la salinité ou à d'autres facteurs de l'environnement, croissance en présence de substrats donnés. Cette analyse phénotypique est classique et constitue la base de la microbiologie.

III.2.2) Les systèmes commerciaux

Ce sont des systèmes miniaturisés (Galerie API, BIOLOG...). Il s'agit d'une batterie de tests de caractérisation de microorganismes en présence de substrats (croissance, activité enzymatique...).

III.2.3) La composition des parois cellulaires

Cette approche peut servir pour caractériser les bactéries mais elle est utilisée plutôt pour les bactéries à gram-positif car la composition de leur paroi contient une variabilité d'éléments informatifs (Schleifer et Kandler, 1972)

III.2.4) FAME ou Les acides gras cellulaires

Les acides gras sont les composants majoritaires des lipides cellulaires. Etant donné la variabilité de longueur de leur squelette lipidique, de la position de la double liaison ou aussi la variabilité des groupes de substitution présents sur leur chaîne, leur utilisation en taxonomie de prokaryotes a donné de bons résultats (Jones et krieg, 1984 ; Suzuki *et al.*, 1993).

La technique FAME (Fatty acid Methyl ester) a été introduite pour la caractérisation des BNL par Jarvis et Tighe (1994). Cette méthode consiste en l'extraction des acides gras totaux de la cellule bactérienne et l'obtention de profils d'acides gras qui sont caractéristiques de la souche étudiée. Cependant, cette méthode doit procéder à une standardisation du milieu et des conditions de culture car la composition d'acides gras dans les cellules peut varier selon les conditions environnementales.

So *et al.* (1994) ont appliqué cette méthode pour étudier la diversité d'isolats de *Bradyrhizobium* isolés d'*Aeschynomene* et la technique FAME donnait un résultat concordant avec les résultats obtenus avec le séquençage de l'ADNr 16S. Plusieurs auteurs ont appliqué cette technique pour l'étude de la diversité de bradyrhizobia (Graham *et al.*, 1995 ; Zhang *et al.*, 1999). Cette technique a un pouvoir résolutif qui peut aller jusqu'à la séparation des différentes espèces de BNL (Les espèces de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Agrobacterium*) sauf pour *R. etli* et *R. leguminosarum* (Jarvis *et al.*, 1996).

III.1.2.5) SDS-PAGE des protéines cellulaires totales

Une cellule bactérienne contient plus de 2000 protéines différentes. Cela constitue une source d'information importante. La méthode consiste en l'extraction des protéines cellulaires totales que l'on fait ensuite migrer sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. On obtient ainsi des profils caractéristiques de chaque souche bactérienne. Deux microorganismes très proches doivent avoir des profils électrophorétiques similaires ou identiques. Le profil électrophorétique d'une souche donnée est le reflet du bagage génétique du microorganisme et sa comparaison avec les profils d'autres bactéries permet de mesurer le degré de parenté avec ces microorganismes. Roberts *et al.* (1980) ont étudié la diversité de BNL en utilisant cette technique et depuis, son application a été très importante dans la taxonomie des BNL. Elle a permis en effet la description de nombreuses espèces de BNL : *Sinorhizobium terangaie* et *Sinorhizobium saheli* (de Lajudie *et al.*, 1994), *Mesorhizobium plurifarum* (de Lajudie *et al.*, 1998), *Allorhizobium undicola* (de Lajudie *et al.*, 1998), *Sinorhizobium arboris* et *Sinorhizobium kostiense* (Nick *et al.*, 1999). Cette technique produit une discrimination

variable selon les groupes bactériens étudiés. Cette technique a un pouvoir discriminant très puissants chez les lactobacilles (Vandamme *et al.*, 1996) mais pas très puissante pour l'étude des bradyrhizobia (Doignon-Bourcier *et al.*, 1999).

III.2.6) MLEE

La technique MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) est présentée par Selander *et al.*, (1986) comme méthode puissante pour l'étude des populations de bactéries d'une même espèce ainsi que pour l'étude taxonomique. La discrimination entre les isolats se fait sur la base de variations de la mobilité électrophorétique de certaines enzymes bactériennes (allozymes = variante de la même enzyme codée par le même gène mais par des allèles différents). En effet, la variation de mobilité observée est due à une différence dans la séquence d'acides aminés de l'enzyme et donc reflète une différence dans la séquence des paires de bases du gène codant pour cette enzyme. Au cours de l'analyse par MLEE, les enzymes bactériennes sont extraites et chargées sur gel d'amidon (qui permet un meilleur découpage des bandes que le gel de polyacrylamide). Ensuite les bandes sont mises dans des solutions pour révéler la présence ou l'absence d'une enzyme. Dans le cas où l'enzyme est présente, sa mobilité est comparée pour les différents isolats.

L'application de cette méthode n'est pas sans inconvénients puisqu'elle est relativement lourde et difficile. Son pouvoir de discrimination est généralement moins élevé que le PFGE. De plus, la modification post traductionnelle qui a lieu parfois, peut constituer un écueil à l'analyse populationnelle.

Plusieurs auteurs ont utilisé cette technique pour l'étude de la diversité des BNL : *R. leguminosarum* (Pinero *et al.*, 1988 ; Demezas *et al.*, 1995 ; *R. etli* (Wang *et al.*, 1999), *R. tropici* (Acosta-Durán et Martínez-Romero) ou des sinorhizobia (Jebara *et al.*, 2001). Cette technique a servi pour la distinction de *R. huautlense*, une nouvelle espèce de BNL très proche de *R. galegae* et dont la méthode RFLP de l'ADNr 16S ne pouvait pas distinguer (Wang *et al.*, 1998).

Il existe d'autres techniques phénotypiques comme la pyrolyse, la sérologie, le séquençage des acides aminés.

III.3) Conclusion

Plusieurs techniques moléculaires sont actuellement à la disposition du microbiologiste. La taxonomie de type polyphasique a révolutionné la taxonomie microbienne. Ainsi, pour la caractérisation d'un microorganisme, on combine une ou plusieurs techniques phénotypiques avec une ou plusieurs techniques génotypiques en fonction des possibilités du laboratoire.

IV) Revue des 11 genres de Bactéries Nodulant les Légumineuses (BNL)

Il existe actuellement 11 genres de BNL (tableau 2). Nous présentons ici sous forme d'article, une revue des différents genres connus à la date de sa publication, à savoir (7 genres) : *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Methylobacterium*. Ensuite, nous présenterons une actualisation de cet article en exposant les

4 nouveaux genres de BNL décrits plus récemment : *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Blastobacter*, *Devosia*.

Cette classification des BNL est loin d'être définitive. Elle s'affine sans cesse et s'enrichit régulièrement de nouveaux taxa grâce à l'exploration de la nodulation de nouvelles légumineuses et à l'isolement de nouvelles souches. L'*International Committee of Systematic Bacteriology* a publié des recommandations sur les critères nécessaires et suffisants, pour classer les BNL en genres et espèces (tableau 1). Ces critères, reflètent des données phénotypiques, génotypiques et phylogénétiques constituent des guides pour la validation de nouveaux taxons chez les BNL (Graham *et al.*, 1991 ; Rossello-Mora et Amann, 2001).

Tableau 1a. Critères de définition de nouveaux taxons de BNL (d'après Graham *et al.*, 1991, actualisé).

<p>I) Etudes au niveau génomique</p> <ul style="list-style-type: none"> •% G+C (Voir Tableau 1b) •Homologies ADN/ADN ($\geq 70\%$ avec $\Delta T_m < 5^\circ\text{C}$ au sein d'une espèce) •Taille du génome •RFLP sur ADN chromosomique ou plasmidique •Hybridation avec sonde spécifique •Etude basées sur l'ARN ribosomal : <ul style="list-style-type: none"> - Hybridations 16S ARNr : ADN total - Séquençage 16S ARNr <p>II) Etude des composants cellulaires</p> <p>Profils électrophorétiques des protéines totales solubles en SDS – PAGE</p> <p>Mobilité électrophorétique des enzymes du métabolisme</p> <p>Etudes d'autres composants cellulaires (Exopolysaccharide, acides gras...)</p> <p>III) Etudes phénotypiques</p> <p>Caractéristiques morphologiques et culturales (types de colonies, croissance, utilisation de différentes sources de carbone), Performances symbiotiques, Méthodes sérologiques, Sensibilité aux bactériophages</p>
--

Tableau 1b. % G+C

Genre	% G+C	Références
<i>Rhizobium</i>	59 – 64 %	Chen <i>et al.</i> , 1988 ; Jordan, 1984
<i>Bradyrhizobium</i>	61 – 65 %	Jordan <i>et al.</i> , 1984
<i>Azorhizobium</i>	66 – 68 %	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
<i>Allorhizobium</i>	60,1 %	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998b
<i>Sinorhizobium</i>	60,6 – 61,8 %	Nick <i>et al.</i> , 1999
<i>Mesorhizobium</i>	59 – 64 %	Jarvis <i>et al.</i> , 1997
<i>Methylobacterium</i>	68,4 – 72,4%	Hood <i>et al.</i> , 1987
<i>Burkholderia</i>	62,8%	Vandamme <i>et al.</i> , 2002
<i>Ralstonia</i>	67 %	Chen <i>et al.</i> , 2001
<i>Blastobacter</i>	58,9 – 66,3 %	Hirsch, 1991
<i>Devosia</i>	62,0 – 62,4 %	Rivas <i>et al.</i> , 2003
<i>Ensifer</i>	62,3 %	Willems <i>et al.</i> , 2003

Taxonomy of rhizobia

Frédéric ZAKHIA, Philippe de LAJUDIE*

Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR 113 INRA/AGRO-M/CIRAD/IRD,
TA 10 / J, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

(Received 15 January 2001; revised 8 March 2001; accepted 13 March 2001)

Abstract – Rhizobia are the bacteria that form nitrogen-fixing symbioses with legumes. Based on their characterisation by polyphasic taxonomy, their classification has undergone great changes in recent years. The current six rhizobium genera and 28 recognised species are reviewed here.

Rhizobium / taxonomy

Résumé – Taxonomie des rhizobia. Les rhizobia sont les bactéries qui forment des symbioses fixatrices d'azote avec des plantes de la famille des légumineuses. Suite à l'adoption de la taxonomie polyphasique comme critère de caractérisation, leur classification a subi de nombreux remaniements ces dernières années. Une revue de cette classification en six genres et 28 espèces actuellement reconnus est présentée ici.

Rhizobium / taxonomie

1. INTRODUCTION

Nitrogen fixation, that is to say the reduction of atmospheric nitrogen to ammonia, is the basic phenomenon making nitrogen available for the biosphere. Among living organisms, only some prokaryotes have this ability. They are spread over many of the major bacterial phyla. Among these, some soil bacteria, commonly and collectively called rhizobium or rhizobia, can form symbioses with leguminous plants. They induce the formation of specialised organs, called nodules, where they fix nitrogen to the benefit of the plant. These symbioses have major environmental and agricultural importance since they are responsible for most of the biological atmospheric nitrogen fixation on earth.

Rhizobia are diverse and, during recent years, their classification has undergone great changes due to new phylogenetic and polyphasic data leading to the description of new taxa [73]. Still it is an expanding field because more and more rhizobia are isolated and characterised every day, especially from the tropical and the mediterranean zones, where diversity is still poorly documented.

Until the early 1980s all symbiotic nitrogen-fixing bacteria from leguminous plants were classified in the single genus *Rhizobium*, including six species *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupini* and *R. japonicum*. This taxonomy matched the cross-inoculation groups, defined as the set of host-plants nodulated by the same bacterial strains. For a long time

Communicated by Jean-Jacques Drevon (Montpellier, France)

* Correspondence and reprints
P-De.Lajudie@mpl.ird.fr

the genera *Rhizobium*, *Agrobacterium*, and *Phyllobacterium* were grouped in the family *Rhizobiaceae* mainly based on their common functional characteristic of inducing cell proliferations on plants.

Taxonomy based on the concept of cross-inoculation groups failed because of the many exceptions to this rule. Moreover, at the same time, it was also widely recognized that *Rhizobium* classification should adjust to general bacterial taxonomy, and include a panel of genomic, phenotypic and phylogenetic features instead of the sole nodulation properties. Molecular techniques have developed considerably during the past 20 years and were made available for characterisation of rhizobia, leading to considerable changes in their classification.

2. POLYPHASIC TAXONOMY

Taxonomy studies the natural relationships existing between organisms and leads to their classification, a pre-requisite for the identification of any organism. Taxonomy [23] comprises (i) characterisation of the organisms, (ii) classification on the basis of similarity, (iii) nomenclature to give names to groups and (iv) identification of unknown organisms, to determine if they belong or not to one of the units classified and/or named. The central concept of bacterial taxonomy is the bacterial species. Unlike animals and plants, bacteria have simple morphological and physiological characteristics, limited and insufficient for taxonomic descriptions [68]. It is now recognised that bacterial classification must reflect the phylogenetic relationships between bacteria, main witnesses of which are the sequences of ribosomal RNA. In 1987, a group of taxonomists proposed a phylogenetic definition of the bacterial species based on various methodologies including the study of 16S ribosomal RNA and DNA/DNA hybridisations, but still recommending laying out discriminating phenotypic characteristics to name a new species [62]. Previously Colwell [9] founded the basis of modern bacterial taxonomy by recommending the integration of all pieces of information obtained at various levels of the cell - DNA, RNA, phenotypic and expressed features (proteins and their functions, fatty acids, chemotaxonomic markers) and by various techniques contributing to a polyphasic taxonomy likely to lead to a more stable classification. During the last twenty years, many techniques of bacterial characterisation have been developed at each level of information, and more computer facilities are becoming every day available for numerical analysis of data.

Each technique used in taxonomy has (i) its own discriminating power varying from the individual or species levels to the genus, family and higher levels, and (ii) its

field of application, dependent on the addressed question, the particular conditions, the number and the type of strains. The level of discrimination of a technique may vary depending on the studied bacterial taxon. In a polyphasic approach various complementary techniques with different discriminating levels are chosen to characterise the strains to be classified. The conclusion should be a consensus with minimal contradictions, drawing nomenclatural consequences and emphasising fast and reliable features for identification (preferably monophasic). Vandamme et al. [57] last reformulated the phylogenetic concept of the bacterial species as the assemblage of isolates which originated from a common ancestor population in which a steady generation of genetic diversity resulted in clones with different degrees of recombination and characterised by a certain degree of phenotypic consistency, by a significant degree of DNA/DNA hybridisation and by over 97% 16S rDNA sequence homology.

3. CURRENT RHIZOBIUM TAXONOMY

Rhizobia are rod bacteria, Gram-negative, aerobic, not sporulated [29]. Phylogenetically, they belong to the alpha subdivision of *Proteobacteria*. When it was recognised that the host spectrum was not the sole criterium to take into account for rhizobium classification, the *Rhizobium* species were first reclassified into two genera, the revised *Rhizobium* genus including the fast growing strains, and the new genus *Bradyrhizobium*, created for the slow growing ones [28]. Since then, isolation of rhizobia from an increasing number of plant species around the world and their characterisation by modern polyphasic taxonomy [57] has led to the description of additional new genera and species (Tab. I). Based on 16S ribosomal DNA sequences, the symbionts of leguminous plants belong to three main separate phylogenetic branches (Fig. 1).

3.1. *Rhizobium/Agrobacterium* branch

A first branch consists of several subbranches, each corresponding to four rhizobial genera, i.e. *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* and *Allorhizobium*, intermixed with other genera, some plant-related bacteria (*Agrobacterium*, *Phyllobacterium*), soil bacteria (*Mycoplana*), and clinical bacteria (*Brucella*, *Ochrobactrum*, *Bartonella*). The first subbranch corresponds to the s.s. *Rhizobium* genus and includes *R. leguminosarum* (type species), *R. tropici* [37], *R. etli* [50], *R. gallicum* [2], *R. mongolense* [56] and *Agrobacterium* biovar 2. The second subbranch corresponds to the

Taxonomy of rhizobia

571

Table I. Classification of nitrogen fixing bacteria forming symbioses with legume plants.

Species	Host-plant	References
Rhizobium		22
<i>R. leguminosarum</i>		22, 29
biovar viciae	<i>Pisum sativum, Vicia, Lathyrus, Lens</i>	22, 29
biovar trifolii	<i>Trifolium pratense</i>	22, 29
biovar phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i>	22, 29
<i>R. tropici</i>		
Type II A	<i>Phaseolus vulgaris, Leucaena leucocephala</i>	37
Type II B	<i>Phaseolus vulgaris, Leucaena leucocephala</i>	37
<i>R. etli</i>		50
biovar phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i>	24, 50
biovar mimosae	<i>Mimosa affinis, Leucaena leucocephala, Phaseolus vulgaris L.</i>	60
<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium sinuatum & other plants of arid regions</i>	8
<i>R. gallicum</i>		2
biovar gallicum	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2
biovar phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>	56
<i>R. galegae</i>		34
biovar orientalis	<i>Galega orientalis</i>	42
biovar officinalis	<i>Galega officinalis</i>	42
<i>R. giardinii</i>		2
biovar giardinii	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2
biovar phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	59
Mesorhizobium		
<i>M. loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	26
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus, Acacia</i>	6
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	44
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora & other tropical plants</i>	7
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	45
<i>M. plurifarum</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	12
<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	61
Sinorhizobium		5, 13
<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>	10, 13, 29
<i>S. fredii</i>		13, 49
chemovar fredii	<i>Glycine max</i>	49
chemovar siensis	<i>Glycine max</i>	49
<i>S. sahelense</i>	<i>Sesbania spp.</i>	13
biovar acaciae	<i>Acacia spp.</i>	4
biovar sesbaniae	<i>Sesbania spp.</i>	4
<i>S. terangae</i>		13, 55
biovar acaciae	<i>Acacia spp.</i>	36
biovar sesbaniae	<i>Sesbania spp.</i>	36
<i>S. medicae</i>	<i>Medicago</i>	48
<i>S. kostiense</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	43
<i>S. arboris</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	43
Azorhizobium		16
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	16
<i>Azorhizobium sp.</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	47
Bradyrhizobium		28
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max, Glycine soja</i>	29, 30
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	31
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max, Glycine soja</i>	70
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Vigna, Lupinus, Mimosa</i>	28
	<i>Acacia</i>	18
	<i>Aeschynomene</i>	1, 74
Allorhizobium		11
<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	11

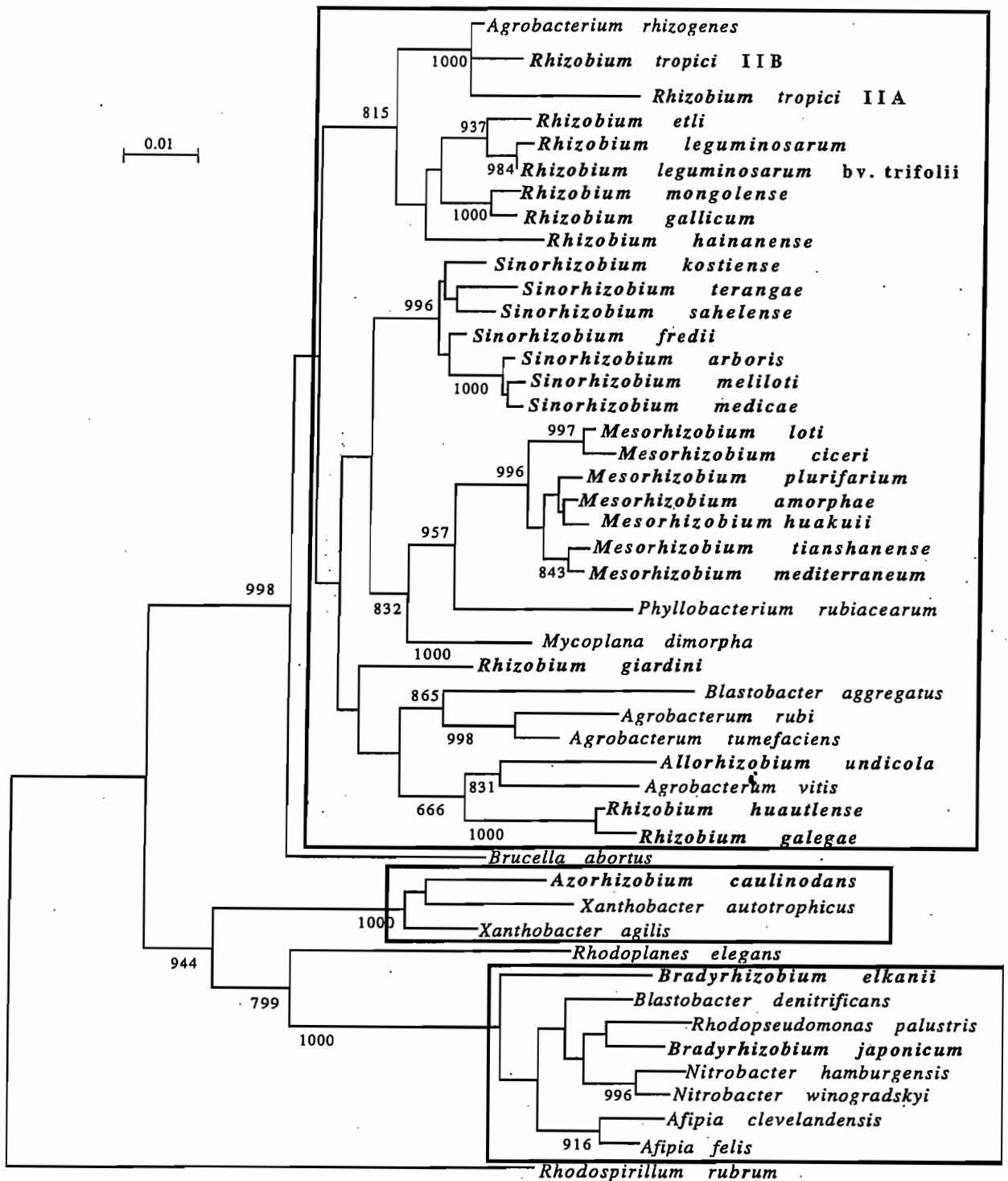


Figure 1. 16S rRNA gene sequence-based phylogenetic relationships among legume-nodulating rhizobial species (indicated in bold). Sequences were aligned using Clustal X software (Blosum matrix). The tree was constructed using the neighbour-joining method (PAUP4.0 software [52]) and rooted on *Rhodospirillum rubrum*. Significant bootstrap probability values, expressed as a percentage of 1000 replications, are given at the branching points.

Sinorhizobium genus and includes the species *S. fredii* and *S. xinjiangensis* [5], *S. meliloti*, *S. teranga* and *S. sahelense* [13, 55], *S. medicae* [48], *S. kostiense* and *S. arboris* [43]. The third subbranch corresponds to the genus *Mesorhizobium* [27] which contains *M. loti* [26], *M. huakuii* [6], *M. ciceri* [44], *M. mediterraneum* [45], *M. tianshanense* [7], *M. plurifarium* [12], *M. amorphae* [61]. The fourth subbranch includes *Agrobacterium* biovar 1, *Agrobacterium rubi*, *Agrobacterium vitis*, but also *R. galegae* [34], *R. giardinii* [2], *R. huautlense* [59] and *Allorhizobium undicola* [11]. Recently Young et al. [72] revisited taxonomic data from the literature. These authors argued that discriminatory phenotypic features to distinguish between these genera were not convincing, and that phylogenetic relationships between genera inferred from comparative 16S rDNA sequence analysis differ depending on the chosen algorithm and most particularly on the selection of included sequences. As a consequence, the authors proposed to group the three genera *Rhizobium*, *Agrobacterium* and *Allorhizobium* in a single emended genus *Rhizobium*, including all species of *Agrobacterium* and *Allorhizobium* as new combinations: *R. radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis* [72].

3.2. *Azorhizobium* branch

The second branch consists of *Azorhizobium caulinodans*, created for the rhizobia isolated from stem nodules of the tropical legume *Sesbania rostrata* [16]. These bacteria appeared to exhibit a number of very special features among rhizobia, like in vitro nitrogen fixation and assimilation for growth under low O₂ partial tension (3%). A second genomic species has been described in *Azorhizobium*, but not named [47]. Phylogenetically, the species of the genera *Azorhizobium*, *Xanthobacter* and *Aquabacter* are so intermixed that their inclusion in a single genus *Xanthobacter* has been examined but not proposed because of their many divergent phenotypic features [46].

3.3. *Bradyrhizobium* branch

The *Bradyrhizobium* genus was described by Jordan [28] to include all the so-called "slow growing" rhizobia, and for a long time, it comprised only one species, *B. japonicum*, including all soybean nodulating strains. However, Hollis et al. [25] had already shown that this group was heterogeneous and represented three DNA:DNA homology groups (I, Ia and II). For the group II, which differ from the species *B. japonicum* by many features, Kuykendall et al. [31] created a new

species, *Bradyrhizobium elkanii*. Other strains, with very slow growth (generation time between 16 and 24 hours), isolated from the nodules of *Glycine max* and *Glycine soya* in China, were given the proposed name *Bradyrhizobium liaoningense* [70].

B. japonicum [29] remains heterogeneous and contains at least two DNA/DNA hybridisation groups, I and Ia, whose representatives are respectively NZP 5549^T and USDA 110 [25]. The *Bradyrhizobium* genus is phylogenetically closer to non-symbiotic bacteria, like *Rhodopseudomonas palustris*, *Afipia*, *Nitrobacter* and *Blastobacter denitrificans*, than to *Rhizobium* and *Agrobacterium* [39, 63, 71]. Moreover, the integrity of the *Bradyrhizobium* genus is questionable since the type strain of *B. japonicum* is phylogenetically closer to *Afipia*, *R. palustris* and *Nitrobacter* than to *B. elkanii* and *Bradyrhizobium* sp. from Senegal and Brazil [3] (Fig. 1). The sequence of the gene coding for 16S rRNA of *B. liaoningense* is very close to that of *B. japonicum* [65]. Thus the taxonomy of the *Bradyrhizobium* genus remains confused. During the last few years, many groups of *Bradyrhizobium* sp. have been identified, and characterised by various phenotypic and genotypic methods, however drawing no taxonomic conclusions concerning their obvious positions in the classification [1, 3, 17, 18, 28, 32, 39, 40, 41, 51, 54, 58, 74], suggesting that the taxonomy of the *Bradyrhizobium* genus is still at a preliminary stage. Polyphasic taxonomy in *Bradyrhizobium* met with the problem that the different phenotypic and phylogenetic data did not lead to a clear consensus [18, 32, 38, 74].

Of special interest, photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strains were described, like strain BTai1 [19], isolated from the stem nodules of *Aeschynomene indica*. It was shown to synthesise a pigment similar to the bacteriochlorophyll a [20, 21]. Since then, several authors have studied and described photosynthetic strains isolated from other species of *Aeschynomene* [32, 33, 35, 51, 69]. All photosynthetic strains form a monophyletic group on the *Bradyrhizobium* branch, separated from *B. japonicum* and *B. elkanii* [39, 69, 74].

In recent years extensive genotypic studies have been performed on 250 *Bradyrhizobium* strains from *Aeschynomene*, *Faidherbia albida* and diverse small legumes in Senegal, using several techniques i.e. 16S rDNA RFLP and sequence analyses, 16S:23S rDNA intergenic gene spacer RFLP and sequence analyses, AFLP, DNA:DNA hybridisations [14, 15, 64, 66, 67]. Several genospecies were evidenced, at least 8 of which were distinct from the three recognised species [67].

4. CONCLUSION

From one genus and 6 species in 1982, taxonomic studies of rhizobia have led to a total of 6 genera and 28 recognised species. This is in constant progress due to progressive study of uninvestigated legumes and areas in the world. Progress in taxonomy is also due to an increasing number of available effective techniques in bacterial characterisation, more and more accessible to an increasing number of laboratories. Only 23% of the total number of legume species (that is between 16.500 and 19.500) have been characterised for their microsymbionts so far. The majority (88%) of these investigated legumes were found to be nodulated. Specifically, tropical rhizobia are still poorly documented compared to what can be expected from the recent data, showing great diversity in China, Brazil, Senegal, Sudan, Morocco. Recently, Sy et al. [53] reported that some rhizobia isolated from *Crotalaria* spp. in Senegal were phylogenetically separated from all recognised rhizobia. They form a new species in the *Methylobacterium* genus, for which the name *M. nodulans* has been proposed. This predicts that several other new groups of legume symbiotic bacteria (genera, species) may emerge in the future.

REFERENCES

- [1] Alazard D., Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp., *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (1985) 732–734.
- [2] Amarger N., Macheret V., Laguerre G., *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (1997) 996–1006.
- [3] Barrera L.L., Trujillo M.E., Goodfellow M., Garcia F.J., Hernandez-Lucas I., Davila G., van Berkum P., Martinez-Romero E., Biodiversity of Bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (1997) 1086–1091.
- [4] Boivin C., Giraud E., Molecular symbiotic characterization of rhizobia: Toward a polyphasic approach using Nod factors and *nod* genes, in: Martínez-Romero E., Hernández G. (Eds.), *Highlights of Nitrogen Fixation Research*, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, 1999, pp. 295–299.
- [5] Chen W.X., Yan G.H., Li J.L., 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 (1988) 392–397.
- [6] Chen W.X., Ly G.S., Qi Y.L., Wang E.T., Yuan H.L., Li J.L., *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 (1991) 275–280.
- [7] Chen W.X., Wang E.T., Wang S.Y., Ly Y.B., Chen X.Q., Li Y., Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an acid saline environment in Xingjian, People's Republic of China, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 (1995) 153–159.
- [8] Chen W.X., Tan Z.Y., Gao J.L., Li Y., Wang E.T., *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (1997) 870–873.
- [9] Colwell R.R., Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species, *J. Bacteriol.* 104 (1970) 410–433.
- [10] Dangeard P.A., Recherches sur les tubercules radicaux des légumineuses, *Le Botaniste*, Series 16, Paris, 1926, 270 p.
- [11] de Lajudie P., Fulele-Laurent E., Willems A., Torck U., Coopman R., Collins M.D., Kersters K., Dreyfus B.L., Gillis M., Description of *Allorhizobium undicola* gen. nov. sp. nov. for nitrogen-fixing bacteria efficiently nodulating *Neptunia natans* in Senegal, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 (1998) 1277–1290.
- [12] de Lajudie P., Willems A., Nick G., Moreira F., Molouba F., Hoste B., Torck U., Neyra M., Collins M.D., Lindström K., Dreyfus B., Gillis M., Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 (1998) 369–382.
- [13] de Lajudie P., Willems A., Pot B., Dewettinck D., Maestrojuan G., Neyra M., Collins M.D., Dreyfus B.L., Kersters K., Gillis M., Polyphasic taxonomy of rhizobia. Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44 (1994) 715–733.
- [14] Doignon-Bourcier F., Sy A., Willems A., Torck U., Dreyfus B., Gillis M., de Lajudie P., Diversity of bradyrhizobia from 27 tropical *Leguminosae* species native of Senegal, *System. Appl. Microbiol.* 22 (1999) 647–661.
- [15] Doignon-Bourcier F., Willems A., Coopman R., Laguerre G., Gillis M., de Lajudie P., Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating small Senegalese legumes by 16S-23S rRNA intergenic gene spacers and amplified fragment length polymorphism fingerprint analyses, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 3987–3997.
- [16] Dreyfus B.L., Garcia J.L., Gillis M., Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38 (1988) 89–98.
- [17] Dupuy N., Dreyfus B.L., *Bradyrhizobium* populations occur in deep soil under the leguminous tree *Acacia albida*, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 2415–2419.
- [18] Dupuy N., Willems A., Pot B., Dewettinck D., Vandenbruaene I., Maestrojuan G., Dreyfus B., Kersters K., Collins M.D., Gillis M., Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44 (1994) 461–473.
- [19] Eaglesham A.R.J., Szalay A.A., Aerial stem nodules on *Aeschynomene* spp., *Plant Sci. Lett.* 29 (1983) 265–272.
- [20] Eaglesham A.R.J., Ellis J.M., Evans W.R., Fleischman D.E., Hungria M., Hardy R.W.F., The first photosynthetic N₂-fixing *Rhizobium*: characteristics, in: Gresshoff P.M., Roth L.E., Stacey G., Newton W.L. (Eds.), *Nitrogen fixation:*

Achievements and Objectives, Chapman and Hall, New York, 1990, pp. 805–811.

- [21] Evans W.R., Fleischman D.E., Calvert H.E., Pyati R.V., Alter G.M., Subba Rao N.S., Bacteriochlorophyll and photosynthetic reaction centers in *Rhizobium* strain BTA11, *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 3445–3449.
- [22] Frank B., Über die Pilzsymbiose der Leguminosen, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 7 (1889) 332–346.
- [23] Grimont P.A.D., La taxonomie bactérienne à la fin du XX^e siècle, *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 13 HS (1998) 3–5.
- [24] Hernandez-Lucas I., Segovia L., Martinez-Romero E., Pueppke S.G., Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L., *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 2775–2779.
- [25] Hollis A.B., Kloos W.E., Elkan G.H., DNA:DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related *Rhizobiaceae*, *J. Gen. Microbiol.* 123 (1981) 215–222.
- [26] Jarvis B.D.W., Pankhurst C.E., Patel J.J., *Rhizobium loti* a new species of legume root nodule bacteria, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32 (1982) 378–380.
- [27] Jarvis B.D.W., Van Berkum P., Chen W.X., Nour S.M., Fernandez M.P., Cleyet-Mare J.-C., Gillis M., Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (1997) 895–898.
- [28] Jordan D.C., 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 (1982) 136–139.
- [29] Jordan D.C., Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938, in: Krieg N.R., Holt J.C., (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 321AL. Vol. 1, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1984, pp. 234–236.
- [30] Kirchner O., Die Wurzelknöllchen der Sojabohne, *Beitr. Biol. Pflanz.* 7 (1896) 213–224.
- [31] Kuykendall L.M., Saxena B., Devine T.E., Udell S.E., Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov., *Can. J. Microbiol.* 38 (1992) 501–503.
- [32] Ladha J.K., So R.B., Numerical taxonomy of photosynthetic rhizobia nodulating *Aeschynomene* species, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44 (1994) 62–73.
- [33] Ladha J.K., Pareek R.P., Becker M., Stem-nodule symbiosis and its unusual properties, in: Gresshoff P.M., Roth L.E., Stacey G., Newton W.L. (Eds.), *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*, Chapman and Hall, New York, 1990, pp. 633–640.
- [34] Lindström K., *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39 (1989) 365–367.
- [35] Lorquin J., Molouba F., Dreyfus B.L., Identification of the carotenoid canthaxanthin from photosynthetic *Bradyrhizobium* strains, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 1151–1154.
- [36] Lortet G., Mear N., Lorquin J., Dreyfus B., de Lajudie P., Rosenberg C., Boivin C., 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*, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9 (1996) 736–747.
- [37] Martinez-Romero E., Segovia L., Martins F., Franco A.A., Graham P., Pardo M.A., *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 (1991) 417–426.
- [38] Molouba A.F., Les *Bradyrhizobium* photostynthétiques des Légumineuses du genre *Aeschynomene* : étude taxonomique, spécificité d'hôte et caractérisation des pigments photosynthétiques, Thèse, spécialité Biologie, Physiologie Cellulaire et Moléculaire Végétale, Université Paris 7 – Denis Diderot, 1997, 241 p.
- [39] Molouba F., Lorquin J., Willems A., Hoste B., Giraud E., Dreyfus B., Gillis M., de Lajudie P., Masson-Boivin C., Photosynthetic bradyrhizobia from *Aeschynomene* spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 3084–3094.
- [40] Moreira F.M.S., Gillis M., Pot B., Kersters K., Franco A.A., Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins, *Syst. Appl. Microbiol.* 16 (1993) 135–146.
- [41] Moreira F.M.S., Haukka K., Young J.P.W., Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil, *Mol. Ecol.* 7 (1998) 889–895.
- [42] Nick G., Polyphasic taxonomy of rhizobia isolated from tropical tree legumes, *Dissertationes Biocentri Viikki Universitatis Helsinkiensis*, Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Finland, 1998.
- [43] Nick G., de Lajudie P., Eardly B.D., Suomalainen S., Paulin L., Zhang X., Gillis M., Lindström K., *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (1999) 1359–1368.
- [44] Nour S.M., Fernandez M.P., Normand P., Cleyet-Marel J.-C., *Rhizobium ciceri* sp. nov. consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.), *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44 (1994) 511–522.
- [45] Nour S.M., Cleyet-Marel J.-C., Normand P., Fernandez M.P., Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 (1995) 640–648.
- [46] Rainey F.A., Wiegel J., 16S ribosomal DNA sequence analysis confirms the close relationship between the genera *Xanthobacter*, *Azorhizobium* and *Aquabacter* and reveals a lack of phylogenetic coherence among *Xanthobacter* species, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46 (1996) 607–610.
- [47] Rinaudo G., Orenza S., Fernandez M., Meugnier H., Bardin R., 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 (1991) 114–120.

- [48] 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 (1996) 972–980.
- [49] Scholla M.H., Elkan G.H., *Rhizobium fredii* sp. nov. a fast growing species that effectively nodulates soybeans, Int. J. Syst. Bacteriol. 34 (1984) 484–486.
- [50] Segovia L., Young J.P.W., Martinez-Romero E., Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov., Int. J. Syst. Bacteriol. 4 (1993) 374–377.
- [51] So R.B., Ladha J.K., Young J.P.W., Photosynthetic symbionts of *Aeschynomene* spp. form a cluster with *Bradyrhizobia* on the basis of fatty acid and rRNA analyses, Int. J. Syst. Bacteriol. 44 (1994) 392–403.
- [52] Swofford D.L., Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4. Sinauer associates, Sunderland, Massachusetts.
- [53] Sy A., Giraud E., Jourand P., Garcia N., Willems A., de Lajudie P., Prin Y., Neyra M., Gillis M., Boivin-Masson C., Dreyfus B., Methylotrrophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes, J. Bacteriol. 183 (2001) 214–220.
- [54] Turk D., Keyser H.H., Rhizobia that nodulate tree legumes: specificity of the host for nodulation and effectiveness, Can. J. Microbiol. 38 (1992) 451–460.
- [55] Trüper H.G., de Clari L., Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) in “apposition”, Int. J. Syst. Bacteriol. 47 (1997) 908–909.
- [56] van Berkum P., Beyene D., Bao G., Campbell T.A., Eardly B.D., *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour], Int. J. Syst. Bacteriol. 48 (1998) 13–22.
- [57] Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., Swings J., Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics, Microbiol. Rev. 60 (1996) 407–438.
- [58] Vinuesa P., Rademaker J.L.W., de Bruijn F.J., Werner D., Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing, Appl. Environ. Microbiol. 64 (1998) 2096–2104.
- [59] Wang E.T., van Berkum P., Beyene D., Sui X.H., Dorado O., Chen W.X., Martinez-Romero E., *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*, Int. J. Syst. Bacteriol. 48 (1998) 687–699.
- [60] Wang E.T., Rogel M.A., Garcia-de los Santos A., Martinez-Romero J., Cevallos M.A., Martinez-Romero E., *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*, Int. J. Syst. Bacteriol. 49 (1999) 1479–1491.
- [61] Wang E.T., van Berkum P., Sui X.H., Beyene D., Chen W.X., Martinez-Romero E., Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov., Int. J. Syst. Bacteriol. 49 (1999) 51–65.
- [62] Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler P., Krichevsky M.I., Moore L.H., Moore W.E.C., Murray R.G.E., Stackebrandt E., Starr M.P., Trüper H.G., Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics, Int. J. Syst. Bacteriol. 37 (1987) 463–464.
- [63] Willems A., Collins M.D., Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S ribosomal RNA gene sequences, Int. J. Syst. Bacteriol. 43 (1993) 305–313.
- [64] Willems A., Doignon-Bourcier F., Coopman R., Hoste B., de Lajudie P., Gillis M., AFLP fingerprint analysis of *Bradyrhizobium* strains isolated from *Faidherbia albida* and *Aeschynomene* species, Syst. Appl. Microbiol. 23 (2000) 137–147.
- [65] Willems A., Coopman R., Gillis M., Phylogenetic analysis and DNA:DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51 (2001) 111–117.
- [66] Willems A., Coopman R., Gillis M., Comparison of sequence analysis of 16S – 23S rDNA spacer regions, AFLP analysis, and DNA-DNA hybridizations in *Bradyrhizobium*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51 (2001) 623–632.
- [67] Willems A., Doignon-Bourcier F., Goris J., Coopman R., de Lajudie P., Gillis M., DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., in press.
- [68] Woese C.R., Bacterial evolution, Microbiol. Rev. 51 (1987) 221–271.
- [69] Wong F.Y.K., Stackebrandt E., Ladha J.K., Fleischman D.E., Date A.R., Fuerst J.A., Phylogenetic analysis of *Bradyrhizobium japonicum* and photosynthetic stem-nodulating bacteria from *Aeschynomene* species grown in separated geographical regions, Appl. Environ. Microbiol. 60 (1994) 940–946.
- [70] Xu L.M., Ge C., Cui Z., Li J., Fan H., *Bradyrhizobium liaoningensis* sp. nov. isolated from the root nodules of soybean, Int. J. Syst. Bacteriol. 45 (1995) 706–711.
- [71] Yanagi M., Yamasato K., Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer, FEMS Microbiol. Lett. 107 (1993) 115–120.
- [72] Young J.M., Kuykendall L.D., Martinez-Romero E., Kerr A., Sawada H., A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51 (2001) 89–103.
- [73] Young J.P.W., Haukka K.E., Diversity and phylogeny of rhizobia, New Phytol. 133 (1996) 87–94.
- [74] Young J.P.W., Downer H.R., Eardly B.D., Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of 16S rRNA gene segment, J. Bacteriol. 173 (1991) 2271–2277.

IV.1) Actualisation de l'article « Taxonomy of Rhizobia »

IV.1.1) Le genre *Sinorhizobium*

Le genre *Ensifer* (Casida, 1982) contenait une seule espèce *E. adhaerens*, qui est une bactérie de sol capable d'adhérer sur d'autres bactéries du sol et de les lyser. Récemment, des isolats de nodules appartenant à l'espèce *E. adhaerens* ont été mis en évidence (Willems *et al.*, 2003). Etant donné que les genre *Ensifer* et *Sinorhizobium* forment un seul groupe dans l'arbre phylogénétique 16S et d'après l'analyse des séquences partielles du gène *recA*, Willems *et al.* (2003) proposent de fusionner le genre *Ensifer* dans le genre *Sinorhizobium*. Certaines souches induisent des nodules inefficients. Par ailleurs, Il faut noter que l'espèce *S. morelense* a été proposée pour des isolats de nodules de *Leucaena leucocephala*. Cette espèce est incapable de former des nodules sur sa plante hôte (Wang *et al.*, 2002).

IV.1.2) Le genre *Methylobacterium*

Le genre *Methylobacterium* a été créé par Patt *et al.* (1976) pour désigner des bactéries méthylotrophes facultatives c'est-à-dire capable de croître sur une unique source monocarbonée. Les travaux de Sy *et al.* (2001) ont montré que certaines bactéries de ce genre pouvaient induire des nodules fixateurs d'azote sur des légumineuses tropicales du genre *Crotalaria*. Ces auteurs ont alors proposé de donner le nom de *Methylobacterium nodulans* à ces bactéries, mais aucune caractérisation officielle incluant des hybridations ADN/ADN n'a été entreprise. Récemment, Jaftha *et al.* (2002) ont mis en évidence des souches méthylotrophes proches phylogénétiquement de *M. nodulans*, pigmentées, symbiotiques de *Lotononis bainesii* (Tribu des Crotalariae). Plus récemment, Jourand *et al.* (soumis) ont caractérisé 72 isolats (y compris la souche de Sy *et al.*, 2001) symbiotiques de 3 espèces de Crotalaires. Ces isolats ne sont pas pigmentés, ils appartiennent au genre *Methylobacterium* et le nom de *M. nodulans* a été proposé.

IV.1.3) Le genre *Blastobacter*

Les espèces du genre *Blastobacter* sont des bactéries d'eau douce qui forment des structures en rosette en s'attachant sur une base commune. L'analyse des séquences de l'ADNr 16S montre que le genre *Blastobacter* appartient à la classe α des protéobactéries. Il a été originellement proposé par Zavarzin (1961). L'auteur a décrit l'espèce type, *B. henricii* à partir d'une observation de cellules d'un lac sans isolement préalable en culture pure. Depuis, plusieurs espèces ont été décrites : *B. aggregatus*, *B. capsulatus*, *B. denitrificans* et *B. notatorius*. Cependant, ce genre est très hétérogène. Ainsi, Hugenholtz *et al.* (1994) ont proposé qu'à l'exception de *B. aggregatus* et *B. capsulatus*, les différentes espèces ne doivent pas appartenir au même genre. En explorant les partenaires symbiotiques d'*Aschynomene indica*, Van Berkum *et al.* (2002) ont trouvé des bactéries très proches de *B. denitrificans* sur la base des séquences de l'ADNr 16S. En effectuant des tests de nodulation de *B. denitrificans* sur *A. indica*, les auteurs ont montré que la souche type de cette espèce pouvait induire des nodules de tige, de branches et de racines, comme les bradyrhizobia isolés de cette plante hôte. Leurs travaux, viennent confirmer que la phylogénie des bactéries nodulant les

légumineuses, est indépendante de leur écologie. Etant donné que *B. denitrificans* a été originellement isolé d'un lac d'eau douce en Allemagne (Hirsch et Müller, 1985) et qu'on ne pouvait pas suspecter des propriétés symbiotiques à cette espèce, l'originalité de l'étude, est de montrer que les techniques moléculaires de la taxonomie peuvent conduire à des espèces peu étudiées pour leur capacité d'induire des nodules car ils appartiennent à une niche écologique différente de celle des BNL connues. *B. denitrificans* est donc une autre bactérie aquatique nodulant les légumineuses, après la description d'*Azorhizobium caulinodans*, *Allorhizobium undicola* et *Bradyrhizobium sp.* photosynthétiques.

IV.1.4) Le genre *Burkholderia*

Ce genre a été créé par Yabuuchi *et al.* (1992). Il comprend des bactéries du sol, rhizosphériques de certaines plantes comme le blé et le maïs (Viallard *et al.*, 1998), ainsi que des bactéries pathogènes pour les plantes et l'homme (Coenye et Vandamme, 2003). Certaines espèces comme *Burkholderia vietnamiensis* (Gillis *et al.*, 1995) et *B. kururiensis* (Zhang *et al.*, 2000) ont été décrites comme fixatrices d'azote (Estrada-de los Santos *et al.*, 2001).

Les bactéries du sol qui forment avec les légumineuses des nodules fixateurs d'azote atmosphérique appartenaient à la classe α des protéobactéries jusqu'à la découverte par Moulin *et al.* (2001) de la capacité à noduler des bactéries de la sous-classe β des protéobactéries du genre *Burkholderia*. Ainsi, *B. tuberum*, *B. phymatum* sont des BNL ; *B. caribensis* et *B. dolosa* peuvent induire des nodules sur des légumineuses mais pour cette dernière espèce, les gènes de nodulation n'ont pas été trouvés (Moulin *et al.*, 2001 ; Vandamme *et al.*, 2002 ; Coenye et Vandamme, 2003). Les bactéries de ce genre auraient acquis un plasmide symbiotique au cours de l'évolution par transfert latéral (Moulin *et al.*, 2001). Cette découverte laisse penser qu'il existe des bactéries appartenant à d'autres branches phylogénétiques que les branches α ou β des protéobactéries, ayant la capacité d'induire des nodules fixateurs d'azote sur les légumineuses.

IV.1.5) Le genre *Ralstonia*

Ce genre appartient à la sous-classe β des protéobactéries. Il a été créé en 1995 par Yabuuchi *et al.* Les auteurs ont ainsi transféré les espèces *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas solanacearum* et *Pseudomonas pickettii* dans le nouveau genre *Ralstonia*. Ce genre contient des espèces pathogènes des plantes comme *R. solanacearum* (Taghavi *et al.*, 1996). Par ailleurs, une collection de souches incluant des isolats en provenance de nodules de racines de *Mimosa pudica* et *M. diplotricha* et un isolat en provenance du tube digestif d'un malade atteint de la mucoviscidose ont fait l'objet d'une caractérisation taxonomique par une étude polyphasique. Les résultats ont montré que ces souches appartenaient au genre *Ralstonia* et formaient au sein de ce genre une espèce nouvelle pour laquelle le nom de *R. taiwanensis* a été proposé (Chen *et al.*, 2001). Cette espèce nodule effectivement *M. pudica* et *M. diplotricha*.

Ainsi, la découverte d'une autre BNL de la sous-classe β des protéobactéries vient une deuxième fois, étayer l'hypothèse que les légumineuses pourraient être nodulées par des

bactéries appartenant à des branches phylogénétiques non encore connues de comporter des bactéries nodulantes.

IV.1.6) Le genre *Devosia*

Le genre *Devosia* (α protéobactéries) a été créé en 1996 (Nakagawa *et al.*, 1996). Ainsi, *Pseudomonas riboflavina* a été reclassifiée dans un nouveau genre nommé *Devosia*. En étudiant des isolats en provenance de nodules de la légumineuse aquatique *Neptunia natans* poussant en Inde, Rivas *et al.* (2002) ont trouvé des bactéries à croissance rapide qui poussent très bien sur un milieu standard pour *Rhizobium*, ils les ont provisoirement baptisées “*Rhizobium neptuniae*”. L’étude taxonomique de ces isolats montraient qu’ils appartenaient au genre *Devosia* et non au genre *Allorhizobium* décrit par de Lajudie (1998). Cette nouvelle espèce a été nommée *Devosia neptuniae* (Rivas *et al.*, 2003). Ainsi, *N. natans* peut établir des symbioses fixatrices d’azote avec des espèces appartenant à plusieurs genres de BNL : *Allorhizobium*, *Mesorhizobium* (de Lajudie *et al.*, 1998a) et *Devosia*.

IV.2) Conclusion

Le terme BNL (Bactéries Nodulant les légumineuses) ou LNB (Legume Nodulating Bacteria) désigne un groupe de bactéries formant des nodules sur des légumineuses méditerranéennes, appartenant aux classes α et β des Protéobactéries. Les BNL sont très proches phylogénétiquement d’autres bactéries qui peuvent être pathogènes pour les plantes ou l’homme mais qui peuvent aussi exercer des effets améliorant la croissance des plantes (*Afipia*, *Agrobacterium*, *Mycoplana*, *Phyllobacterium*, *Ralstonia*, *Burkholderia* cf. l’article « Taxonomy of Rhizobia » du chapitre I). La taxonomie des BNL est en perpétuelle évolution, suite à l’adoption de la taxonomie polyphasique. De nouvelles espèces sont continuellement décrites. Cependant, il existe des groupes de BNL qui sont restés sans aucun nom d’espèce, car il manque toujours des critères pour leur classification. C’est le cas de plusieurs espèces génomiques de *Bradyrhizobium* (Article N°1).

D’autre part, cette taxonomie est loin d’être définitive, car il existe des cas d’incongruence à résoudre, comme le cas de *Rhizobium tropici* Ila et *Rhizobium tropici* I Ib où les séquences de l’ADNr 16S sont différentes pour une même espèce ou de *Rhizobium giardinii* qui occupe une position loin des autres espèces du genre *Rhizobium* (fig.1 de l’article N°1). Ainsi, beaucoup de changements sont à prévoir à l’avenir.

Tableau 2. Bactéries fixatrices d'azote symbiotiques des légumineuses (Phylum des Protéobactéries).

	Plantes hôtes	Références
Classe : α Protéobactéries		
Ordre : Rhizobiales		
Famille : Rhizobiaceae		
Genre : <i>Rhizobium</i>		
<i>R. leguminosarum</i>		Frank, 1889
biovar viciae	<i>Pisum sativum, Vicia, Lathyrus, Lens</i>	Frank, 1889; Jordan, 1984
biovar trifolii	<i>Trifolium pratense</i>	Frank, 1889; Jordan, 1984
biovar phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Frank, 1889; Jordan, 1984
<i>R. tropici</i>		
Type II A	<i>P. vulgaris, Leucaena</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
Type II B	<i>P. vulgaris, Leucaena</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
<i>R. elti</i>	<i>Phaseolus vulgaris, Leucaena</i>	Segovia <i>et al.</i> , 1993; Hernandez-Lucas <i>et al.</i> , 1995
biovar mimosae	<i>Mimosa affinis</i>	Wang <i>et al.</i> , 1999
<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium sinuatum</i> & autres plantes de régions arides	Chen <i>et al.</i> , 1997
<i>R. gallicum</i>		Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar gallicum	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>	Van Berkum <i>et al.</i> , 1998
<i>R. galegae</i>		Lindström, 1989
biovar orientalis	<i>Galega orientalis</i>	Radeva <i>et al.</i> , 2001
biovar officinalis	<i>Galega officinalis</i>	Radeva <i>et al.</i> , 2001
<i>R. giardinii</i>		Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar giardinii	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997
biovar phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	Wang <i>et al.</i> , 1998
<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera</i>	Wei <i>et al.</i> , 2002
<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum coronarium</i>	Squartini <i>et al.</i> , 2002
<i>R. yanglingense</i>	<i>Coronilla, Amphicarpaea, Gueldenstaedtia</i>	Tan <i>et al.</i> , 2001
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus sp</i> <i>Lespedeza sp</i>	Wei <i>et al.</i> , 2003
Genre : <i>Allorhizobium</i>		
<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998b de Lajudie <i>et al.</i> , 1998b
Genre : <i>Sinorhizobium</i>		
<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>	Chen <i>et al.</i> , 1988; de Lajudie <i>et al.</i> , 1994 Dangeard, 1926; Jordan, 1984; de Lajudie <i>et al.</i> , 1994 Bâ <i>et al.</i> , 2002
biovar acaciae		Bâ <i>et al.</i> , 2002
<i>S. fredii</i>		Scholla et Elkan, 1984; de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
chemovar fredii	<i>Glycine max</i>	Scholla et Elkan, 1984
chemovar siensis	<i>Glycine max</i>	Scholla et Elkan, 1984
<i>S. saheli</i>	<i>Sesbania spp.</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
biovar acaciae	<i>Acacia spp.</i>	Boivin et Giraud, 1999
biovar sesbaniae	<i>Sesbania spp.</i>	Boivin et Giraud, 1999
<i>S. terangae</i>		de Lajudie <i>et al.</i> , 1994; Trüper et de Clari, 1997
biovar acaciae	<i>Acacia spp.</i>	Lortet <i>et al.</i> , 1996
biovar sesbaniae	<i>Sesbania spp.</i>	Lortet <i>et al.</i> , 1996
<i>S. medicae</i>	<i>Medicago spp.</i>	Rome <i>et al.</i> , 1996
<i>S. kostiense</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	Nick <i>et al.</i> , 1999
<i>S. morelense</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	Wang <i>et al.</i> , 2002
<i>S. arboris</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	Nick <i>et al.</i> , 1999
<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Wei <i>et al.</i> , 2002

Tableau 2, suite

<i>S. adhaerens</i>	<i>Sesbania, Medicago</i>	Casida, 1982 ; Willems <i>et al.</i> , 2003
<i>S. xinjiangense</i>	<i>Glycine max (Soybean)</i>	Peng <i>et al.</i> , 2002
<i>S. americanum</i>	<i>Acacia sp.</i>	Toledo <i>et al.</i> , 2003
Famille : Bradyrhizobiaceae		
Genre : Bradyrhizobium		
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max, Glycine soja</i>	Jordan, 1982
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	Kirchner, 1896; Jordan, 1984
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max, Glycine soja</i>	Kuykendall <i>et al.</i> , 1992
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza spp.</i>	Xu <i>et al.</i> , 1995
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Vigna, Lupinus, Mimosa</i>	Yao <i>et al.</i> , 2002
	<i>Acacia</i>	Jordan, 1982
	<i>Aeschynomene</i>	Dupuy <i>et al.</i> , 1994
		Alazard, 1985; Young <i>et al.</i> , 1991
Genre : Blastobacter		
<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene</i>	Van Berkum et Eardly, 2002
Famille : Hyphomicrobiaceae		
Genre : Azorhizobium		
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
<i>Azorhizobium sp.</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
		Rinaudo <i>et al.</i> , 1991
Genre : Devosia		
<i>Devosia neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>	Rivas. <i>et al.</i> , 2002
Famille : Methylobacteriaceae		
Genre : Methylobacterium		
<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria spp.</i>	Sy <i>et al.</i> , 2001
Famille : Phyllobacteriaceae		
Genre : Mesorhizobium		
<i>M. loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	Jarvis <i>et al.</i> , 1982
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus, Acacia spp.</i>	Chen <i>et al.</i> , 1991
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1994
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora & autres plantes tropicales</i>	Chen <i>et al.</i> , 1995
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1995
<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998a
<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang <i>et al.</i> , 1999
Classe : β Protéobactéries		
Ordre : Burkholderiales		
Famille : Burkholderiaceae		
Genre : Burkholderia		
<i>Burkholderia sp.</i>	<i>Machaerium lunatum</i>	Moulin <i>et al.</i> , 2001
<i>B. caribensis</i>	<i>Mimosa diplotricha</i>	Vandamme <i>et al.</i> , 2002
<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalathus carnosa</i>	Vandamme <i>et al.</i> , 2002
<i>B. phymatum</i>	<i>Machaerium lunatum</i>	Vandamme <i>et al.</i> , 2002
Genre : Ralstonia		
<i>R. taiwanensis</i>	<i>Mimosa spp.</i>	Chen <i>et al.</i> , 2001

2^{ème} Partie :

Le milieu méditerranéen, caractéristiques écologiques et aperçu sur les légumineuses locales

I) Conditions climatiques des pays méditerranéens

Les arrières pays du bassin méditerranéen (en particulier les pays situés au sud et à l'est de la Méditerranée) sont caractérisés par des étés chauds et secs et des hivers pluvieux et froids (Chatterton et Chatterton, 1984). Cependant, les hivers peuvent varier de froids à chaud ou même très chauds (Le Houerou, 1989). Les températures et les précipitations moyennes varient d'une région à une autre au sein des pays méditerranéens (voir fig. 5) (Saxena, 1990). A part les bandes côtières, ces régions sont considérées comme semi-arides ou arides. En effet, la pluviométrie moyenne dans les régions semi-arides est comprise entre 300 et 600 mm / an, alors qu'elle ne dépasse pas 150 mm / an dans les zones arides (Le Houérou, 1989).

II) Définition de l'aridité

Pour définir l'aridité, nous retenons ces éléments donnés par Emberger:

“ chacun des grands types de climats qui se partagent le globe existe sous différentes formes ou variétés dont l'une est plus ou moins aride : le climat méditerranéen, le climat tropical et le climat océanique de E. de MARTONNE sont polymorphes et leurs variétés très arides en sont les formes extrêmes ”. (Emberger, 1938)

“ l'aridité correspond à un climat à pluviosité faible, combinée avec une forte évaporation. Emberger distingue l'aridité des zones désertiques où le climat est caractérisé par des “ précipitations sans rythme saisonnier et par de longues périodes, dépassant au moins une année, sans pluie résultant des températures élevées dont l'action desséchante est plus ou moins accentuée par le vent ” (Emberger, 1939).

L'aridité peut être accentuée par les effets anthropiques ou animalier mais il est clair qu'elle est essentiellement déterminée par les conditions climatiques (Floret et Pontanier, 1982).

Zone aride en Tunisie

Les régions arides de la Tunisie ont fait l'objet d'étude au niveau climatique et floristique (Le Houérou, 1959 ; 1969 ; Floret et Pontanier, 1982). L'étage aride en Tunisie correspond au sud-Tunisien. On l'appelle aussi la Tunisie pré-saharienne. Cette dernière s'étend sur une surface de 30 000 km². La Tunisie pré-saharienne est bordée au nord par les Djebel Bou Hedma, Orbata et Ben Youness, au Sud-Ouest par le contact entre les Dahars et le Grand Erg Oriental, et au Sud-Est, par une ligne allant de Ksar Rhilane à Dehibat. L'étage aride tunisien est divisé en étage aride supérieur et étage aride inférieur. Notre travail concerne l'étage aride inférieur

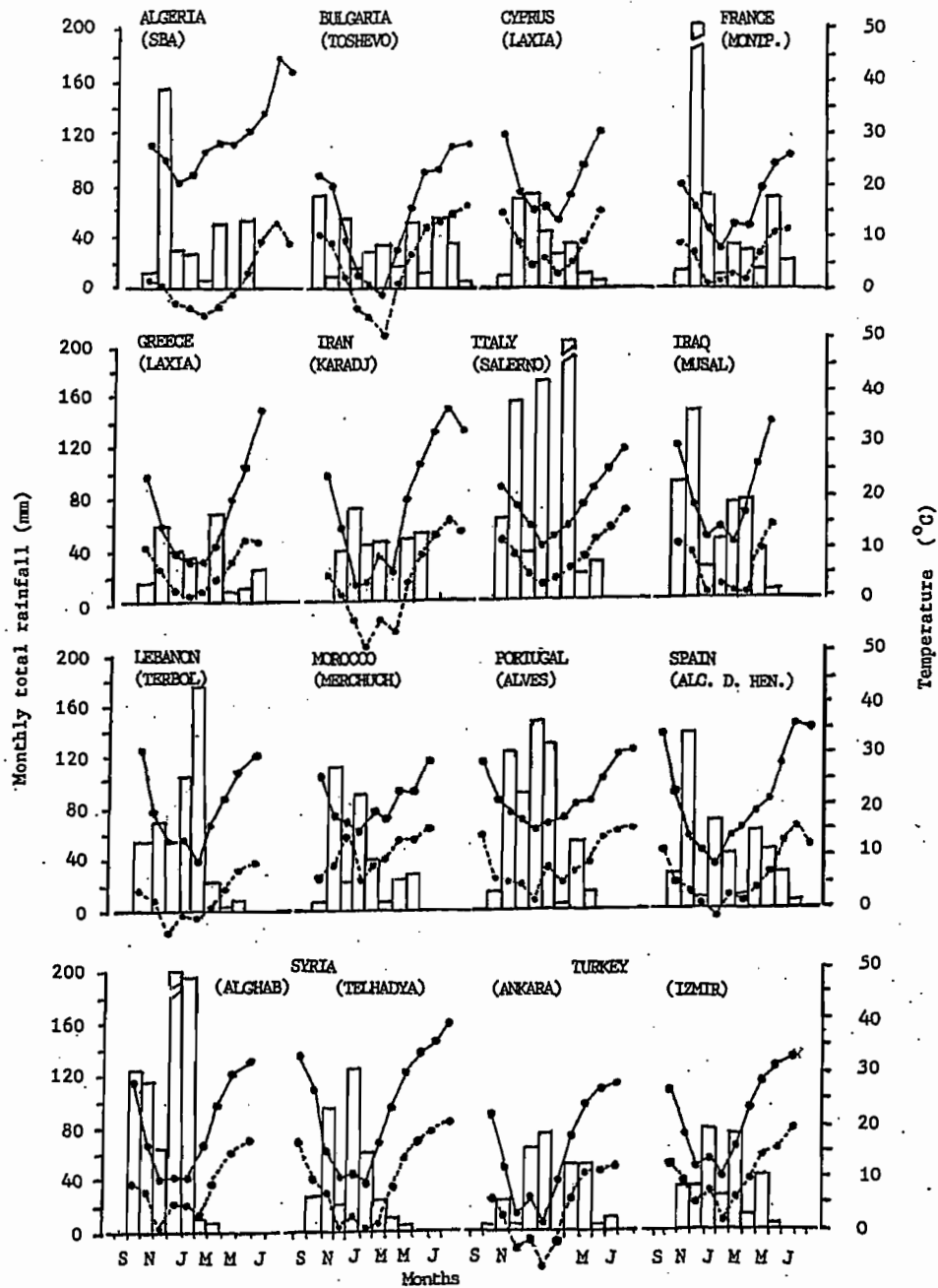


Fig. 5 Moyennes mensuelles minimales et maximales de températures (courbes) et précipitations mensuelles totales (histogrammes) au cours des années 1984 – 1985 dans des sites variés du bassin méditerranéen. (d'après Saxena, 1990).

Le régime thermique de la Tunisie pré-saharienne présente de fortes amplitudes diurnes, mensuelles et annuelles. Il est caractérisé par des hivers tempérés à doux et des étés chauds à très chauds. Entre les mois de mai et de septembre, la sécheresse est quasi absolue.

Des vents très violents, secs et froids, accompagnés de tempêtes de sable qui endommagent gravement les cultures et la pousse des espèces annuelles dans les pâturages ; ont lieu de novembre à avril. De mai à octobre, les vents de secteur marin dominant dans les zones côtières, mais n'ont qu'une influence très limitée dans la zone continentale où se trouve, en général, la limite du front chaud saharien. La période estivale est aussi celle du sirocco, masse d'air très chaud et sec venant du Sahara, caractérisée par une brusque montée des températures (10 à 15°C en 1 ou 2 heures) et un abaissement de l'humidité relative de l'air ($H < 10 \%$).

III) Place des légumineuses dans la flore de Tunisie

Sur le plan strictement floristique, les légumineuses constituent en Tunisie la seconde famille (après les composées) en nombre de taxons. Les légumineuses en Tunisie représentent 40 genres et 232 espèces (Le Floch et Grossmann, 1998).

Les diverses espèces ligneuses ne constituent que 12 % des légumineuses tunisiennes ; les herbacées représentent 88 % dont la grande majorité sont des espèces annuelles. Les espèces pérennes constituent 33 % des légumineuses en Tunisie. Les zones arides et sahariennes se distinguent de l'ensemble de la Tunisie, par une abondance relative des espèces pérennes (41 %). Pour l'ensemble de la Tunisie, 65,4 % des espèces légumineuses sont présentes sous bioclimat semi-aride. Ce pourcentage régresse, relativement peu vers les bioclimats plus arrosés, ainsi 46 % des légumineuses sont présentes sous bioclimat humide. D'autre part, la régression est plus accentuée vers l'aridité croissante et seuls 2,7 % des légumineuses de la flore tunisienne sont présents sous bioclimat saharien inférieur.

IV) Caractéristiques du climat du Liban et bref aperçu sur la végétation

Au Liban règne le climat méditerranéen. Ce dernier présente beaucoup de nuances climatiques dues aux reliefs, à savoir : deux chaînes montagneuse, le Mont-Liban et l'Anti-Liban, séparées par la vallée de la Békaa.

Trois catégories de masses d'air sont présentes: 1) Les masses d'air maritimes, se déplaçant surtout d'Ouest en Est, provoquent la majeure partie des précipitations. 2) Les masses d'air continentales, froides et sèches qui empruntent le couloir Homs-Tripoli et la vallée de l'Oronte provoquent la neige en haute montagne quand elles rencontrent les masses d'air précédentes. Elles sont aussi un facteur essentiel de la gelée. 3) Les masses d'air désertique (appelées localement le « Khamsine »), en provenance le plus souvent d'Afrique ou d'Arabie, soufflent au printemps du Sud et du Sud-Est apportant les sables du désert (Site Internet du ministère de l'Agriculture Libanaise).

En ce qui concerne les précipitations, elles sont de l'ordre de 700 à 900 mm sur la côte et atteignent les 2000 mm en haute montagne (sous forme de neige). Les précipitations diminuent dans l'intérieur du pays, notamment dans la plaine de la Békaa (Au Békaa-nord, les précipitations annuelles ne dépassent pas les 250 mm).

Quant aux températures, elles présentent un régime côtier (moyenne annuelle de 20°C), un régime montagnard (avec un gradient thermique de 0,6°C par 100 m d'élévation) et un régime continental, vers l'intérieur du pays, à grande amplitude thermique.

L'ensemble de ces facteurs détermine une série d'écosystèmes : aride, semi-aride, subhumide et humide.

En ce qui concerne la végétation, il n'existe pas de données fiables sur le nombre et la densité des espèces de plantes (Hamzé *et al.*, 2003). Les séries de végétation qui se développent dans les différents étages bioclimatiques du Liban ont été étudiées (Dereix *et al.*, 1999). Pour les études au niveau floristique, on se réfère actuellement à la Flore du Liban et de la Syrie (Mouterde, 1970). Par ailleurs, certaines plantes de la famille des Leguminosae (Fabaceae) ont été étudiées par l'ICARDA (International Center For Agricultural Research Of Dry Areas).

V) Rôle des légumineuses spontanées en Méditerranée

Les plantes de la famille des légumineuses sont une composante principale de tous les habitats du bassin méditerranéen. C'est là en effet où il y a la plus grande concentration en nombre d'espèces de légumineuses. On compte 91 genres et 1956 espèces. Ainsi, la Méditerranée est le centre de diversité pour les espèces de légumineuses (Maxted and Bennett, 2001a)

Les légumineuses spontanées jouent plusieurs rôles (Lemordant *et al.*, 1977 ; Boulos, 1983 ; Le Floch, 1983 ; Boukef, 1986 ; Wickens *et al.*, 1996). Elles jouent un rôle dans les usages médicaux traditionnels des populations rurales (*Ceratonia siliqua...*), dans l'alimentation humaine (*Ceratonia siliqua*, *Lathyrus ochrus*, *Vicia sativa*, etc.). Leur rôle majeur est dans le fourrage. Cependant certaines de ces espèces peuvent présenter une toxicité reconnue ou présumée (*Anhyllis henoniana*, *Cystisus villosus*, etc.) du moins durant une période de leur cycle de développement. Maxted et Bennett (2001b) présentent dans leur revue sur les légumineuses en Méditerranée, une liste des espèces ayant une importance économique (fourragère ou alimentaire pour l'homme). On y trouve plusieurs espèces cultivées des genres *Cicer*, *Lupinus*, *Hedysarum*, *Medicago*, *Melilotus*, *Onobrychis*, *Vicia* mais aussi d'autres espèces spontanées des genres : *Coronilla*, *Scorpiurus*, *Astragalus*, *Biserrula*, *Ebenus*, *Anhyllis*, *Ononis*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Lathyrus*. Beaucoup de ces plantes ont fait l'objet de nos investigations en Tunisie et au Liban (Tableau 1 du chapitre II).

CHAPITRE II
MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

I) Espèces végétales

Les légumineuses étudiées sont présentées dans le tableau 1 de ce chapitre.

II) Souches bactériennes :

Les souches étudiées dans ce travail ainsi que les plantes hôtes correspondantes sont répertoriées dans les tableaux N°1 des chapitres 3 et 4. Notre matériel d'étude est constitué de deux collections de souches : 100 isolats de nodules racinaires en provenance de l'étage aride inférieur de la Tunisie (pluviométrie moyenne annuelle de 180 mm) et 60 isolats de nodules racinaires de plusieurs sites du Liban ayant des précipitations qui varient de 600 mm (Terbol, Békaa) à 1396 mm (Qartaba).

III) Milieux de culture

III.1) Milieux de culture des bactéries

a) Milieu YMA (Vincent, 1970)

Utilisé pour la culture courante des souches de BNL, et pour l'obtention de cellules en vue d'une préparation d'ADN. Par litre : mannitol : 10 g ; glutamate de sodium : 0,5 g ; K_2HPO_4 : 0,5 g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,2 g ; NaCl : 0,05 g ; $CaCl_2$: 0,04 g ; $FeCl_3$: 0,004 g ; extrait de levure : 1 g ; agar : 20 g.

Le pH du milieu est ajusté à 6,8. Le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 20 min à 120°C.

b) Milieu TY tamponné (Beringer, 1974)

Dans l'étude SDS-PAGE, les souches de BNL sont cultivées sur milieu TY tamponné (Beringer, 1974) pour l'extraction des protéines totales. Il contient par litre : tryptone (oxid) : 5 g ; extrait de levure (oxid) : 0,75 g ; KH_2PO_4 : 0,454 g ; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$: 2,388 g ; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (13,4 g / 100 mL) : 5 mL (ou $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ à 20g /100ml : 5 mL); Le pH est ajusté à 6,8 – 7,0. agar LabM : 20 g.

b) Milieu E' (Bertrand *et al.*, 2000)

Ce milieu est utilisé pour la culture des souches de *Phyllobacterium*.

Par litre : extrait de levure : 3 g, Mannitol : 10 g, $FeCl_3$: 1 mL (solution 4,7 g / L), Macro-éléments : 100 mL de solution 10 X*. H_2O , qsp 1L. Ajuster le pH à 6,8. Autoclaver 20 min à 120°C.

Solution des macro-éléments 10 X : Par litre : K_2HPO_4 : 5 g, $MgSO_4(H_2O)_7$: 2 g, NaCl : 1 g, KNO_3 : 8 g, $CaCl_2(H_2O)_2$: 0,5 g.

Tableau 1. Plantes étudiées dans cette thèse. Origine géographique et biologie.

Genre	Espèce	Origine géographique	Biologie*
<i>Acacia</i>	<i>A. tortilis subsp raddiana</i>	Tunisie (zones arides)	Pérenne
<i>Anthyllis</i>	<i>A. henoniana</i>	Tunisie (zones arides)	Pérenne
<i>Argyrolobium</i>	<i>A. uniflorum</i>	Tunisie (zones arides)	Pérenne
<i>Astragalus</i>	<i>A. algerianus</i>	Tunisie (zones arides)	Pérenne
	<i>A. armatus</i>	Tunisie (zones arides)	Pérenne
	<i>A. cruciatus</i>	Tunisie (zones arides)	Annuelle
	<i>A. gombiformis</i>	Tunisie (zones arides)	Pérenne
	<i>A. hamosus</i>	Liban, Terbol – Central Bekaa	Annuelle
	<i>Astragalus sp.</i>	Tunisie (zones arides)	-
<i>Biserrula</i>	<i>B. pelecinus</i>	Liban, Shware Meshane - Jbeil	Annuelle
<i>Calycotome</i>	<i>C. villosa</i>	Tunisie (zones arides)	Pérenne
<i>Coronilla</i>	<i>C. scorpioïdes</i>	Tunisie (zones arides)	Annuelle
<i>Ebenus</i>	<i>E. pinnata</i>	Tunisie (zones arides)	Pérenne
<i>Genista</i>	<i>G. microcephala</i>	Tunisie (zones arides)	Pérenne
<i>Hedysarum</i>	<i>H. carnosum</i>	Tunisie (zones arides)	Annuelle
<i>Hippocrepis</i>	<i>H. bicontorta</i>	Tunisie (zones arides)	Annuelle
<i>Lathyrus</i>	<i>L. aphaca</i>	Liban, El Machnaqua ; Koukdane ; Nahr Ibrahim (Jbeil)	Annuelle
	<i>L. numidicus</i>	Tunisie (zones arides)	Annuelle
	<i>Lathyrus sp</i>	Liban, Koukdane – Jbeil	-
	<i>Lathyrus sp</i>	Liban, Nahr Ibrahim	-
<i>Lotus</i>	<i>L. argenteus</i>	Tunisie (zones arides)	Pérenne
	<i>L. creticus</i>	Tunisie (zones arides)	Pérenne
	<i>L. ornithopodioides</i>	Liban, Antelias quarry (Metn) ; Ed Dabshe (Jbeil)	Annuelle
	<i>L. roudairei</i>	Tunisie (zones arides)	Pérenne
	<i>Lotus sp</i>	Liban, Nahr Ibrahim	-
	<i>Lotus sp</i>	Liban, Halate - Jbeil	-
<i>Lupinus</i>	<i>L. pilosus</i>	Liban, Dhour Adonis - Jbeil	Annuelle
<i>Medicago</i>	<i>M. coronata</i>	Liban, Es Sare – Jbeil	Annuelle
	<i>M. marina</i>	Tunisie (zones arides)	Pérenne
	<i>M. minima</i>	Liban, Antelias quarry - Metn	Annuelle
	<i>M. orbicularis</i>	Liban, Halate – Jbeil	Annuelle
	<i>M. rugosa</i>	Liban, Koukdane – Jbeil	Annuelle
	<i>M. sativa</i>	Tunisie (zones arides) ; Liban, El Machnaqua (Jbeil)	Pérenne
	<i>M. truncatula</i>	Tunisie (zones arides)	Annuelle
<i>Melilotus</i>	<i>Melilotus sp</i>	Liban, Halate - Jbeil	-
<i>Onobrychis</i>	<i>Onobrychis crista-galli</i>	Liban, Halate – Jbeil	Pérenne
<i>Ononis</i>	<i>O. natrix subsp.falcata</i>	Tunisie (zones arides)	Pérenne
	<i>O. natrix subsp filifolia</i>	Tunisie (zones arides)	Pérenne
	<i>O. vaginalis</i>	Tunisie (zones arides)	Pérenne
<i>Retama</i>	<i>R. raetam</i>	Tunisie (zones arides)	Pérenne
<i>Scorpiurus</i>	<i>S. subvillosus</i>	Liban, Maayane – Jbeil	Annuelle
	<i>S. sulcatus</i>	Liban, Dhour Adonis – Jbeil	Annuelle

Tableau 1. suite

<i>Spartium</i>	<i>S. junceum</i>	Liban, Kortada quarry - Metn	Pérenne
<i>Trifolium</i>	<i>T. angustifolium</i>	Liban, Koukdane – Jbeil	Annuelle
	<i>T. clypeatum</i>	Liban, Antelias quarry (Metn) ; El Machnaqua ; El Oweynate (Jbeil)	Annuelle
	<i>T. nigrescens</i>	Liban, Koukdane ; Nahr Ibahim (Jbeil)	Annuelle
	<i>T. repens</i>	Liban, Nahr Ibrahim	Pérenne
	<i>Trifolium sp</i>	Liban, Koukdane - Jbeil	-
	<i>Trifolium sp</i>	Liban, Nahr Ibrahim	-
	<i>T. subterraneum</i>	Liban, Terbol – Central Bekaa	Annuelle
<i>Trigonella</i>	<i>T. foenum graecum</i>	Liban, Koukdane - Jbeil	Annuelle
	<i>T. monspeliaca</i>	Chlifa – Northern Bekaa	Annuelle
	<i>Trigonella sp</i>	Liban, Nahr Ibrahim	-
<i>Vicia</i>	<i>V. amphicarpa</i>	Liban, Chlifa – Northern Bekaa	Annuelle
	<i>V. hybrida</i>	Liban, Halate ; Koukdane (Jbeil)	Annuelle

* Pour plus d'information, consulter le site de « International Legume Database & Information service » sur le site internet <http://www.ildis.org/LegumeWeb/>

III.2) Milieux de culture des plantes :

a) Milieu Campbell (pour la germination des graines)

Par litre : K_2HPO_4 : 0,5 g ; $MgSO_4$: 0,2 g ; NaCl : 0,1 g ; Mannitol : 10 g ; extrait de levure : 2,5 g ; casamino acides : 0,5 g. Le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 20 min à 120°C.

b) Milieu Jensen (Vincent, 1970) :

Par litre : 10 mL de solution P (K_2HPO_4 à 20 g / L ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ à 20 g / L) ; 10 mL de solution Q (NaCl 20 g / L) ; 20 mL de solution R ($CaHPO_4$ à 50 g / L) ; 10 mL de solution D ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$ à 4 g / L) ; 1 mL d'oligo-éléments de Jensen* ; agar : 20 g / L.

* 1 Litre de solution d'oligo-éléments de Jensen contient H_3BO_3 : 2,86 g ; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$: 2,03 g ; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,22 g ; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 0,08 g ; $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$: 0,09 g. Le pH du milieu est ajusté à 6,7. Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

c) Milieu de culture pour légumineuses méditerranéennes (Bertrand, 1997)

Dans un litre de solution : 1 mL de KH_2PO_4 (solution à 13,609 g / L), 1 mL de KCl (solution à 223,65 g / L), 1 mL de $CaCl_2 \cdot (H_2O)_2$, (solution à 294,04 g / L), 1 mL de $MgSO_4 \cdot (H_2O)_7$ (solution à 246,48 g / L). 0,04 mL d'une solution de microéléments (Cette solution contient : H_3BrO_3 (6,25 g / L) $MnSO_4(H_2O)$ (25 g / L), $ZnSO_4(H_2O)_7$: (6,25 g / L), $CuSO_4 \cdot (H_2O)_5$ (6,25 g / L), $Na_2MoO_4 \cdot (H_2O)_2$ (0,625 g / L).

1 mL de séquestrène de fer (solution à 16,6 g / L). 1 mL de $Ca(NO_3)_2$ (82 g / L).

Ajouter du $CaCO_3$: 1g / L. Ajuster le pH à 7. Ajouter de l'agar : 20 g / L. Le milieu est stérilisé pendant 20 minutes à 120°C.

IV) Isolement de bactéries à partir de nodules

IV.1) Isolement des bactéries

Les nodules récoltés à partir de racines ont été conservés secs dans des tubes contenant du gel de silice ou du CaCl_2 (DATE, 1982) surmonté de coton cardé. Au laboratoire, les nodules sont réhydratés avec de l'eau distillée stérile (pendant une demi-heure) dans des tubes eppendorf. Après avoir éliminé l'eau, les nodules sont stérilisés par immersion dans de l'hypochlorite de Calcium à 3 % (m/V) pendant 3 min. Ensuite, ils sont rincés 10 fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer toute trace d'hypochlorite de Calcium. Les nodules sont ensuite écrasés dans les tubes eppendorf stériles (dans deux gouttes d'eau stérile) à l'aide d'un bâton stérile en plastique et une goutte du broyat obtenu est étalée à l'aide d'une öse sur milieu YMA en boîte de Petri (Vincent, 1970). La purification des colonies se fait en les repiquant de nouveau sur du milieu YMA jusqu'à obtention de colonies pures.

IV.2) Vérification de la pureté des souches :

IV.2.1) Vérification de la pureté des souches par repiquage et microscopie

La pureté des souches est vérifiée par isolement et épuisement sur milieu YMA jusqu'à obtention de colonies isolées. Elle est faite aussi au microscope en observant des préparations de cultures entre lame et lamelle.

IV.2.2) Vérification de la pureté des souches par Coloration Gram

La coloration Gram différencie les bactéries en deux groupes, celles qui retiennent la première coloration (bactéries Gram-positives) et celles qui perdent la première coloration et qui prennent la couleur de la contre-coloration (gram-négatives).

Tout microorganisme qui donne une coloration gram-positive est placé dans le groupe des gram-positifs même si au cours d'un stade de son développement il donne une coloration Gram-négative (Bartholomew, 1981). Au cours de la coloration Gram, on utilise 4 réactifs : un colorant pour la première coloration, l'iodure de potassium, un décolorant, et un contre-colorant.

La paroi des bactéries Gram-positifs se distingue de celle des Gram-négatifs par la présence de l'acide muramique.

Les étapes du protocole sont précisées par le fournisseur (Biomerieux): Les cellules sont fixées à la flamme. Ensuite le violet de Genciane est ajouté (20 sec). Les bactéries se colorent alors en violet. Le colorant est par la suite fixé à l'aide du lugol (iodure de potassium KI). La préparation est abondamment rincée à l'eau du robinet afin d'évacuer l'excès de colorant. La préparation est décolorée (l'éthanol 95°, 5 sec) et rincée de nouveau abondamment à l'eau du robinet. Puis, une recoloration avec de la fuschine acide est réalisée (30 sec). De nouveau, la préparation est rincée à l'eau et sécher à température ambiante. L'observation microscopique permet de voir si les cellules sont colorées en violet (Gram-positives) ou bien en rose (Gram-négative).

V) Tests de nodulation :

V.1) Stérilisation et germination des graines

Les plantes utilisées pour les tests de nodulation ainsi que les conditions de germination des graines sont présentées dans le tableau 2.

V.2) Culture des plantes

V.2.1) Culture en tubes Gibson

Des tubes sont remplis avec du milieu Jensen (25 mL par tube). L'ensemble est ensuite stérilisé par autoclavage pendant 20 min à 120°C. Les tubes sont ensuite disposés en position inclinée le temps que la gélose se fige en pente. Les tubes sont par la suite remplis de l'eau stérile ou de milieu liquide (Bertrand 1997) (60 mL par tube).

Les plantes cultivées en tubes Gibson ont été placées dans des conditions de lumière continue (20 W / m²) à 28°C. Les plantes cultivées dans des pots ont été placées en chambre de culture avec un rythme nictéméral de 16 h de jour à 22°C et 8 h à l'obscurité à 18°C.

V.2.2) Culture en pots

Les plantes qui poussaient mal dans les tubes Gibson ont été cultivées en pots.

Des pots sont lavés à l'eau de Javel et séchés. Des bocaux en verre sont stérilisés. Les plantes sont cultivées alors dans les pots contenant de l'attapulgite mélangé avec du CaCO₃ à raison de 20 % (stérile). Les pots sont placés dans les bocaux en verre remplis de solution nutritive pour légumineuses (Bertrand, 1997). Les plantes sont arrosées régulièrement avec de l'eau stérile.

V.3) Inoculation des plantes

Les plantes sont inoculées 48 heures après la mise en tube ou en pot avec 1 mL (parfois 200 µL) de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance.

Tableau 2 .Conditions pour la stérilisation et la germination des graines. Après stérilisation et avant scarification ou gonflage à l'eau, les graines sont rincées 7 fois minimum avec de l'eau stérile.

Graine	stérilisation	Scarification	Gonflage à des graines**	Pré-germination	Délai avant transfert sur tubes Gibson ou sur pot	Milieu liquide
<i>Macroptilium atropurpureum</i> ^T	H ₂ SO ₄ *, 20 min	-	Une nuit, 4°C	Milieu Campbell, Chambre noire, 22°C	2 jours	Eau stérile
<i>Retama raetam</i> ^T	H ₂ SO ₄ *, 15 min	-	Une nuit, 4°C	Milieu Campbell, Chambre noire, 22°C	3 jours minimum	Eau stérile
<i>Galega orientalis</i> ^T <i>Galega officinalis</i> ^T	} Hypochlorite de Ca***, 5 min	+ (aiguille flambée à incandescence)	Une nuit ou 2 à 4°C	Milieu Campbell, Chambre noire, 22°C	2 jours	Milieu Bertrand (1997) pour les tubes Arrosage des pots avec milieu Bertrand (1997)
<i>Lotus creticus</i> ^P						
<i>Astragalus armatus</i> ^P						
<i>Ononis natrix subsp falcata</i> ^{P,S} <i>Argyrobium uniflorum</i> ^T						

*concentré à 96%

** Eau stérile

***Poudre à 70%, solution à 30 g / L

-, pas de scarification ; +, scarification

T, test en tubes ; P, tests en pots ; S, test en sachets.

VI) Analyse des protéines cellulaires totales par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (Sodium Dodécyl Sulfate)

VI.1) Principe

Voir III.1.2.6 du chapitre I

VI.2) Protocole

VI.2.1) Culture des bactéries

Le milieu de culture doit être identique et doit optimiser la croissance bactérienne pour toutes les souches bactériennes à comparer : il doit être riche et tamponné, afin que le pH de celui-ci reste constant pendant la croissance bactérienne. La constance de la qualité et de la marque des produits est primordiale pour la reproductibilité de la technique. Il est important de contrôler celle-ci en recultivant quelques souches bactériennes pour comparer leurs profils électrophorétiques.

La quantité d'une ose de bactéries est inoculée sur un milieu TY tamponné gélosé incliné en tubes de verre. Ce procédé est répété encore deux fois si la culture stock est âgée de plus d'une semaine. Après 72 heures, cette culture est homogénéisée dans 3 ml de solution de tampon phosphate stérile 0.01 M, pH 7, et employée pour inoculer des milieux TY tamponnés gélosés stériles en boîtes de Petri.

VI.2.2) Récolte des bactéries

À l'aide d'une pipette Pasteur chauffée pour former un râteau, le tapis bactérien est récolté dans du tampon NaPBS (appelé tampon phosphate de sodium: dans un litre de solution : 0,81 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ et 1,9 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8 g NaCl) et centrifugé 5 min à 10 000 rpm (Centrifuge 5417R, eppendorf). Les cellules sont ensuite lavées (remises en suspension / recentrifugées) encore deux fois dans le même tampon. Puis au moins 80 mg de culot bactérien est mis en suspension (dans des tubes de centrifugation eppendorf) dans un volume de 0,9 mL de tampon "STB" 0,062 M Tris-HCl pH 6,8 contenant 5% (v/v) de mercaptoéthanol et 5% (p/v) de sucrose. La lyse des cellules s'effectue après addition de 0,1 mL de SDS 20%, et chauffage des échantillons pendant 10 min à 95°C. Les tubes sont ensuite rapidement mis dans de la glace et centrifugés pendant 10 min (Centrifuge 5417R, eppendorf), à température ambiante. Le surnageant contenant alors les extraits protéiques est partagé en deux parties : la partie majeure est conservée à - 80°C, la partie mineure pour l'usage courant à - 20°C.

VI.2.3) Electrophorèse des extraits protéiques

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS ou SDS-PAGE est réalisée sur des appareils de type Hoeffer SE 600 ou LKB 2001 (gels verticaux). L'épaisseur courante des gels est de

1,5 mm. Le gel résolutif de 12 % est préparé à partir d'une solution monomère dont la concentration totale en acrylamide est calculée d'après la formule $\%T = (\text{Acr} + \text{Bis})/100 = 30\%$ et la proportion relative de bis acrylamide par rapport à T est exprimée en $\%C = 2,67$. Ce gel a une longueur de 12,6 cm. Les concentrations finales des autres produits et solutions dans le gel résolutif sont : 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 et 0,1 % SDS.

Le gel de concentration de 5 % est long de 12 mm, et le $\% C = 2,67$.

Les concentrations finales des autres produits et solutions sont : 0,0125 M Tris HCl pH 6,8 et 0,1 % SDS.

VI.2.3.1) Préparation d'un gel résolutif à 12 % (30 % T, 2,67 % C)

La cassette est assemblée avec des plaques de verre bien nettoyées, et marquée en laissant tomber entre les plaques, sur le côté gauche, une étiquette numérotée. L'épaisseur recommandée de 1,5 mm est déterminée par des petites lattes en plastique ou "Spacer". La polymérisation des gels de polyacrylamide mais aussi la migration électrophorétique s'effectuent à température constante (19°C). La cassette est installée sur le support en ayant soin de déposer un morceau de parfilm sur le joint pour assurer une meilleure étanchéité du système.

En mélangeant les produits et les solutions suivantes, on obtient un gel résolutif à 12 % :

26,8 mL d'eau milli Q

20 mL de tampon de gel résolutif

32 mL de la solution monomère

0,8 mL de la solution de SDS 10%

Laisser chauffer la solution dans un bain-marie à la température choisie pour la polymérisation et ajouter alors dans l'ordre suivant :

40 µl de TEMED

0,28 mL d'une solution PSA 10 % préparée au moment de l'emploi.

Couler 28 mL de cette solution immédiatement entre les plaques de verre à la hauteur standardisée de 12,6 cm. Pour obtenir un ménisque plat, la surface de la solution du gel résolutif est surchargée de 2 mL d'une solution d'isobutanol saturée d'eau distillée. Après 10-15 min à 20°C, la polymérisation visuelle doit être finie. Après une heure, les phases d'isobutanol saturée d'eau distillée et l'eau formée pendant la polymérisation sont éliminées par renversement. Le gel est ensuite bien lavé 3 fois à l'eau distillée et couvert de 1,6 mL d'une dilution 1/4 (v/v) de tampon de gel résolutif additionnée de 0,1 % de SDS. On laisse poursuivre la polymérisation du gel résolutif pendant la nuit dans une étuve thermostatée à 20°C. Pour éviter le dessèchement, la cassette est recouverte d'un autre support de polymérisation.

VI.2.3.2) Préparation d'un gel de concentration à 5 % (30 % T, 2,67 % C)

Au moins 5 heures avant l'utilisation du gel, la solution couvrante est éliminée et la surface du gel résolutif est bien rincée deux fois à l'eau distillée. La cassette est alors renversée sur un papier buvard. En mélangeant les produits et les solutions suivantes on obtient un gel de concentration 5 % :

11,3 mL d'eau distillée

5 mL de tampon du gel de concentration,

3,4 mL de la solution monomère,

0,2 mL de la solution de SDS 10 %

La solution est équilibrée à la température ambiante et additionnée de (dans l'ordre suivant) :

25 µl de TEMED

0,1 mL d'une solution de PSA 10 %, préparée au moment de l'emploi. La solution est soigneusement homogénéisée et sans attendre, une partie est versée pour rincer la surface du gel résolutif. Après élimination de cette partie, le reste du gel de concentration est coulé entre les plaques de verre au-dessus du gel résolutif. Le moule pour la formation de 20 puits identiques (peigne en Téflon) est placé dans la solution. La formation de bulles d'air sous les dents du peigne en Téflon doit être formellement évitée. La polymérisation se fait à température ambiante. Après une heure, le moule est enlevé, les puits sont lavés puis remplis d'une dilution au 1/4 (v / v) du tampon du gel de concentration additionné de 0,1 % de SDS. Au moment d'appliquer les échantillons dans les puits, cette solution est éliminée et remplacée par une solution de tampon d'électrode, après avoir rincé les puits 2 fois avec ce même tampon d'électrode.

VI.2.3.3) Application des échantillons et électrophorèse

Tous les puits sont numérotés, et les échantillons sont déposés dans ceux-ci à l'aide d'une seringue Hamilton. Le volume à appliquer dépend de la concentration des protéines de chaque échantillon. Les différents volumes appliqués sont ajustés avec le tampon d'échantillon, contenant 2 % de SDS et 0,0001 % de bleu de Bromophénol dans un volume final de 15 µl. Le réservoir du tampon d'électrode supérieur est fixé à la cassette et rempli de tampon d'électrode fraîchement préparé. Le tout est mis dans le réservoir de l'électrode inférieure contenant 4 litres de tampon d'électrode âgé de moins d'une semaine et un barreau magnétique. Les bulles d'air qui se seraient éventuellement formées en bas du gel doivent être chassées. Le réservoir est mis sur un agitateur magnétique et la réfrigération (réglée à 19°C) est branchée. La migration se fait pendant la nuit sous une intensité constante de 6 mA pour chaque gel, et arrêté lorsque la distance parcourue par le front du bleu de Bromophénol atteint 9,5 cm.

VI.2.3.4) Fixation, coloration et décoloration

La cassette est démontée, les gels résolutifs sont récupérés et mis immédiatement dans un récipient contenant une solution de fixation (solution de 10 % d'acide trichloroacétique) et agités pendant 1 h sur un agitateur linéaire. La fixation est suivie de la coloration des

protéines (pendant une heure sur un agitateur linéaire) dans une solution de 0,25 % de bleu de Coomassie (Serva blue R), 50 % (v / v) de méthanol et 10 % (v / v) d'acide acétique. La décoloration est effectuée en remplaçant le liquide colorant par une solution de décoloration composée de 25 % (v / v) de méthanol et 10 % (v / v) d'acide acétique. Le séchage des gels de polyacrylamide se fait entre deux feuilles de cellophane perméables sur un sécheur de gel. Les gels séchés sont conservés secs en sacs de plastiques à l'obscurité.

VI.2.4) Analyse des profils protéiques

Les profils électrophorétiques sont comparés aux profils de souches de référence à l'aide du logiciel GelCompar 4.2 qui permet la saisie, la standardisation, la normalisation et le stockage des données (Kerstens, 1985 ; Vauterin et Vauterin, 1992). Un densitomètre (type Ultrascan LaserLKB 2202, programme Gel-Scan) connecté à un ordinateur PC compatible permet la mémorisation des bandes de protéines suivie de leur digitalisation et de leur stockage (Programme GelCompar, Vauterin et Vauterin, 1992). La normalisation des profils est faite par rapport à celui de la souche de *Psychrobacter immobilis* LMG 1125, standard choisi pour son profil protéique constitué de bandes nettement séparées et réparties sur toute la longueur du gel. Cette étape de normalisation permet de corriger d'éventuelles différences de conditions de migration résultant des aléas expérimentaux. La similarité entre les profils des différentes souches bactériennes comparées deux à deux est ensuite calculée et exprimée en pourcentage par conversion du coefficient de corrélation de Pearson (r). Ce sont ainsi la position et la densité des bandes qui sont prises en compte. Les résultats sont ensuite intégrés et présentés sous forme de dendrogramme.

VI.3) solutions

Tampon Phosphate 0,01 M pH7 :

(a) 0,2 M KH_2PO_4 27,218 g/l d'eau distillée.

(b) 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 71,63 g/l d'eau distillée

Tampon 0,1M : 195 ml (a) + 305 ml (b) + 500 ml d'eau distillée. Diluer ensuite jusqu'à 0,01 M.

Tampon NaPBS :

0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 40,5 ml

0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 9,5 ml

NaCl : 8,0 g

H_2O qsp 1000 ml

pH 7,3

conserver à 4°C.

Tampon STB :

Tris : 0,75 g,

Mercaptoéthanol : 5,0 ml,
Sucrose 5,0 g,
H₂O qsp 100 ml
pH 6,8
conserver à -18°C

Solutions stock pour l'électrophorèse

Toutes les solutions sont préparées avec des produits de la plus grande pureté (Bio-Rad ou "Electran grade" de BDH) qui sont dissous dans de l'eau bidistillée ou dans de l'eau déionisée comme l'eau Milli Q (résistance électrique = 18 mx.cm-1).

(a) La solution monomère.

Acrylamide 29.2 g ;
NN'-méthylène-bis-acrylamide 0.8 g ;
compléter à 100 ml avec de l'eau Milli Q.

La solution est stable si elle est conservée dans une bouteille brune à 4°C.

(b) Le tampon du gel résolutif.

Dissoudre 18.15 g de Tris dans 50 ml d'eau Milli Q. Le pH de la solution est ajusté à 8.8 avec une solution d'HCl standard 1,72N ; compléter à 100 ml avec de l'eau Milli Q. La conductivité finale du tampon est éventuellement vérifiée. Conserver à 4°C.

(c) Le tampon du gel de concentration.

Dissoudre 6 g de Tris dans 50 ml d'eau Milli Q. Le pH de la solution est ajusté à 6.8 avec une solution d'HCl standard 1,72N; compléter à 100 ml avec de l'eau Milli Q. Conserver à 4°C.

(d) Solution de SDS 10%

10 g de sodium dodécyl sulfate dissous dans 100 ml d'eau Milli Q. Conserver à température ambiante.

(e) solution de SDS 20 %

20 g de sodium dodécyl sulfate dissous dans 100 ml d'eau Milli Q. Conserver à température ambiante.

(f) Solution de PSA 10 %.

Préparer fraîchement une solution de 0.1 g. de persulfate d'ammonium dans 1 ml d'eau Milli Q filtrée sur millipore 0,45 µm. Vérifier le pH qui doit être compris entre 5 et 6 (en cas de dégradation en ammonium sulfate, le pH tombe entre 2 et 3).

(g) Tampon d'électrode du réservoir anionique (réservoir inférieur).

12 g de Tris (BDH)
57.6 g de glycine (BDH)
4 g de SDS (BDH)
compléter à 4000 ml d'eau Milli Q (le pH est de 8.6).

Conserver à température ambiante moins d'une semaine.

(h) Tampon d'électrode du réservoir cathodique (réservoir supérieur).
Préparer au moment de l'emploi. Laisser à température ambiante.

Tris BDH : 1,5 g

SDS BDH 10 % : 5 ml

glycine BDH : 7,2 g

H₂O Milli Q qsp 500 ml.

(pH 8,6)

(i) Bleu de Bromophénol 0,001 %

Solution Stock : 10 mg/100 ml de tampon STB + 2% SDS

Faire une dilution au 1/10e dans le même tampon pour obtenir le tampon d'échantillon.

(j) Tampon d'échantillon : pour ajuster le volume des dépôts:

0,8 ml de tampon STB

0,1 ml de 20% SDS

0,1 ml de Bleu de Bromophénol à 0,001 % dans STB à 2% SDS

conserver à -12°C.

(k) solutions de coloration

- solution stock 2% non filtrée Serva Blue R (coomassie)

10 g + H₂O qsp 500 ml

- solution colorante :

solution stock : 125 ml

Methanol : 500 ml

Acide acétique : 100 ml

H₂O Milli Q qsp 1000 ml.

VII) Extraction de l'ADN génomique

Pour effectuer des PCR du gène codant pour l'ARNr 16S, nous avons commencé par extraire l'ADN par éclatement puis avec une méthode utilisant la protéinase K. Pour les PCR de l'ADNr 16S-IGS, nous avons employé la méthode de Sambrook (2001) qui donne de l'ADN plus pur, sans être aussi fastidieuse à réaliser que les méthodes de Marmur (1961) ou de Pitcher (1989). Enfin, pour extraire de l'ADN génomique destiné à des expériences d'hybridations ADN/ADN, nous avons utilisé la méthode de Pitcher (Pitcher *et al.*, 1989).

VII.1) Méthode utilisant l'éclatement des cellules

Une quantité de plusieurs colonies fraîchement cultivées sur milieu solide (YMA) est déposée dans 100 μ L d'eau milli Q stérile et soumise aux conditions suivantes : chauffage initial : 96 °C pendant 2 min, puis 7 cycles de chauffage pendant 2 min à 96 °C, refroidissement jusqu'à 4 °C pendant 10 sec. Refroidissement final : 4°C pendant 25 min. Pour cela nous avons utilisé un thermocycleur de type Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer, Nieuwerkerk a/d IJssel, Hollande).

VII.2) Méthode utilisant la protéinase K

A partir d'une colonie pure, fraîchement isolée sur milieu gélosé YMA, chaque souche est repiquée en masse, sur milieu YMA gélosé en boîte de Petri.

Après incubation de 48 heures, le tapis bactérien est récolté et lavé 2 fois à l'eau distillée stérile et la densité optique est mesurée.

A 100 μ L de suspension cellulaire de DO(620) = 2, on ajoute 100 μ L de Tris-Cl (10 mM, pH 8.3) puis 20 μ L de protéinase K (Boehringer) à 1 mg/mL d'eau milliQ stérile.

Le mélange est incubé 2 heures à 55°C, puis 10 min à 100°C pour dénaturer la protéinase K. Les tubes sont stockés à -20°C.

VII.3) Méthode de Sambrook (Sambrook, 2001)

Lyse de la paroi cellulaire :

A partir de cultures pures obtenues sur milieu YMA, une colonie est prélevée et cultivée dans 5 mL de milieu YM liquide à 28°C (24 à 48h). Les cellules bactériennes sont ensuite centrifugées (10 min à 5000 tours). Le culot obtenu est lavé une fois avec 5 mL de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) et récupéré dans 500 μ L de TE contenant du lysozyme à 1 mg / mL. La solution est transférée dans des tubes eppendorf de 1 mL de capacité. Après agitation à l'aide d'un vortex, le tout est incubé à 37°C pendant 30 min. Ensuite, 30 μ L de SDS10 % et 10 μ L de protéinase K à 20 mg / mL sont ajoutés. Le tout est mélangé en vortexant et incubé une nuit à 37°C.

Précipitation des protéines et récupération de l'ADN

20 μ L de SDS 10 % sont ajoutés. La solution est par la suite homogénéisée par des inversions lentes des tubes. 130 μ L de NaCl à 5 M sont ajoutés au mélange qu'on secoue alors fortement jusqu'à obtention d'une mousse. Les tubes sont ensuite incubés dans la glace pendant 30 minutes puis secoués fortement jusqu'à l'obtention d'une mousse de nouveau. Les échantillons sont alors centrifugés (15 min à 5000 tours).

On obtient ainsi un culot qui correspond aux protéines. Le surnageant correspond à l'ADN. Ce dernier est récupéré dans des tubes eppendorf de capacité 2 mL cette fois (car ils sont plus hermétiques pendant le traitement au phénol-chloroforme).

Purification des acides nucléiques par traitement au phénol, chloroforme, sevag :

Le traitement au phénol, chloroforme et Sevag sera effectué sous une hotte. Le port des gants est nécessaire.

A cette étape, 700 μL de phénol-Sevag sont ajoutés aux tubes. Ces derniers sont secoués fortement pour homogénéiser. Une centrifugation est effectuée (5 min à 5000 tours). Le surnageant est récupéré et la même étape est répétée encore une fois.

L'étape suivante est analogue mais elle consiste en l'addition 700 μL de Chloroforme-Sevag. Cette étape est aussi répétée une fois.

Précipitation de l'ADN :

Le surnageant est récupéré et un volume d'acétate de sodium correspondant au dixième du volume de la solution est ajouté. Un volume d'isopropanol correspondant au volume de la solution (avant addition de l'acétate de sodium) est ensuite ajouté. La solution est ensuite homogénéisée par des inversions lentes des tubes. On obtient ainsi une méduse qui correspond à l'ADN génomique.

La méduse est récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur et transférée dans un tube contenant 500 μL d'éthanol 70 %. Le tube est par la suite vortexé et centrifugé (10 min, 5000 tours). Le surnageant est jeté et le culot est mis à sécher (à l'air libre, pendant une demi-heure). Il est ensuite récupéré dans 50 μL de Tris.

Etape de purification par la RNase

1 μL de ribonucléase (à 30 mg / mL) sont ajoutés à la solution. L'ensemble est incubé 2 heures à 37°C.

Précipitation de l'ADN

L'ADN est précipité en ajoutant 10 μL d'acétate de sodium (solution à 3 M) et 200 μL d'éthanol absolu et en faisant des inversions lentes des tubes. Les tubes sont ensuite centrifugés (10 min à 14 000 tours / min) puis le surnageant est jeté. Le culot est lavé en ajoutant 500 μL d'éthanol à 70 % et en mélangeant (vortex). Les tubes sont ensuite centrifugés (5 min à 14 000 tours / min) et le surnageant est jeté. Le culot (méduse) est ensuite séché à l'air libre.

Finalement, le culot est récupéré dans 50 μL (ou 30 μL) de Tris-EDTA (Tris10 mM ; EDTA 1 mM) et dissous dans cette solution pendant 30 min à 55°C puis une nuit à 4°C.

L'ADN est conservé à - 20°C.

VII.4) Méthode de Pitcher

La méthode de Pitcher *et al.* (1989) est une méthode pour l'extraction de l'ADN bactérien qui peut être utilisée dans le cas de bactéries gram positif ou gram négatif. Elle permet l'obtention

de l'ADN génomique pur, de masse moléculaire élevée et double brin nécessaire pour les hybridations ADN/ADN. Dans cette technique, une masse bactérienne de 1,5 à 2,5 g doit être utilisée. Nous avons employé cette technique pour l'étude de souches appartenant au genre *Phyllobacterium*.

VII.4.1) Protocole

Culture des bactéries et récupération du culot

Les souches sont cultivées pendant deux jours à 28°C sur milieu E' liquide dans des erlens meyer en verre stérilisés au préalable. La culture liquide est ensuite répartie dans des pots pour être centrifugée à raison de 4000 t / min pendant 20 min à 20°C (Beckman, J2-21 M / E centrifuge). Le culot est pesé et transféré dans des tubes de capacité 50 mL. L'excès du culot peut être conservé à - 20°C. (Il faut compter 4 litres par souche pour avoir un culot d'à peu près 3 g).

Les tubes sont mis dans de la glace lors de la manipulation. Ajouter 3 mL de TE et vortexer pour mettre en suspension les cellules. Ajouter 0,1 mL de protéinase K et agiter à la main. Remettre les tubes dans de la glace. Incuber 10 min à 60°C puis ajouter 15 mL de GES (à manipuler avec des gants). Agiter doucement et vérifier la lyse. S'il n'y a pas de lyse, ajouter 4 mL de SDS 20 % et remettre la solution à 60 °C pour maximum 10 min. Cette étape est critique.

Mettre dans de la glace pour 10 min.

Ajouter 7,5 mL d'une solution de NH₄OAc 7,5 M et agiter doucement par retournement de tubes. L'acétate d'ammonium joue un rôle dans la précipitation et la floculation de protéines.

Ajouter 10 mL de chloroforme froid et agiter fortement. C'est une étape critique.

Centrifuger à 12 000 t / min, pendant 20 min à 4°C. On obtient deux phases : la phase inférieure est organique et la phase supérieure est aqueuse et contient l'ADN.

Transférer la phase supérieure dans un bécher en verre stérile, Précipiter l'ADN en ajoutant deux volumes d'éthanol absolu. Agiter doucement à l'aide d'un bâtonnet en verre stérilisé et enrouler la méduse sur le bâtonnet. Presser la méduse contre le verre pour la dessécher et attendre qu'elle devienne sèche. Dissoudre l'ADN dans 5 mL de TE, pendant 30 min à 55°C. Ajouter une goutte de chloroforme. Mettre les tubes à 4°C pendant un jour ou deux pour bien dissoudre l'ADN.

Traitement à la RNase

Ajouter 0,125 mL de la RNase à 2 % p / v et agiter doucement. Incuber à 37 °C pendant 40 min

Purification finale

Ajouter 0,625 mL d'acétate-EDTA à l'ADN et agiter doucement puis ajouter 5 mL de chloroforme et agiter doucement. Centrifuger 12 000 t / min, 20 min. Transférer la phase

supérieure dans un bécher en verre stérilisé et précipiter l'ADN avec deux volumes d'éthanol 95 % (ou absolu). Récupérer la méduse avec un bâtonnet en verre stérilisé. Presser la méduse contre la paroi du bécher pour la dessécher et enlever l'excès d'alcool. Laisser la méduse sécher à l'air libre et la dissoudre dans 0,1 – 0,5 mL (selon la quantité d'ADN précipité) de solution SSC 0,1 X.

Ajouter quelques gouttes de chloroforme pour éviter le développement de bactéries et mettre les tubes à 4°C.

Un fois bien dissous, l'ADN est stocké à – 20°C

Contrôle de la qualité et Dosage de l'ADN obtenu

Une dilution jusqu'au 1/100 ème est préparée et mesurée au spectrophotomètre à deux longueurs d'ondes : 260 nm et 280 nm. Le rapport de la densité optique D.O 260 nm/ D.O. 280 nm exprime la pureté de l'ADN. Pour un ADN de bonne qualité, ce rapport est compris entre 1,8 et 2.

La quantité de l'ADN est déterminée sachant qu'une unité D.O. à 260 nm correspond approximativement à 50 µg / mL d'ADN double brin (Sambrook *et al.*, 2001). Il faut compter 75 µg par réaction d'hybridation (soit une concentration de 500 à 700 µg / mL)

VII.4.2) Solutions

Les solutions sont toujours préparées avec de l'eau milliQ

Tampon RS

- 0,15 M NaCl

- 0,01 M EDTA pH 8,0

Stériliser à 120 °C pendant 20 min

Se conserve à température ambiante

Tampon 1X TE (on utilise 10 mL par extraction)

- 10 mM Tris

- 1 mM EDTA

- ajuster le pH à 8,0

- Stériliser à 120 °C pendant 20 min

Protéinase K

Solution à 23 mg / mL.

Tampon GES

- 5 M thiocyanate de guanidium

- 100 mM EDTA

- 0,5 % v / v sarkosyl ou N-Lauroyl Sarcosine

préparation : 60 g thiocyanate de guanidium, 20 mL d'EDTA 0,5 M, pH 8,0 et 20 mL H₂O mQ stérile. Chauffer à 65°C et agiter jusqu'à dissolution. Après refroidissement, 1 g de sarkosyl est rajouté. Compléter à 100 mL avec H₂O mQ stérile

Le GES est stérilisé par filtration sur filtre de 0,45 µm

Le GES est conservé à 4°C mais réchauffé au bain marie afin de reclarifier la solution au moment de l'emploi.

Acétate d'ammonium NH₄Oac (on utilise 7,5 mL par souche)

- 7,5 M NH₄Oac

Stériliser à 120 °C pendant 20 min

La stérilisation par filtration est préférable à la stérilisation à l'autoclave qui provoque une vaporisation d'odeurs désagréables.

SSC 10X

- NaCl 1,5 M

- C₆H₈O₇.H₂O (acide citrique monohydraté) 0,15 M

Ajouter 18 g de NaOH et ajuster le pH à 7,0

Stériliser à 120 °C pendant 20 min

SSC 0,1 X

diluer le SSC 10 X jusqu'à SSC 0,1 X

Stériliser à 120 °C pendant 20 min

RNAse 0,2 %

0,2 % de ribonucléase (200 mg RNAse / 100 mL) dans du NaCl 0,15 M, pH 5,0

préparer du NaCl 0,15 M, pH 5,0 avec de l'eau mQ stérile (préparer 10 mL de NaCl)

La solution est chauffée jusqu'à 80°C pendant 10 min pour désactiver des éventuels contaminants de DNAse

La solution de RNAse est stérilisée par filtration

Acétate-EDTA

3 M NaOAc (acétate de sodium)

1 mM EDTA

ajuster le pH à 7,0

Stériliser à 120 °C pendant 20 min

Alcool éthylique absolu

Chloroforme pur

Propanol-2 (ou isopropanol) pur

VIII) Amplification de l'ADN par PCR

La PCR (Mullis et Faloona, 1987), de l'anglais Polymerase chain reaction ou en français : réaction de polymérisation en chaîne, permet l'amplification sélective *in vitro* de séquences d'acides nucléiques. Pour la PCR, nous avons ciblé plusieurs régions du génome :

VIII.1) PCR de l'ADNr 16S

La figure 1 montre l'emplacement de quelques amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNr 16S, de la région 16S -IGS.

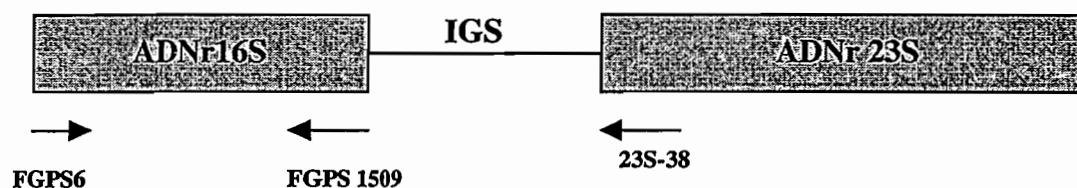


Figure 1. Représentation schématique de la région de l'ADN codant pour l'ARNr 16S et 23S avec l'emplacement des amorces utilisées pour les différentes PCR.

L'amplification est réalisée sur 2 μL de solution d'ADN obtenue par la méthode à la protéinase K. Le volume du mélange réactionnel est de 50 μL et contient : 2 μL d'ADN, 5 μL de tampon de réaction 10X (Invitrogen, Etats Unis), 1,5 μL de MgCl_2 50 mM, 1 μL de dNTPs chacun à 10 mM (Sigma -ALDRICH, Allemagne), 1 μL de chacune des deux amorces à 20 μM (Biotech AG) : FGPS 6 et FGPS 1509 (Tableau 3), 1 unité de *Taq* polymérase (Invitrogen, Etats Unis) et 33,2 μL d'eau milli-Q stérile. Un contrôle négatif contenant 2 μL d'eau milli-Q stérile au lieu de l'ADN est inclus dans chaque réaction PCR. L'amplification est faite dans un thermocycleur de type Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer, Nieuwerkerk a/d Ijssel, Hollande) avec le programme suivant :

Dénaturation initiale 94°C - 5 min

35 cycles :

dénaturation 94°C - 30sec

hybridation des amorces 55°C - 30 sec

extension 72°C - 2 min

Extension finale 72°C - 7 min

Les produits d'amplification sont visualisés par électrophorèse (cuve à électrophorèse 15,5x24,5 cm, Easy Cast, Electrophoresis system, Model #B1, OWI Scientific, Inc.), en prenant 4 µl d'ADN amplifié de chaque souche avec une goutte de bleu de charge (bleu de bromophénol 0,025%, glycérol 3%, EDTA 1mM) sur un gel d'agarose 1% (Agarose type II : Medium EEO, Sigma, Allemagne, 12x13 cm) mélangé avec 2 gouttes de bromure d'ethidium.(solution à 0,625 mg/ml). La migration se fait dans du tampon TAE 1X (40 mM Tris-acétate, 1 mM EDTA, pH 8,3). Le gel est photographié (perfect image V-5.3 Clara Vision). Le produit d'amplification recherché correspond à une taille de 1500 pb.

VIII.2) PCR de l'ADNr 16S-IGS

Les souches de la collection du Liban ont été caractérisées par PCR-RFLP de l'ADNr 16S-IGS. C'est une région plus grande que l'ADNr 16S car elle englobe l'IGS qui est très variable, donc plus informatif au niveau phylogénétique. Nous avons employé les mêmes conditions de PCR que dans l'amplification de l'ADNr 16S (sauf que nous avons réalisé 38 cycles au lieu de 35). Les amorces utilisées sont les suivantes : FGPS6 et 23S-38 (Tableau 3). Le produit d'amplification attendu étant de taille plus grande que celle de l'ADNr 16S (la taille de ce produit varie en fonction de la taille de l'IGS et fait environ 2800 pb), nous avons utilisé un gel de TAE 1X à 0,8 % pour visualiser la PCR, dans des cuves comme décrit plus haut. Pour les souches qui présentent une amplification, on reprend 4 µl du produit de PCR qu'on mélange avec 1 µl de bleu de charge 5X, et qu'on fait migrer sur un gel TAE 1X, à 0,8%. Les ADN sont déposés dans 12 puits fins incluant 3 marqueurs (Smart Ladder, Eurogentec), un sur chaque bord et un au milieu. Les photos sont enregistrées en négatif, sous format Tiff. Elles sont par la suite analysées sur GelCompar (applied Maths, Belgique), afin de classer les souches selon la taille de l'amplifiat. Ce dernier sera hydrolysé par la suite avec des enzymes de restriction.

Les conditions de la PCR sont les suivantes :

Dénaturation initiale 94°C - 5 min

35 à 38 cycles :

dénaturation 94°C – 30sec

hybridation des amorces 55°C – 30 sec

extension 72°C – 2 min

Extension finale 72°C – 7 min

Ces conditions ne donnaient pas une amplification de la région 16S-IGS pour certaines souches, nous avons alors procédé à une nouvelle extraction d'ADN en suivant le protocole de Sambrook (2001).

VIII.3) PCR de l'intergène IGS séparant l'ADNr 16S du 23S

Pour déterminer la séquence de l'espace intergénique (IGS) qui sépare l'ADNr 16S de l'ADNr 23S, nous avons effectué une PCR en utilisant les amorces : 16S-870f et FGPL2054' (Tableau 3).

Les conditions de la PCR sont les suivantes :

Dénaturation initiale : 96°C – 5 min

20 cycles : dénaturation 96°C-30 sec

Hybridation des amorces : de 65°C à 55°C (touch down) – 30 sec

Extension : 72 °C – 1 min 30 sec

Puis 20 cycles avec les mêmes conditions de dénaturation et d'extension La température d'hybridation des amorces est de 55°C.

Extension finale : 72°C – 7 min

VIII.4) Recherche de gènes de nodulation par PCR (Chapitre III, deuxième article)

Nous avons utilisé pour la PCR des amorces des gènes *nodA* qui avaient servi pour amplifier des gènes de nodulation chez les bradyrhizobia et chez le genre *Methylobacterium* (Sy *et al.*, 2001). Pour ces deux amorces (*nodA.f.brad* et *nodA r.brad*, Tableau 3), la taille attendue est de 550 à 600 pb. L'amplification a été réalisée dans un volume réactionnel de 25 µL.

Les conditions de la PCR sont les suivantes

Dénaturation initiale : 94°C-5 min

20 cycles : dénaturation 94°C-30 sec

Hybridation des amorces : de 60°C à 50°C (touch down)-30 sec

Extension : 72 °C-42 sec

Puis 22 cycles avec les mêmes conditions de dénaturation et d'extension La température d'hybridation des amorces est à 50°C.

Extension finale : 72°C – 7 min

VIII.5) Recherche des régions symbiotiques *nod box* chez *Rhizobium galegae*

Les amorces Nb1f, Nb1r, Nb2f, Nb2r, Nb3f, Nb3r, Nb4f, Nb4r, Nb5f, Nb5r (Andronov *et al.*, 2003) (tableau 3) ont été utilisées pour essayer d'amplifier la région correspondant à *nod box* chez *Rhizobium galegae*. Deux souches de référence (témoins positifs) ont été utilisées : ORS 668 (*R. galegae* biovar *orientalis*) et STM 2085 (*R. galegae* biovar *officinalis*).

Les conditions de la PCR sont les suivantes :

Dénaturation initiale : 95°C – 3 min
 30 cycles : dénaturation 94°C-1 min
 Hybridation des amorces : 55°C – 1 min
 Extension : 72 °C – 1,5 min
 Extension finale : 72°C – 3 min

VIII.6) Recherche de gènes de fixation d'azote *nifH* par nested PCR :

La *nested PCR* consiste en deux PCR successives. La matrice d'ADN (2 μ L) utilisée pour la deuxième PCR provient de la première (Beyer *et al.*, 1995). Widmer *et al.* (1999) ont utilisé cette méthode pour amplifier le gène *NifH* sur de l'ADN en provenance de la microflore de la litière d'une forêt de sapin de Douglas.

La première PCR est effectuée selon le programme présenté sur la Figure 2. avec les amorces *nifH* (forward1) et *nifH* (reverse) (Tableau 3).

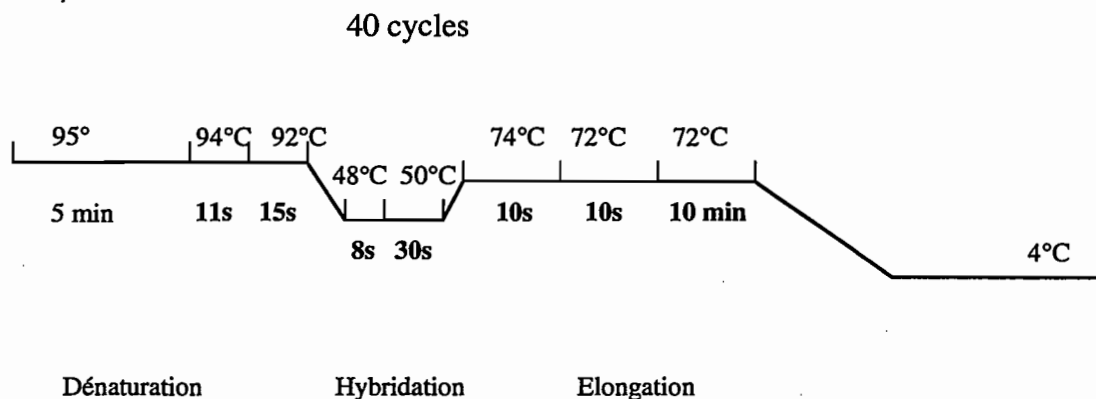


Fig. 2. Programme de la première PCR (et de la deuxième PCR) réalisées pour une amplification du gène *nifH*

La deuxième PCR est réalisée avec les amorces *nifH* (forward2) et *nifH* (reverse), dans les mêmes conditions.

Tableau 3. Amorces utilisées dans cette thèse.

Amorces	Séquences	Référence
PCR de l'ADNr 16S		
FGPS 6	5' GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA G 3'	Normand <i>et al.</i> , 1992
FGPS 1509	5' AAG GAG GGG ATC CAG CCG CA 3'	Normand <i>et al.</i> , 1992
PCR de l'ADN 16S-IGS		
23S-38	5' CCG GGT TTC CCC ATT CGG 3'	Normand <i>et al.</i> , 1992
PCR de l'IGS (l'ADNr 16S - 23 S)		
16S-870f	5'-CCT GGG GAG TAC GGT CGC AAG-3'	Sy <i>et al.</i> , 2001
FGPL2054' ou FGPL132'	5'-CCG GGT TTC CCC ATT CGG-3'	Normand <i>et al.</i> , 1992
Séquençage de l'IGS		
Br5*	5' - CTT GTA GCT CAG TTG GTT AG - 3'	Willems <i>et al.</i> , 2001
PCR des gènes Nod		
nodA.f.brad	5'- GTY CAG TGG AGS STK CGC TGG G-3'	Sy <i>et al.</i> , 2001
nodA r.brad	5'- TCA CAR CTC KGG CCC GTT CCG - 3'	Sy <i>et al.</i> , 2001
PCR des gènes Nif H		
Nif H forward 1	5' - GCW TTA YGG NAA RGG NGG - 3'	Widmer <i>et al.</i> , 1999
Nif H forward 2	5' - GGT GTG AYC CNA AVG CNG A - 3'	Widmer <i>et al.</i> , 1999
Nif H reverse	5' - GCR TAA BNG CCA TCA TYT C - 3'	Widmer <i>et al.</i> , 1999
Séquençage de l'ADNr 16S		
16S-870f	5' CCT GGG GAG TAC GGT CGC AAG 3'	Sy <i>et al.</i> , 2001
16S-1080r	5' GGG ACT TAA CCC AAC ATC T 3'	Sy <i>et al.</i> , 2001
16S-370f	5' GGC AGC AGT GGG GAA TAT TG 3'	Sy <i>et al.</i> , 2001
16S-1924 rev	5' GGC ACG AAG TTA GCC GGG GC 3'	Sy <i>et al.</i> , 2001
PCR nod box <i>R. galegae</i>		
Nb1f	5'-TCC ATC TCC TAG ATG CCT CA-3'	Andronov <i>et al.</i> , 2003
Nb1r	5'-GGC TAC GCA GTG ATT TGA TG-3'	Andronov <i>et al.</i> , 2003
Nb2f	5'-TCG ATT GTT TGA ATG CCA TA-3'	Andronov <i>et al.</i> , 2003
Nb2r	5'-GGC AAC ACG TCC AAC TTT CT-3'	Andronov <i>et al.</i> , 2003
Nb3f	5'-GCG TGA ATT GGT GTC ATC CT-3'	Andronov <i>et al.</i> , 2003
Nb3r	5'-AAG CTC GTC GCC AAA ATA GA-3'	Andronov <i>et al.</i> , 2003
Nb4f	5'-GCC GCG ATA TAC TGA CCA TT-3'	Andronov <i>et al.</i> , 2003
Nb4r	5'-TAT TCG AGG CGT GGA TGT CT -3'	Andronov <i>et al.</i> , 2003
Nb5f	5'-GGT CAT GCT CTC GAT GGT TT-3'	Andronov <i>et al.</i> , 2003
Nb5r	5'-CTT CAA ATC CAC GCA ATC AA-3'	Andronov <i>et al.</i> , 2003

Les lettres W, Y, N, R et B correspondent à des dégénérescences au niveau des nucléotides. La signification des lettres est la suivante : W (AT), Y(CT), N(ATGC), R(AG), B(CGT).

IX) La technique ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) :

Pour la technique ARDRA des souches de référence correspondant à tous les genres de *rhizobia* appartenant à la sous-classe α des protéobactéries (sauf *Bradyrhizobium*) et un représentant des rhizobia de la sous-classe β des protéobactéries (*Burkholderia tuberum*) ont été inclus dans l'étude.

IX.1) Hydrolyse des produits d'amplification de l'ADNr 16S et de la région ADNr 16S – IGS :

Des aliquots de 10 μ L de produit d'amplification de l'ADNr 16S sont hydrolysés avec 7 endonucléases de restriction ayant différents sites de coupure, pendant 2 heures minimum dans un volume réactionnel final de 20 μ L. Les enzymes de restriction suivantes ont été utilisées : *MspI*, *CfoI*, *HinfI*, *RsaI*, *NdeII*, *AluI*, *Taq I* (fournisseur Eurogentec, ou Promega) sur la base des résultats de Laguerre *et al.*, 1994 (voir le tableau 4 pour les sites de restriction).

Le mélange réactionnel est comme suit : 10 μ L ADN, 0,5 μ L enzyme (8-12U/ μ L), 2 μ L Tampon, 7,5 μ L eau milli-Q stérile (Eurogentec) (sauf pour *CfoI*, nous avons utilisé Promega). Pour les enzymes fabriqués par Promega, le tampon ne contenant pas de BSA (albumine de sérum de bœuf), nous avons donc ajouté 0,2 μ L de BSA et le mélange est comme suit : 10 μ L ADN, 0,5 μ L (10 U/ μ L) enzyme, 2 μ L Tampon, 7,3 μ L eau milli-Q stérile 0,2 μ L BSA à 10 mg/mL.

Les produits d'amplification obtenus pour l'ADNr 16S-IGS ont été hydrolysés par 3 enzymes de restriction : *MspI*, *CfoI*, *HaeIII* dans les mêmes conditions.

Tableau 4. Enzymes utilisées et sites de restriction correspondants :

Enzyme	Site de restriction	T° d'incubation
<i>MspI</i>	5'-C*CGG-3'	37°C
	3'-GGC*C-5'	
<i>CfoI</i>	5'-GCG*C-3'	37°C
	3'-C*GCG-5'	
<i>HinfI</i>	5'-G*ANTC-3'	37°C
	3'-CTNA*G-5'	
<i>RsaI</i>	5'-GT*AC-3'	37°C
	3'-CA*TG-5'	
<i>NdeII</i>	5'-*GATC-3'	37°C
	3'-CTAG*-5'	
<i>AluI</i>	5'-AG*CT-3'	37°C
	3'-TC*GA-5'	
<i>TaqI</i>	5'-T*CGA-3'	65°C
	3'-AGC*T-5'	
<i>HaeIII</i>	5'-GG*CC-3'	37°C
	3'-CC*GG-5'	

N = A, C, G ou T

IX.2) Electrophorèse des fragments de restriction de l'ADNr16S et 16S-IGS :

L'ADN hydrolysé a été analysé par électrophorèse horizontale dans des cuves (15X10 cm, 12 puits fins, Easy Cast, Electrophoresis system Model # B1, OW1, Scientific Inc.). 4 µL de bleu de charge 5X sont ajoutés au volume réactionnel de l'hydrolyse et le tout est chargé sur un gel métaphore (metaphore agarose FMC bioproducts USA) à 3% mélangé avec 2 gouttes de bromure d'ethidium (solution à 0,625 mg/ml). La migration se fait dans du tampon TBE 1X (Tris-Borate-EDTA buffer, 89 mM Tris-borate, 2mM EDTA, pH 8,3). Le marqueur VIII (Boehringer) de poids moléculaire a été utilisé.

Les temps de migration sont comme suit : 15 minutes à 50 volts et 3 heures à 90 volts. Les images des gels sont saisies en négatif et sous format Tiff par une camera marque RAISER, Germany et à l'aide d'un logiciel perfect image, V – 5.3 (Clara vision).

IX.3) Analyse des données de PCR-RFLP par GelCompar

Gel Compar est un logiciel d'analyse mathématique et statistique qui permet la saisie, la standardisation, la normalisation et le stockage des données pour le groupement et l'identification des profils d'électrophorèse (Vauterin et Vauterin, 1992). Les photos des gels sont intégrées dans ce logiciel (GelCompar II 3.0, Applied Maths), dans un fichier d'analyse. Le logiciel convertit chaque profil en une piste contenant un grand nombre de valeurs densitométriques. Ces valeurs sont représentées sous forme de pics. La largeur de la zone d'analyse du profil est fixée pour tous les puits. Les pistes contenant le marqueur de poids moléculaire sont marquées comme piste de référence et pour chaque puits, les informations sont stockées et enregistrées. Ensuite, les photos sont normalisées de façon à rendre les gels comparables les uns avec les autres. Le principe de la normalisation est basé sur l'alignement indirect des profils via un profil de référence. Parmi les gels à analyser, une piste de référence est sélectionnée comme standard de référence. Différentes bandes facilement reconnaissables du standard sont définies comme bandes de référence. Pour chaque gel, les pistes de référence sont alignées sur le standard. Les profils des pistes de référence sont étirés ou compressés afin qu'ils s'alignent le plus parfaitement possible au profil standard. Ceci permet ensuite une calibration du gel et l'alignement des autres sites de façon similaire. L'analyse des données se fait comme suit : dans chaque profil d'électrophorèse, le logiciel repère les bandes à prendre en compte pour l'analyse. Le groupage se fait en calculant une matrice de similarité entre chaque paire de souches. On obtient un dendrogramme à partir de la matrice par la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average) en utilisant le coefficient de similarité de Dice.

IX.4) Séquençage de l'ADN

IX.4.1) Séquençage de l'ADNr 16S.

Après une amplification par PCR du gène codant pour l'ARNr 16S (volume de réaction de PCR : 50 µL), on fait migrer l'amplifiat sur un gel TAE 1 % (1X) (40 mM Tris-acétate, 1 mM

EDTA, pH 8,3) contenant 2 gouttes de bromure d'ethidium (solution à 0,625 mg/mL) pendant une heure sous 100 Volts. La bande correspondant à 1500 paires de bases (taille de l'ADNr 16S) est découpée et purifiée à l'aide d'un kit QIAquick (QIAGEN). Un volume de 4 μ L est prélevé de l'ADN élué afin de mesurer la quantité d'ADN contenue dans l'élution. Ce volume est mélangé à 1 μ L de bleu de charge et chargé sur un gel de TAE 1X (1 %, mêmes conditions de gel que pour découper les bandes). Un marqueur de poids moléculaire (Smart Ladder, Eurogentec) est aussi déposé sur le gel (5 μ L). La quantification se fait visuellement en comparant la bande de l'ADNr 16S aux bandes du marqueur, pour lesquelles on connaît la quantité d'ADN correspondante. L'ADN est par la suite utilisé (40 à 50 ng) pour une réaction de séquence en utilisant le kit de ABI Prism BigDye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). Contrairement à la PCR, une seule amorce est utilisée par réaction. Nous avons employé 3 à 6 amorces (Tableau 3) pour séquencer partiellement ou totalement l'ADNr 16S. La réaction de séquence est ensuite analysée dans un séquenceur (Applied Biosystems model 310 DNA sequencer). Les séquences d'ADN sont obtenues sous forme de pics colorés dont chacune des 4 couleurs correspond à l'une des bases A, T, G ou C. Elles sont ensuite corrigées à l'aide du logiciel sequence navigator 1.0 (Applied Biosystems) qui permet d'attribuer manuellement des lettres correspondant aux différentes bases en face de chaque pic. Les séquences partielles d'une souche donnée ainsi corrigées sont assemblées à l'aide du logiciel « Autoassembleur » (Autoassembler 2.1, Applied Biosystems) en une seule séquence appelée séquence consensus, représentant la presque totalité du gène. Ensuite elles sont alignées à l'aide du logiciel Clustal X (Applied Biosystems) avec des séquences d'autres souches à étudier et avec des séquences de l'ADNr 16S de souches de référence (obtenues à partir de GenBank). Après vérification et correction de l'alignement sur le logiciel Genedoc (en éliminant par exemple les parties de séquences pour lesquelles aucune partie d'autres séquences n'existent entraînant ainsi beaucoup de différence et un biais dans la comparaison), un arbre phylogénétique est construit en utilisant le logiciel Paup 4.

IX.4.2) Séquençage des gènes *NodA* et *NifH*

Pour séquencer le produit d'amplification du gène *nodA*, nous avons employé les mêmes amorces que pour la PCR correspondante. Pour séquencer le produit d'amplification du gène *nifH* obtenu par la *nested PCR*, nous avons employé le couple d'amorce utilisé dans la deuxième PCR *nifH* forward 2 et *nifH* reverse).

IX.4.3) Identification des séquences corrigées

Les séquences corrigées sont identifiées en faisant un blast (Altschul *et al.*, 1990)

CHAPITRE III
CARACTERISATION DE BACTERIES ASSOCIEES
AUX NODULES DE LEGUMINEUSES SPONTANEEES DE LA
TUNISIE PRE-SAHARIENNE

CHAPITRE III
CARACTERISATION DE BACTERIES ASSOCIEES
AUX NODULES DE LEGUMINEUSES SPONTANEEES DE LA
TUNISIE PRE-SAHARIENNE

Ce chapitre s'articule autour de deux articles :

Article N°2 : Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J-C., Gillis, M., Dreyfus, B. and de Lajudie, P. Characterisation of Legume Nodulating Bacteria (LNB) in arid regions of Tunisia. Soumis à *Systematic and Applied Microbiology*.

Article N°3 : Zakhia, F., Jeder, H., Willems, A., Dreyfus, B. and de Lajudie, P. Unusual bacteria associated to root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for *nifH* gene-like within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*.

I) INTRODUCTION

Cinq régions du monde sont soumises au climat méditerranéen : les pays du Bassin Méditerranéen, la Californie, le Chili, l'Afrique du Sud et l'Australie du Sud et du Sud-Ouest (e.g. Sánchez-Díaz, 2001). Les écosystèmes du pourtour du Bassin Méditerranéen sont particulièrement menacés par la dégradation à cause de plusieurs facteurs dont les longues périodes de sécheresse accompagnées de vents érosifs. A cela s'ajoute le surpâturage (Le déficit en fourrage dans quelques pays conduit le bétail à consommer des espèces végétales épineuses, non pâturées habituellement) et la pression anthropique qui se manifeste par l'urbanisation et la déforestation. Tous ces facteurs font évoluer les écosystèmes fragiles vers l'aridité ou le désert (Abahussain *et al.*, 2002).

La pratique de la culture des légumineuses dans certains pays de la Méditerranée date de plusieurs milliers d'années, comme le trèfle en Egypte, et beaucoup d'espèces constituent actuellement une partie des cultures traditionnelles pour le fourrage comme les luzernes, le sainfoin et le sulla. D'autre part, les nombreuses cultures de pois chiche, de lentilles et de haricots sont principalement une source d'alimentation pour l'homme. Les légumineuses dont la diversité spécifique est très riche en Méditerranée (1956 espèces, Maxted et Bennett, 2001a), présentent un grand intérêt agro-économique : elles sont pionnières des sols pauvres grâce à leurs symbioses fixatrices d'azote atmosphérique avec les « BNL » (Bactéries Nodulantes des Légumineuses) et elles contribuent à la production de fourrage. Leur introduction sur des sols à couvert végétal dégradé limite l'érosion et enrichit le sol en azote (Franco et de Faria, 1997). En outre, certaines légumineuses présentent des adaptations à des environnements extrêmes : Ainsi, certaines espèces poussent dans des écosystèmes arides du Chili comme *M. polymorpha* (Del Pozo *et al.*, 2002) ou de la Tunisie comme *Retama raetam* (Jeder *et al.*, 1996). *M. polymorpha* se trouve aussi associée avec *M. ciliaris* dans des zones à forte salinité en Algérie (Zakhia *et al.*, 2001).

Sur le plan fondamental, les BNL associées aux légumineuses cultivées ont fait l'objet de plusieurs études. Ainsi, Rome *et al.* (1996) et Jebara *et al.* (2001) ont trouvé des souches appartenant au genre *Sinorhizobium* comme partenaires symbiotiques des luzernes ou *Medicago* spp. D'autres auteurs ont trouvé des bactéries des genres *Rhizobium* (Van Berkum *et al.*, 1998) et *Bradyrhizobium* (Yao *et al.*, 2002) associées aux luzernes. D'autres légumineuses méditerranéennes ont aussi été étudiées pour leur symbiose : le haricot (Aouani *et al.*, 1997 ; Priefer *et al.*, 2001), le pois chiche (Nour *et al.*, 1994 ; 1995 ; Aouani *et al.*, 2001).

En revanche, les légumineuses sauvages ont fait l'objet de peu d'études dans la région méditerranéenne. Certains auteurs se sont intéressés aux BNL du genre *Acacia* (Zerhari *et al.*,

Chapitre III : Caractérisation de bactéries associées aux nodules de légumineuses spontanées des régions arides de Tunisie

1998 ; Khbaya *et al.*, 1998 ; Mohamed *et al.*, 2000 ; Zerhari *et al.*, 2000 ; Bâ *et al.*, 2002) et à ceux de la légumineuse arbustive *Spartium junceum* L. (Quatrini *et al.*, 2001). D'autres auteurs se sont intéressés aux légumineuses spontanées utiles pour la réhabilitation des sols dégradés et la production de fourrage dans le Sud-Est de l'Espagne comme *Coronilla juncea* (Robles *et al.*, 2002), sans étudier les BNL associées. Ainsi, les études concernant la nodulation des légumineuses spontanées herbacées en Méditerranée ne sont pas nombreuses, Zahran (1998 ; 2001).

D'autre part, dans le Bassin Méditerranéen et particulièrement en Egypte, *Rhizobium leguminosarum* a été trouvée associée au riz dans le delta du Nil (Yanni *et al.*, 1997). En Afrique, des souches de *Bradyrhizobium* sp ont aussi été trouvés endophytes du riz en Afrique (Chaintreuil *et al.*, 2000). D'autres bactéries, non connues comme BNL, ont été décrites comme endophytes. C'est le cas de souches du genre *Microbacterium*, *Cellulomonas*, *Clavibacter* (Zinniel *et al.*, 2002), *Acetobacter*, *Herbaspirillum* (Riggs *et al.*, 2001), *Azoarcus* (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993). D'autres bactéries vivent même dans les nodules sans être BNL comme certaines souches du genre *Bacillus* (Bai *et al.*, 2002). Elles semblent exercer un effet améliorant la croissance des plantes.

Au cours d'un programme de recherche associant l'IRD (Institut Français pour la Recherche et le Développement) et financé par l'Union Européenne, Jeder *et al.* (1996) ont exploré la nodulation des légumineuses spontanées de l'étage aride inférieur en Tunisie. La morphologie des nodules a été décrite et la nodulation de plusieurs taxons a été observée pour la première fois. Les bactéries associées aux nodules racinaires ont été isolées et une collection d'une centaine d'isolats en provenance de 24 espèces de légumineuses a été constituée.

Notre travail a consisté en la caractérisation de cette collection d'isolats. L'approche polyphasique que nous avons adoptée est constituée de trois techniques à différents niveaux de résolution taxonomique : PCR-RFLP de l'ADNr 16S, SDS-PAGE des protéines totales et séquençage partiel ou total de l'ADNr 16S ou d'une partie de l'intergène séparant l'ADNr 16S du 23S. Des isolats ont été trouvés au sein des BNL « classiques » (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*) (Article N°2), d'autres appartiennent à des genres non connus pour induire des nodules (Article N°3), mais dont la plupart a été décrite dans la littérature comme endophytes ou colonisant la surface des racines ou l'intérieur des nodules. Des souches (ORS 1420, STM 370 et STM 391) ont été trouvées proches de *Phyllobacterium myrsinacearum* sur la base des séquences de l'ADNr 16S. Elles font l'objet d'une caractérisation phylogénétique (hybridations ADN/ADN) et phénotypique (Galeries API) dans le cadre d'une collaboration avec l'INRA d'Angers. Les résultats préliminaires montrent que ces souches constituent de nouvelles espèces dans le genre *Phyllobacterium*.

CHARACTERISATION OF WILD LEGUME NODULATING BACTERIA (LNB) IN THE INFRA-ARID ZONE OF TUNISIA

Frédéric Zakhia¹, Habib Jeder², Odile Domergue¹, Anne Willems³, Jean-Claude Cleyet-Marel¹, Monique Gillis³, Bernard Dreyfus¹, and Philippe de Lajudie^{1*}.

¹Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR 1063, IRD/INRA/CIRAD/AGRO-M/UM II, Montpellier, France.

²Institut des Régions Arides, Nahal-Gabès. Tunisia.

³Laboratorium voor Microbiologie, Faculteit Wetenschappen, Universiteit Gent, Belgium.

Running title

Legume nodulating bacteria in Tunisia

***Corresponding Author**

LSTM, Campus International de Baillarguet, TA10 / J, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Tél. ++33-467-593851 ; Fax : ++33-467-593802

Email : P-De.Lajudie@mpl.ird.fr

Accession numbers

Submitted for publication in Systematic and Applied Microbiology

Summary

We report on the isolation and the characterization of nitrogen-fixing root nodule bacteria isolated from natural legumes in a region of South Tunisia corresponding to the infra-arid climatic zone. A collection of 60 new bacterial root nodule isolates were obtained from 19 legume species belonging to the genera *Acacia*, *Anthyllis*, *Argyrolobium*, *Astragalus*, *Calycotome*, *Coronilla*, *Ebenus*, *Genista*, *Hedysarum*, *Hippocrepis*, *Lathyrus*, *Lotus*, *Medicago*, *Ononis*. The isolates were characterized by (1) comparative 16S ARDRA using 7 enzymes, (2) total cell protein SDS-PAGE analysis and (3) 16S rDNA sequencing. The results show that these isolates are diverse and belong to the genera *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Bradyrhizobium* were further characterised by 16S-23S rDNA IGS sequencing. Surprisingly strains nodulating *Astragalus cruciatus*, *Lotus creticus* and *Anthyllis henoniana* were identified as *Rhizobium galegae*, a species recorded only as endosymbiont of *Galega officinalis* and *G. orientalis* in northern regions so far.

Key words : Legume Nodule Bacteria (LNB) – RFLP – SDS-PAGE – Tunisia - Arid regions – Mediterranean Basin – *Rhizobium galegae*.

INTRODUCTION

Leguminous plants are of great importance worldwide, especially in countries under mediterranean climate like Tunisia. They provide human food, forage, wood, industrial and medicinal products. They contribute to soil fertility and to the prevention of soil erosion. They are good colonizers of poor soils under extreme climatic conditions, which is due for a large part to their nitrogen fixing symbiosis with "LNB" (Legume Nodulating Bacteria) belonging to the α and β subclasses of Proteobacteria (ZAKHIA and DE LAJUDIE, 2001 ; MOULIN et al., 2001 ; CHEN et al., 2001). Legumes constitute a very large plant family and less than 20 % of the legume species have been examined for nodulation. In recent years exploration of a number of tropical wild legume species, trees, shrubs and herbs, has evidenced unexpected diversity of their associated LNB and several new bacterial species have been recognised in Africa (de LAJUDIE et al., 1994; 1998a; 1998b; NICK et al., 1999; WILLEMS et al., 2000; SY et al., 2001; MOULIN et al., 2001, VANDAMME et al., 2002), in China (CHEN et al., 1991, 1995, 1997; XU et al., 1995; WANG *et al.*, 1998; WEI et al., 2002; TAN et al., 2001), in India (RIVAS et al., 2003) and in America (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991; SEGOVIA et al., 1993; WANG et al., 1999, 2002; VELASQUEZ et al. 2001; TOLEDO et al., 2003).

Until now, nodulation of wild legumes originating from the mediterranean countries has been poorly documented and studies have been mainly focused on cultivated species (NOUR et al., 1994, 1995; ROME et al., 1996; SQUARTINI et al., 2002). Lucernes (*Medicago* spp.) are of special ecological and agronomic importance and they have a very specific spectrum of LNB, namely *Sinorhizobium* spp. (JORDAN, 1984; EARDLY et al., 1990; ROME et al., 1996; VILLEGAS, 2002; WILLEMS et al., 2003) and *Rhizobium mongolense* (VAN BERKUM et al., 1998). JEBARA et al. (2001) studied four *Medicago* species in Tunisia *M. sativa*, *M. truncatula*, *M. ciliaris* and *M. scutella* and showed that they are nodulated by either *S. meliloti* or *S. medicae*. LNB associated with *Phaseolus vulgaris* (common bean) were characterized in Morocco by PRIEFER et al. (2001) and in Tunisia by MHAMDI et al. (2002), where they were assigned to *R. gallicum* bv. gallicum, *R. leguminosarum* bv. phaseoli and bv. viciae, *R. etli* bv. phaseoli, *R. giardinii* bv. giardinii, *S. medicae* and *S. fredii* species. AOUANI et al. (1997) showed differential common bean nodulation efficiency depending on the bacterial strain. LNB from chickpea (*Cicer arietinum* L.) have been described as *Mesorhizobium ciceri*, *M. mediterraneum* and *Mesorhizobium* sp. (NOUR et al., 1994; 1995). In addition, AOUANI et al., (2001) showed that chickpea can ineffectively be nodulated by *Sinorhizobium medicae* in Tunisia and MAÂTALLAH et al. (2002) reported a phenotypic study of LNB isolated from chickpea growing in Morocco. Microsymbionts of some other mediterranean legumes species were studied i.e. *Anthyllis cystisoides*, a woody legume occurring in arid and semi-arid ecosystems, nodulated by *Rhizobium* spp. (REQUENA et al., 1997), *Hedysarum coronarium*, a forage legume, nodulated by *R. sullae* (MOZO et al., 1988; SQUARTINI et al., 2002), *Lathyrus japonicus* and *L. pratensis* by *R. leguminosarum* bv. viciae (DROUIN et al., 1996).

Some authors studied tree legumes, i.e. *Acacia* in Morocco (ZERHARI et al., 1998 ; KHBAYA et al., 1998 ; de LAJUDIE et al., 1999; ZERHARI et al., 2000), in Tunisia (BÂ et al., 2002) and in Libya (MOHAMED et al., 2000). The mediterranean shrub *Spartium junceum* L. is nodulated by *Bradyrhizobium* sp. (QUATRINI et al., 2002). ZAHARAN (1998) studied the nodulation of 5 wild herb legumes *Trifolium resupinatum*, *Melilotus indica*, *Medicago intertexta*, *Trigonella hamosa* and *Alhagi murarum* in Egypt. Moreover ZAHARAN (2001) reported that symbiotic rhizobia of naturally growing legumes are more tolerant to some ecological stresses (i.e. salt, severe drought, high temperatures) than rhizobia from cultivated legumes, and sometimes more efficient for nitrogen-fixation with other plants than with their original hosts.

The development of molecular techniques opened the way to fast and reliable characterisation of LNB. In particular, Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) of the 16S rDNA (LAGUERRE et al., 1994 ; NICK, 1998 ; TEREFEWORK et al., 1998) and SDS-PAGE technique (de LAJUDIE et al., 1994 ; 1998a ; 1998b ; NICK et al., 1999) have proved to be powerful initial grouping methods for LNB isolates in the past. In addition, 16S rDNA sequence comparison is now obligatory for bacterial phylogenetic studies (ZAKHIA and de LAJUDIE, 2001). However, in *Bradyrhizobium*, where 16S rDNA is much conserved among species, partial sequencing of the 16S-23S Internal Transcribed Spacer (ITS) is more discriminant for species affiliation (WILLEMS et al., 2001).

We previously reported on the investigation of wild legumes in the infra-arid zone of South Tunisia, where rainfall does not exceed 180 mm (JEDER et al., 1996). Unlike the rest of the country, this region is characterised by a higher proportion of perennial legume species versus annual ones (LE FLOC'H and GROSSMANN, 1998). The majority of the investigated legumes belonged to the Papilionoideae (39 taxons out of 42). They were frequently nodulated, annual legumes being generally more abundantly nodulated than perennial ones. Nodulation of the species *Astragalus gombiformis*, *Astragalus gyzensis*, *Calycotome villosa*, *Ebenus pinnata*, *Genista saharae*, *Genista microcephala*, *Lathyrus numidicus*, *Lotus roudairei* was reported for the first time (JEDER et al., 1996). Here we report on the isolation of 60 LNB isolates from 19 of these legumes, some of which are common and play important ecological and pastoral roles, but others are rare and endangered like *Medicago marina*, *Astragalus gombiformis*, *Coronilla scorpioides*, *Lotus roudairei*, and *Acacia tortilis*. The isolates were characterised by 16S ARDRA, SDS-PAGE of total cell proteins and 16S rDNA sequencing. The results show that the LNB isolates are diverse and belong to the *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* and *Bradyrhizobium* lineages.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture media

The investigated strains and the host plants are listed in Table 1. Reference strains are listed in Table 2. All *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains were maintained on yeast mannitol agar (YMA) (VINCENT, 1970) at 28°C, containing (g L⁻¹): mannitol, 10; sodium glutamate, 0.5; K₂HPO₄, 0.5; MgSO₄.7H₂O, 0.2; NaCl, 0.05; CaCl₂, 0.04; FeCl₃, 0.004; yeast extract (Difco), 1; pH 6.8; agar, 20. All strains were stored at -80 °C on the same medium plus 20 % v/v glycerol. For protein preparations we used buffered Tryptone-Yeast Extract medium (TY) containing (in g L⁻¹, pH 6.8 to 7): tryptone (Oxoid), 5; yeast extract (Oxoid), 0.75; KH₂PO₄, 0.454; Na₂HPO₄.12H₂O, 2.388; CaCl₂, 1; LabM agar, 20.

Bacterial isolation procedure

Naturally occurring root nodules were collected *in natura* and either directly used for bacterial isolation or stored dried in tubes containing CaCl₂ (DATE, 1982). Upon utilisation, nodules were re-hydrated in sterile water and surface sterilised by immersion in Calcium hypochlorite (3 %) for 5 min. The nodules were then aseptically rinsed 8 times in sterile water, crushed in a drop of sterile water and the suspension was streaked on YMA in Petri dishes. Colonies appeared after 2-6 day incubation at 28°C under aerobic conditions and were checked for purity by repeated streaking on YMA and by microscopic examination of living cells. Isolates were stored at - 80°C in YM adjusted to 20 % (v / v) glycerol.

DNA preparation

Cells from 2-3 day old YMA plate cultures were suspended in sterile water and washed twice. The optical density at 620 nm (O. D.) was then measured, and a volume corresponding to 200 µL matching an O. D. (620 nm) = 1 was centrifuged at 12 000 rpm during 2 min. The pellet was suspended in 100 µL of sterile water followed by successive addition of 100 µL of Tris-HCl (10 mM, pH 8,3) and 20 µL of proteinase K (1 mg L⁻¹ solution) (Promega, Madison WI USA). After 2h incubation at 55°C, proteinase K was denatured by incubation 10 min in boiling water. The solution was then centrifuged 14 000 rpm for 10 min. The DNA containing supernatant was stored at - 20°C until use.

16S ARDRA

Nearly full-length 16S ribosomal DNA was amplified using the universal eubacterial 16S rDNA primers FGPS6 and FGPS1509 (NORMAND et al., 1992). PCR amplification was carried out in a 50 μ L reaction mixture containing template DNA (2 μ L), 5 μ L of reaction buffer (Invitrogen, USA), 1,5 μ L of MgCl₂ 50 mM, 4 μ L of dNTP 2,5 mM each (Sigma-ALDRICH, Germany), 2 μ L of each primer (20 μ M) (Biotech AG), 1 unit of *Taq* polymerase (Invitrogen, USA) and 33,2 μ L of sterile Milli-Q water. A negative control without template was included in every PCR run. Amplification was performed in a Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer, Nieuwerkerk a / d Ijssel, The Netherlands) using the following program : initial denaturation (5 min at 94°C), 35 cycles of denaturation (30 sec at 94°C), annealing (30 sec at 55°C) and extension (7 min at 72°C), and final extension (7 min at 72°C).

The PCR products were checked by electrophoresis in 1 % agarose gel in TAE buffer (40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA, pH 8,3) containing 2 drops of 0,5 mg / mL ethidium bromide.

For ARDRA analysis, 10 μ L aliquots of PCR products were digested with *MspI*, *CfoI*, *Hinfl*, *RsaI*, *AluI*, *NdeII*, *TaqI* (LAGUERRE et al., 1994) during 2 hours in a 20 μ L final volume as specified by the manufacturer (Promega) but with an excess of enzyme (5 units per reaction). Restriction fragments were analysed by horizontal gel electrophoresis using 3 % Metaphor agarose (FMC bioproducts USA) in TBE buffer (89 mM Tris-Borate, 2 mM EDTA, pH 8,3) containing 2 drops of 0,5 mg / mL ethidium bromide. The electrophoresis was performed using a 15 x 10 cm tray, 12 wells (Easy Cast, Electrophoresis system Model # B1, OW1, Scientific Inc.) at 50 V during 15 min and at 80 V for 3 hours. The gel images were scanned, digitised and stored in a computer using Perfect Image software (V-5.3, Clara Vison, Germany). Profiles were normalised, combined and clustered using the Gel-Compar II version 3.0 software package (Applied Biomathematics) (VAUTERIN & VAUTERIN, 1992). Dice coefficient and UPGMA clustering were used.

Analysis of protein electrophoretic patterns

All strains were grown at 28°C for 48 h (fast growing bacteria) or 72 h (slow-growing LNB) in Roux flasks on buffered TY medium. Whole cell protein extracts were prepared from 80 mg cells and SDS-PAGE was performed using small modifications of the procedure of LAEMMLI (1970), as described previously (de LAJUDIE et al., 1994). The normalised densitometric traces of the protein electrophoretic patterns were grouped by numerical analysis, using the Gel-Compar 4.2 software package (VAUTERIN & VAUTERIN, 1992). The similarity between all pairs of traces was expressed by the Pearson product moment correlation coefficient (r) converted for convenience to a percent value (POT et al., 1989 ; 1994).

16S rDNA sequencing

PCR products of 16S rRNA gene were run on a 1% agarose gel, band was excised and DNA purified using a QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and sequenced by using the primers FGPS6, FGPS1509, 16S-370f, 16S-1080r, 16S-870f and 16S-1924r (Table 3). Sequence reactions were performed with the ABI Prism BigDye Terminator Cycle sequence kit (Applied Biosystem, Foster City, Calif.) and analysed on an Applied Biosystems model 310 DNA sequencer. Sequences were assembled using the Autoassembler program (Perkin Elmer) and aligned with Clustal X software. The aligned sequences were checked manually using Genedoc software. Phylogenetic tree was constructed with the neighbor joining algorithm (SAITOU and NEI, 1987) using PAUP4 software and the stability of the groupings was assessed by performing a bootstrap analysis (1000 replications).

16S-23S IGS rDNA sequencing

The internal spacer region of 16S-23S was amplified using the primers 16S-870f and FGPL2054' (Table 3). A touch down PCR (DON et al., 1991) was performed with a Perkin Elmer model 2400 thermocycler. In a total volume of 25 μ L the reaction mixture contained 2 μ L of the bacterial suspension, 2,5 μ L of 10 X buffer (Eurogentec), 1,5 μ L 25 mM MgCl₂, 2 μ L of dNTPs (2,5 mM each), 1 μ L of each primer (20 μ M), one unit Taq DNA polymerase (GIBCO BRL). The amplification was performed using the following program: « Touchdown » PCR consisting of an initial denaturation step (96°C, 5 min), followed by 20 cycles of denaturation (96°C, 30 s), annealing (from 65°C to 55°C, 30 s) and extension (72°C, 90° s, followed by 20 cycles of denaturation (96°C, 30 s), annealing (55°C, 30 s), extension (72°C, 90 s and final extension (72°C, 7 min).

The PCR products were purified using a Quiaquick PCR purification kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and sequenced using the primers Br5* (WILLEMS et al., 2001), and FGPL2054' (NORMAND et al., 1992).

RESULTS

Collection of root nodule isolates from wild legumes in the infra-arid zone of Tunisia

We prospected in the South region of Tunisia corresponding to the infra arid climatic zone with rainfall < 180 mm (Fig. 1) to identify wild legume plants. We focused on 19 spontaneous annual and perennial nodulated legume plant species belonging to the genera *Acacia*,

Anthyllis, Argyrolobium, Astragalus, Calycotome, Coronilla, Ebenus, Genista, Hedysarum, Hippocrepis, Lathyrus, Lotus, Medicago, Ononis (Table 4).

Nodules were sampled, from which a collection of 60 LNB isolates was obtained (Table 1), of which 58 were fast-growing and 2 were slow-growing bacteria: ORS 1409, ORS 1412.

16 S ARDRA

(For the sake of clarity, the word cluster will be used for ARDRA grouping and the word group will be used for SDS-PAGE grouping).

The 60 nodule isolates were first characterised by 16S ARDRA. Reference strains representative for described LNB species were included in our study (table 2). 16S ribosomal DNA was PCR-amplified and all strains produced a single band of the expected size of approximately 1500 bp. Profiles obtained with 7 restriction enzymes were combined and analysed using the GelCompar software. Individual patterns consisted of 3 to 4 bands (*NdeII*, *RsaI*, *TaqI*, *HinfI*) or 5 to 7 bands (*AluI*, *CfoI*, *MspI*), resulting in combined profiles of 30 to 32 bands for cluster analysis. Reproducibility was assessed on several reference species and different strains of a given species shared the same profiles. Results are shown as a similarity dendrogram on Fig. 2. Nine clusters were delineated: Cluster I contains 9 new isolates, 6 of which share nearly identical ARDRA patterns with *R. mongolense* type strain. Cluster II, contains *R. galegae* type strain and 7 new isolates. Cluster III consists of 4 new isolates sharing 100% pattern homology. Cluster IV consists of 6 new isolates with identical profiles to *R. leguminosarum*. Cluster V comprises the *Sinorhizobium meliloti* type strain and 24 new isolates. Closely related to cluster V, cluster VI encompassed *S. medicae* and one new isolate. Cluster VII consists of 3 new isolates. Isolate STM 398 has an identical profile to *M. mediterraneum* (Cluster VIII) and two other isolates have separate positions in the vicinity of the *Mesorhizobium* reference strains. Cluster IX consists of the two slow-growing strains. In addition, isolate ORS 1439 has a separate position.

SDS-PAGE

The SDS-PAGE whole cell protein patterns of 53 new LNB isolates were scanned and analysed numerically with reference strains representing all fast- and slow-growing LNB species contained in our database. Results are presented as a limited dendrogram on Fig. 3, showing the grouping of the new isolates among their closest relatives as reference strains, several of which had also been included in the ARDRA study. At a level of 86% similarity 14 groups can be distinguished. Among new isolates, 33 are found in 12 groups, and 18 have separate positions, namely STM 390, STM 395, STM 366, STM 394, STM 398, STM 396, ORS 1401, ORS 1407, ORS 1444, ORS 1436, STM 361, STM 367, ORS 1487, ORS 1439, ORS 1453, ORS 1463, ORS 1464 and ORS 1465. SDS-PAGE Group 1 encompasses two isolates of ARDRA Clusters VI and VII. Group 2 consists of 2 strains of ARDRA Cluster I

and *R. gallicum* bv. phaseoli reference strain. Group 3 is composed of 3 isolates from Cluster IV and *R. leguminosarum* reference strain. Group 4 consists of *B. japonicum* type strain and the 2 slow-growing isolates of ARDRA Cluster IX. Group 5 consists of 2 strains of ARDRA Cluster I. The different *R. galegae* reference strains are found in three different groups (6, 7, 8), two of which (groups 7 and 8) include new isolates from ARDRA Cluster II. Group 9 consists of 3 isolates belonging to ARDRA Cluster I. Group 10 comprises 2 strains from ARDRA Cluster III. *S. meliloti* reference strains are found in groups 11 and 14 ; group 11 includes 10 new isolates from diverse legumes corresponding to ARDRA Cluster V. Interestingly, Senegalese isolate LMG 11934 from *Prosopis juliflora* grouped with SDS-PAGE group 11. Groups 12 and 13 consist of 2 and 3 new isolates respectively, also belonging to ARDRA cluster V.

16S rDNA sequencing

We determined the nearly full-length 16S rDNA sequences of 15 strains representative of the different ARDRA clusters. The results of the analysis are shown as a phylogenetic tree including also reference strains of known LNB (Fig. 4). Except strains ORS 1411, ORS 1463 and STM 394 sharing the same sequence with *Rhizobium galegae* bv. officinalis strain 59A2 (syn. HAMBI 503), all new isolates have different sequences compared to those of reference species. They occupy separate phylogenetic positions within the genera *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*. Four strains (ORS 1407, ORS 1434, ORS 1444, STM 382) are close to *S. meliloti* ; ORS 1400 is close to *S. terangaee*, ORS 1439 to *R. giardinii*, STM 398 to *M. mediterraneum*, ORS 1462 to *R. leguminosarum*. STM 381, ORS 1457 and ORS 1466 form a separate sub branch in *Rhizobium*, and ORS 1465 is outside the branch *R. galegae* - *R. huautlense*.

In addition partial 16S rDNA sequencing was determined for 7 more strains. The sequences of the two slow-growing strains ORS 1409 (585 bp) and ORS1412 (565 bp) are respectively 100% and 99% similar to *B. japonicum*. Sequences of ORS 1448 (508 bp) and STM 390 (526 bp) are respectively 97 % and 99 % similar to *R. galegae*. Sequence of ORS 1464 (398 bp) is 95% similar to *R. huautlense*. Sequence of STM 367 (269 bp) is 95 % similar to *M. mediterraneum*. Sequence of ORS 1498 (568 bp) is 97 % similar to *M. ciceri*.

16S-23S IGS rDNA sequencing

16S-23S IGS rDNA sequencing was performed on the 2 slow-growing strains ARDRA cluster IX) showing similarity with *B. japonicum* both by SDS-PAGE (group 4) and by 16S rDNA. The results of the sequence analysis of the IGS of these strains (ORS 1409, 513 bp ; ORS 1412, 544 bp) showed that they are 99.6 to 97% similar to *B. yuanmingense* IGS (533

bp). They therefore probably can be regarded as belonging to this species (WILLEMS et al., 2003b)

DISCUSSION

In a previous work (JEDER et al., 1996), we recorded 42 wild legumes growing in the arid region of Tunisia. Most of them were found nodulated *in natura*, and for eight species this was the first report of their nodulation. Our objective here was to characterize legume nodule bacteria (LNB) adapted to these regions and associated with these plants, for which few data were available in literature. We isolated 60 nodule bacteria from 19 legumes sampled in various sites in the infra-arid zone of South Tunisia. Isolates were characterized by a polyphasic approach including 16S ARDRA, SDS-PAGE of total proteins, and rDNA sequencing. Results from the three techniques are generally consistent, and, as expected, SDS-PAGE led to more (14) groups than 16S ARDRA (9). Table 4 summarises our main conclusions concerning the microsymbionts of the different studied plant species. New isolates belong to genera where other LNB were already described, i.e. mainly *Rhizobium* (27 isolates) and *Sinorhizobium* (28 isolates), and to a lesser extent *Mesorhizobium* (3 isolates) and *Bradyrhizobium* (2 isolates). Some plant species like *Anthyllis henoniana*, *Genista microcephala*, *Argyrolobium uniflorum*, *Lotus creticus* and *Medicago marina*, nodulated by several genospecies of one, two or three genera, can be qualified as promiscuous. Microsymbionts of the 6 plant species recently reported as nodulated (JEDER et al., 1996) were isolated for the first time, i.e. *Rhizobium* spp. for *Astragalus gombiformis*, *Calycotome villosa*, *Genista microcephala*, *Lathyrus numidicus*, *Sinorhizobium* sp. for *Lotus roudairei* and *Mesorhizobium* sp. for *Ebenus pinnata*.

To our knowledge, since its description for strains nodulating *Galega officinalis* and *Galega orientalis* very specifically in the Caucasus (Lindström, 1989), *R. galegae* has never been reported elsewhere than in the northern hemisphere. Here, by the three techniques, we found several isolates close to *R. galegae* (ARDRA clusters II and III, SDS PAGE groups 7 and 8). Some of them had 16S rDNA sequence identical to *R. galegae* (isolates from *Lotus creticus*, *Astragalus cruciatus*, *Anthyllis henoniana*) or very close to it (isolates from *Medicago truncatula*, *Argyrolobium uniflorum*). This is the first time *R. galegae* is found associated to legumes in the Mediterranean region. So far *M. truncatula* was known to be nodulated by *S. meliloti* and *S. medicae* (ROME et al., 1996).

16S rDNA sequences of the three representatives for ARDRA Cluster I grouped on a separate branch in *Rhizobium*, suggesting they may represent a new species to be further characterized by DNA:DNA hybridisations. 16S rDNA sequences of representative strains from other ARDRA groups were found close to but different from known species, i.e. *S. meliloti* (ARDRA clusters V and VII, exhibiting slight differences in their *CfoI* and *RsaI* profiles), *R. leguminosarum* (ARDRA cluster IV), *R. giardinii* (strain with a separate position in

ARDRA), *M. mediterraneum* (ARDRA cluster VIII). These strains may also represent separate genospecies, but DNA-DNA hybridisations are needed to clarify their taxonomic status. This is also the case for strain ORS 1400 (ARDRA Cluster VI) whose 16S rDNA sequence is 99 % homologous to *S. teranga* although its ARDRA profiles are different from those of the type strain of *S. teranga*. This strain have reproducibly the same profiles as *S. medicae* even with enzymes discriminating between *S. teranga* and *S. medicae* (*MspI*, *RsaI* and *NdeII*). Theoretical profiles with these enzymes are consistent with those obtained experimentally on gels. This indicates that ORS 1400 may be different from *S. teranga*. In this case ARDRA technique cannot be used to discriminate strains at the species level.

Both slow growing strains originated from *Lotus creticus* and grouped together with *B. japonicum* in ARDRA cluster IX and in SDS-PAGE group 4. Partial 16S rDNA sequencing confirmed their affiliation to *Bradyrhizobium*. Partial sequencing of the IGS indicates that these two strains are probably members of *B. yuanmingense*, a species proposed for symbionts of *Lespedeza* plants and up to now recorded only in China and in USA (Yao et al., 2002).

In conclusion, legume nodulating bacteria of wild legumes in infra-arid region of Tunisia were found to be diverse. Some taxons were unexpected in this region of the world and several groups may represent new genospecies to be further characterized to assess their taxonomical status.

Acknowledgements

The authors a grateful to LUCETTE MAURE, EMMANUEL PROTIERE and CATHY VADALA for technical assistance. FZ is indebted to IRD France for PhD fellowship, AW and MG to the Fund for Scientific Research - Flanders for a postdoctoral research fellow position and research and personnel grants respectively

Table. 1 New isolates and results of ARDRA and SDS-PAGE protein profile analysis.

Strain	Other strain designation	Host plant	16S-ARDRA cluster	SDS-PAGE group
<i>Rhizobium</i>				
ORS 1457	RAT 107	<i>Lotus creticus</i>	I	2
STM 381	RAT 1601	<i>Genista microcephala</i>	I	2
ORS 1468	RAT 214	<i>Anthyllis henoniana</i>	I	5
ORS 1495	RAT 1300	<i>Astragalus gombiformis</i>	I	5
ORS 1467	RAT 213	<i>Anthyllis henoniana</i>	I	9
ORS 1488	RAT 412	<i>Astragalus armatus</i>	I	9
ORS 1466	RAT 212	<i>Anthyllis henoniana</i>	I	9
STM 366	RAT 2202	<i>Calycotome villosa</i>	I	sep
STM 386	RAT 2202	<i>Calycotome villosa</i>	I	nt
ORS 1445	RAT 023	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	II	7
ORS 1446	RAT 024	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	II	7
ORS 1411	RAT 102	<i>Lotus creticus</i>	II	8
STM 394	RAT 2900	<i>Astragalus cruciatus</i>	II	sep
STM 390	RAT 2404b	<i>Medicago truncatula</i>	II	sep
ORS 1463	RAT 209	<i>Anthyllis henoniana</i>	II	sep
ORS 1448	RAT 026	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	II	nt
STM 383	RAT 2002	<i>Medicago marina</i>	III	10
ORS 1459	RAT 205	<i>Anthyllis henoniana</i>	III	10
ORS 1465	RAT 211	<i>Anthyllis henoniana</i>	III	sep
ORS 1464	RAT 210	<i>Anthyllis henoniana</i>	III	sep
STM 371	RAT 3001	<i>Lathyrus numidicus</i>	IV	3
STM 393	RAT 2600	<i>Coronilla scorpioïdes</i>	IV	3
ORS 1462	RAT 208	<i>Anthyllis henoniana</i>	IV	3
STM 395	RAT 1602	<i>Genista microcephala</i>	IV	sep
ORS 1487	RAT 411	<i>Astragalus armatus</i>	IV	sep
ORS 1461	RAT 207	<i>Anthyllis henoniana</i>	IV	nt
ORS 1439	RAT 017	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	Sep	sep

Chapitre III : Caractérisation de bactéries associées aux nodules de légumineuses spontanées des régions arides de Tunisie

Table 1 continued

			<i>Sinorhizobium</i>	
STM 369	RAT 2500	<i>Hippocrepis bicontorta</i>	V	11
STM 372	RAT 2100	<i>Lotus roudairei</i>	V	11
ORS 1431	RAT 1000	<i>Hedysarum carnosum</i>	V	11
ORS 1494	RAT 509	<i>Ononis natrix subsp filifolia</i>	V	11
STM 382	RAT 2000	<i>Medicago marina</i>	V	11
ORS 1433	RAT 1102	<i>Medicago sativa</i>	V	11
STM 357	RAT 1107	<i>Medicago sativa</i>	V	11
STM 356	RAT 1104	<i>Medicago sativa</i>	V	11
STM 354	RAT 1100a	<i>Medicago sativa</i>	V	11
STM 353	RAT 036	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	V	11
ORS 1442	RAT 020	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	V	12
ORS 1443	RAT 021	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	V	12
ORS 1435	RAT 1106	<i>Medicago sativa</i>	V	13
ORS 1449	RAT 027	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	V	13
ORS 1450	RAT 028	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	V	13
ORS 1453	RAT 32	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	V	sep
ORS 1401	RAT 002	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	V	sep
STM 361	RAT 2001a	<i>Medicago marina</i>	V	sep
STM 396	RAT 906	<i>Acacia tortilis</i>	V	sep
ORS 1436	RAT 1108	<i>Medicago sativa</i>	V	sep
STM 355	RAT 1100b	<i>Medicago sativa</i>	V	nt
ORS 1434	RAT 1104	<i>Medicago sativa</i>	V	nt
STM 362	RAT 2001b	<i>Medicago marina</i>	V	nt
ORS 1454	RAT 33	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	V	nt
ORS 1400	RAT 001	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	VI	1
ORS 1410	RAT 101	<i>Lotus creticus</i>	VII	1
ORS 1407	RAT 011	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	VII	sep
ORS 1444	RAT 022	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	VII	sep
			<i>Mesorhizobium</i>	
STM 398	RAT 2700	<i>unknown</i>	VIII	sep

Chapitre III : Caractérisation de bactéries associées aux nodules de légumineuses spontanées des régions arides de Tunisie

Table 1 continued

STM 367	RAT 2300	<i>Lotus argenteus</i>	sep	sep
ORS 1498	RAT 1400	<i>Ebenus pinnata</i>	sep	nt
<i>Bradyrhizobium</i>				
ORS 1409	RAT 100	<i>Lotus creticus</i>	IX	4
ORS 1412	RAT 103	<i>Lotus creticus</i>	IX	4

nt : not tested, sep, separate

Table 2. Reference Strains used in this study

Strain	Other designation	Host plant	Geographical	Reference	16S-ARDRA	SDS-PAGE
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> ORS 1352 ^T	LMG 150 ^T	-	-		Separate	Nt
<i>Agrobacterium rubi</i> ORS 1353	LMG 159	<i>Rubus sp.</i>	USA, 1942	KERSTERS et al., 1973	Separate	Nt
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ORS 1351 ^T	LMG 140 ^T	-	-		Separate	Nt
ORS 2644 ^T	LMG 187 ^{Tb}	<i>Lycopersicon</i>	U.S.A.	KERSTERS et al., 1973	Separate	Nt
<i>Agrobacterium vitis</i> ORS 2643	LMG 257	<i>Vitis vinifera</i>	Greece	LMG	Separate	Nt
<i>Allorhizobium undicola</i> ORS 992 ^T	LMG 11875 ^T	<i>Neptunia natans</i>	Senegal	de LAJUDIE et al., 1998b	Separate	Nt
ORS 995	LMG 11876	<i>Neptunia natans</i>	Senegal	de LAJUDIE et al., 1998b	Separate	Nt
<i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS 571 ^T	LMG 6465 ^T	<i>Sesbania rostrata</i>	Senegal	DREYFUS et al., 1988	Separate	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> NZP 5549 ^T	LMG 6138 ^T	<i>Glycine max</i>	Japan	-	Nt	4
<i>Burkholderia tuberum</i> STM 678 ^T	LMG 21444 ^T	<i>Aspalathus carnosa</i>	South Africa	MOULIN et al., 2001	Separate	Nt
<i>Mesorhizobium amorphae</i> STM 238	LMG 18932 or 18960	<i>Amorpha fruticosa</i>	China		Separate	Nt
<i>Mesorhizobium chacoense</i> pr5	LMG 19008 ^T	<i>Prosopis alba</i>	Argentina	VELÁZQUEZ et al., 2001	Nt	Separate
<i>Mesorhizobium ciceri</i> ORS 2738 ^T	LMG 17150 ^{Tb}	<i>Cicer arietinum</i> L.	Spain	NOUR et al., 1994	Separate	Nt
<i>Mesorhizobium huakuii</i> ORS 1752 ^T	LMG 14107 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	China	CHEN et al., 1991	Separate	Separate
<i>Mesorhizobium loti</i> ORS 664 ^T	LMG 6125 ^T	<i>Lotus tenuis</i>	New Zealand	JARVIS et al., 1986	Separate	Nt

Table 2 continued

<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>						
Ca-36 ^T , ORS 2739 ^T	LMG 17148 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	Spain	NOUR et al., 1995	Nt	Separate
ORS 2754					VIII	Nt
<i>Mesorhizobium plurifarum</i>						
ORS 654	LMG 10056	<i>Leucaena diversifolia</i>	Brazil	de LAJUDIE et al., 1998a	Separate	Nt
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>						
ORS 2640 ^T	LMG 15767 ^T	<i>Glycyrrhiza</i>	China	CHEN et al., 1995	Separate	Nt
<i>Methylobacterium nodulans</i>						
ORS 2060 ^T		<i>Crotalaria podocarpa</i>	Senegal	SY et al., 2001	Separate	Nt
<i>Rhizobium etli</i>						
ORS 645 ^T	LMG 11937 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Mexico	SEGOVIA et al., 1993	Separate	Nt
<i>Rhizobium galegae</i>						
HAMBI 540 ^T	LMG 6214 ^T , ORS 668 ^T	<i>Galega orientalis</i>	Finland	LINDSTRÖM, 1989	II	2
HAMBI 1428/2	LMG 15143	<i>Galega orientalis</i>	Russia	LINDSTRÖM, 1989	Nt	2
HAMBI 1143 / 3	LMG 15147	<i>Galega officinalis</i>	New zealand	LINDSTRÖM, 1989	Nt	2
HAMBI 1461 / 2	LMG 15145	<i>Galega orientalis</i>	Russia	TEREFWORK, 1998	Nt	2
HAMBI 503	LMG 15144, 59A2	<i>Galega officinalis</i>	USA	LINDSTRÖM, 1989	Nt	2
HAMBI 1141/2	LMG 15146	<i>Galega officinalis</i>	New zealand	LINDSTRÖM, 1989	Nt	2
HAMBI 1147	LMG 6215	<i>Galega orientalis</i>	Russia	LINDSTRÖM, 1989	Nt	2
<i>Rhizobium gallicum</i> <i>bv. phaseoli</i>						
R4384	PHI21	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Gers, France	AMARGER et al., 1997	Nt	6
<i>R. huautlense</i>						
STM 279 ^T	LMG 18254	<i>Sesbania herbacea</i>	Sierra de Huautla,	WANG et al., 1998	Separate	Nt
<i>Rhizobium leguminosarum</i>						
NZP561	LMG 6122	<i>Trifolium repens</i>	Australia	B. JARVIS	Nt	7
<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>						
ORS 662	LMG 8819T2				IV	Nt
<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i>						
ORS 663	LMG 8820				IV	
<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. viciae</i>						
ORS 639	LMG VF39SM				IV	Nt

Table 2 continued

<i>Rhizobium mongolense</i> USDA 1844 ^T , STM 246 ^T	LMG 19141 ^T	<i>Medicago ruthenica</i>	Mongolia, China	VAN BERKUM et al.,	I	Separate
<i>Rhizobium tropici</i> IIa ORS 651	LMG 9517	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Brazil	MARTINEZ-ROMERO et	Separate	Nt
<i>Rhizobium tropici</i> IIb ORS 625 ^T		<i>Phaseolus vulgaris</i>		MARTINEZ-ROMERO et	Separate	Nt
<i>Sinorhizobium arboris</i> ORS 1755 ^T	LMG 14919 ^T	<i>Prosopis chilensis</i>	Sudan	NICK et al., 1999	Separate	Nt
<i>Sinorhizobium fredii</i> ORS 669 ^T	LMG 6217 ^T	<i>Glycine max</i>	China	JARVIS et al., 1986	Separate	Nt
<i>Sinorhizobium kostiense</i> ORS 513	LMG 15613	<i>Prosopis chilensis</i>	Soudan	NICK et al., 1999	Separate	Nt
<i>Sinorhizobium medicae</i> M 102, ORS 504	LMG 16580, HAMBI	<i>Medicago truncatula</i>	Syria	EARDLY et al., 1990	VI	9
M75	LMG 16579, HAMBI	<i>Medicago radiata</i>	Syria	EARDLY et al., 1990	Nt	9
M158	LMG 16581, HAMBI	<i>Medicago noeana</i>	Syria	EARDLY et al., 1990	Nt	9
CC169	LMG 16582, HAMBI	<i>Medicago rugosa</i>	Australia	EARDLY et al., 1990	Nt	9
<i>Sinorhizobium meliloti</i> NZP 4009	LMG 6130	<i>Medicago sativa</i>	Australia	-	Nt	9
NZP 4027 ^T , ORS 665 ^T	LMG 6133 ^T	<i>Medicago sativa</i>	Virginia, USA	-	V	9
<i>Sinorhizobium saheli</i> ORS 609 ^T	LMG 7837 ^T	<i>Sesbania cannabina</i>	Senegal	de LAJUDIE et al, 1994	Separate	Nt
ORS 611	LMG 8310	<i>Sesbania grandiflora</i>	Senegal	de LAJUDIE et al, 1994	Separate	Nt
<i>Sinorhizobium teranga</i> ORS 51	LMG 6464	<i>Sesbania rostrata</i>	Senegal	de LAJUDIE et al., 1994	Separate	Nt
ORS 1009 ^T	LMG 7834 ^T	<i>Acacia laeta</i>	Senegal	de LAJUDIE et al, 1994	Separate	Nt
<i>Sinorhizobium</i> sp. Pj 41	LMG 11934	<i>Prosopis juliflora</i>	Senegal	This work	NT	11

Table 3. Primers used for DNA amplification and sequencing

Primer name	Primer sequence	Target gene	Reference
FGPS 6	5' GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA G 3'	16S rDNA	NORMAND et al., 1992
FGPS 1509	5' AAG GAG GGG ATC CAG CCG CA 3'	16S rDNA	NORMAND et al., 1992
16S-870f	5' CCT GGG GAG TAC GGT CGC AAG 3'	16S rDNA	SY et al., 2001
16S-1080r	5' GGG ACT TAA CCC AAC ATC T 3'	16S rDNA	SY et al., 2001
16S-370f	5' GGC AGC AGT GGG GAA TAT TG 3'	16S rDNA	SY et al., 2001
16S-1924 rev	5' GGC ACG AAG TTA GCC GGG GC 3'	16S rDNA	SY et al., 2001
FGPL2054'	5' CCG GGT TTC CCC ATT CGG 3'	23S rDNA	NORMAND et al., 1992
*Br5	5' CTT GTA GCT CAG TTG GTT AG 3'	RNA ^{ite}	WILLEMS et al., 2001b

Table 4. Recapitulative results of root nodule symbionts from arid wild legumes in Tunisia

Subfamily	Genus	Species	Plant Characteristics	Symbiont*		Number of isolates
				Genus	Closest species	
Mimosoideae						
Acacieae	<i>Acacia</i>	<i>A. tortilis raddiana</i>	Perennial	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	1
Papilionoideae						
Galegeae	<i>Astragalus</i>	<i>A. armatus</i>	Perennial	<i>Rhizobium</i>	<i>R. mongolense</i>	1
					<i>R. leguminosarum</i>	1
		<i>A. cruciatus</i>	Annual	<i>Rhizobium</i>	<i>R. galegae</i>	1
		<i>A. gombiformis**</i>	Perennial	<i>Rhizobium</i>	<i>R. mongolense</i>	1
Genisteae	<i>Argyrolobium</i>	<i>A. uniflorum</i>	Perennial	<i>Rhizobium</i>	<i>R. galegae</i>	3
					<i>R. giardinii</i>	1
				<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. meliloti</i>	10
					<i>S. terangae</i>	1
	<i>Calycotome</i>	<i>C. villosa**</i>	Perennial	<i>Rhizobium</i>	<i>R. mongolense</i>	2
	<i>Genista</i>	<i>G. microcephala**</i>	Perennial	<i>Rhizobium</i>	<i>R. mongolense</i>	1
					<i>R. leguminosarum</i>	1
Hedysareae	<i>Ebenus</i>	<i>E. pinnata**</i>	Perennial	<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. ciceri</i>	1
	<i>Hedysarum</i>	<i>H. carnosum</i>	Annual	<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. meliloti</i>	1
Loteae	<i>Anthyllis</i>	<i>A. henoniana</i>	Perennial	<i>Rhizobium</i>	<i>R. galegae</i>	4
					<i>R. leguminosarum</i>	2
					<i>R. mongolense</i>	3
	<i>Coronilla</i>	<i>C. scorpioides</i>	Annual	<i>Rhizobium</i>	<i>R. leguminosarum</i>	1
	<i>Hippocrepis</i>	<i>H. bicontorta</i>	Annual	<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. meliloti</i>	1
	<i>Lotus</i>	<i>L. argenteus</i>	Perennial	<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. mediterraneum</i>	1
		<i>L. creticus</i>	Perennial	<i>Rhizobium</i>	<i>R. mongolense</i>	1

Table 4 continued

					<i>R. galegae</i>	1
				<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. meliloti</i>	1
				<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>	2
Trifolieae	<i>Medicago</i>	<i>L. roudairei</i> **	Perennial	<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. meliloti</i>	1
		<i>M. marina</i>	Perennial	<i>Rhizobium</i>	<i>R. galegae</i>	1
		<i>M. sativa</i>		<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. meliloti</i>	3
		<i>M. truncatula</i>	Annual	<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. meliloti</i>	8
		<i>Ononis</i>	<i>O. natrix subsp. filifolia</i>	Perennial	<i>Rhizobium</i>	<i>R. galegae</i>
Vicieae	<i>Lathyrus</i>	<i>L. numidicus</i> **	Annual	<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. meliloti</i>	1
				<i>Rhizobium</i>	<i>R. leguminosarum</i>	1

* as identified by polyphasic approach

** nodulation described for the first time by JEDER et al. [20]

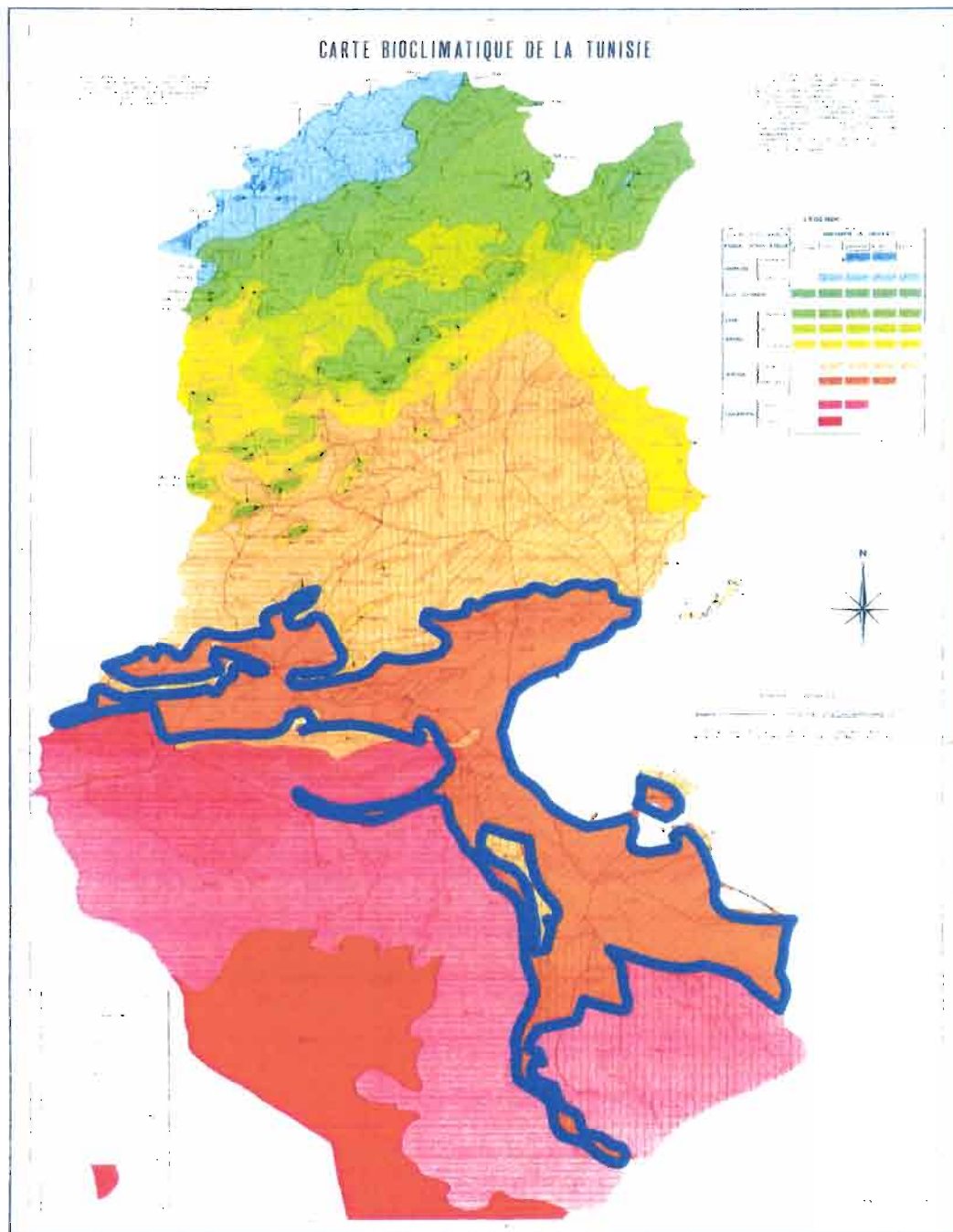


Fig. 1. Bioclimatic map of Tunisia. LNB were all sampled in the infra arid zone (orange zone). From LE FLOCH and GROSSMANN (1998).

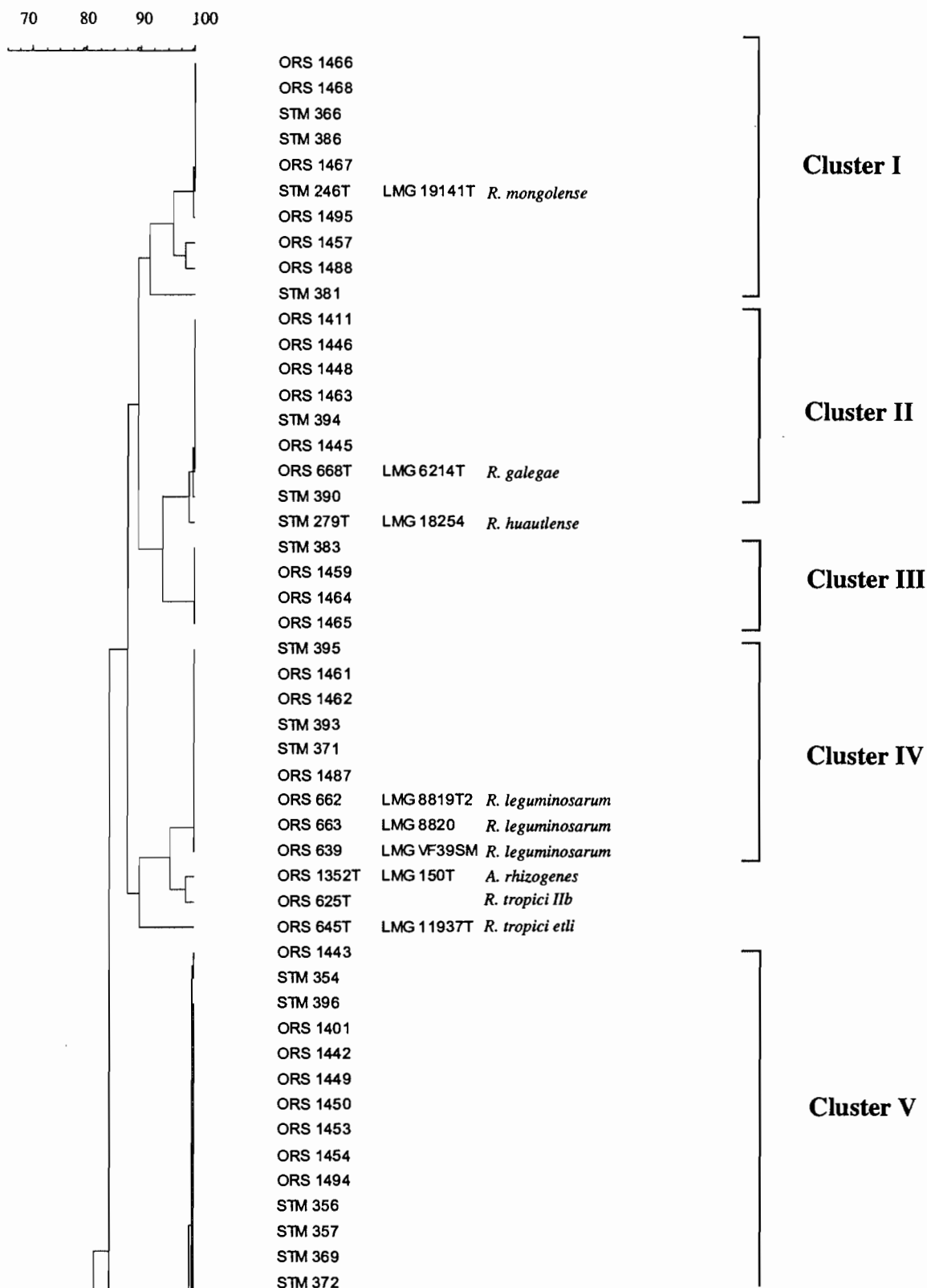


Fig. 2 Dendrogram based on the unweighted pair group method using average linkage (UPGMA) clustering of Dice correlation values (S_D) of normalised and combined ARDRA patterns (*MspI*, *CfoI*, *HinfI*, *RsaI*, *NdeII*, *AluI*, *TaqI*) of Tunisian isolates and reference strains.

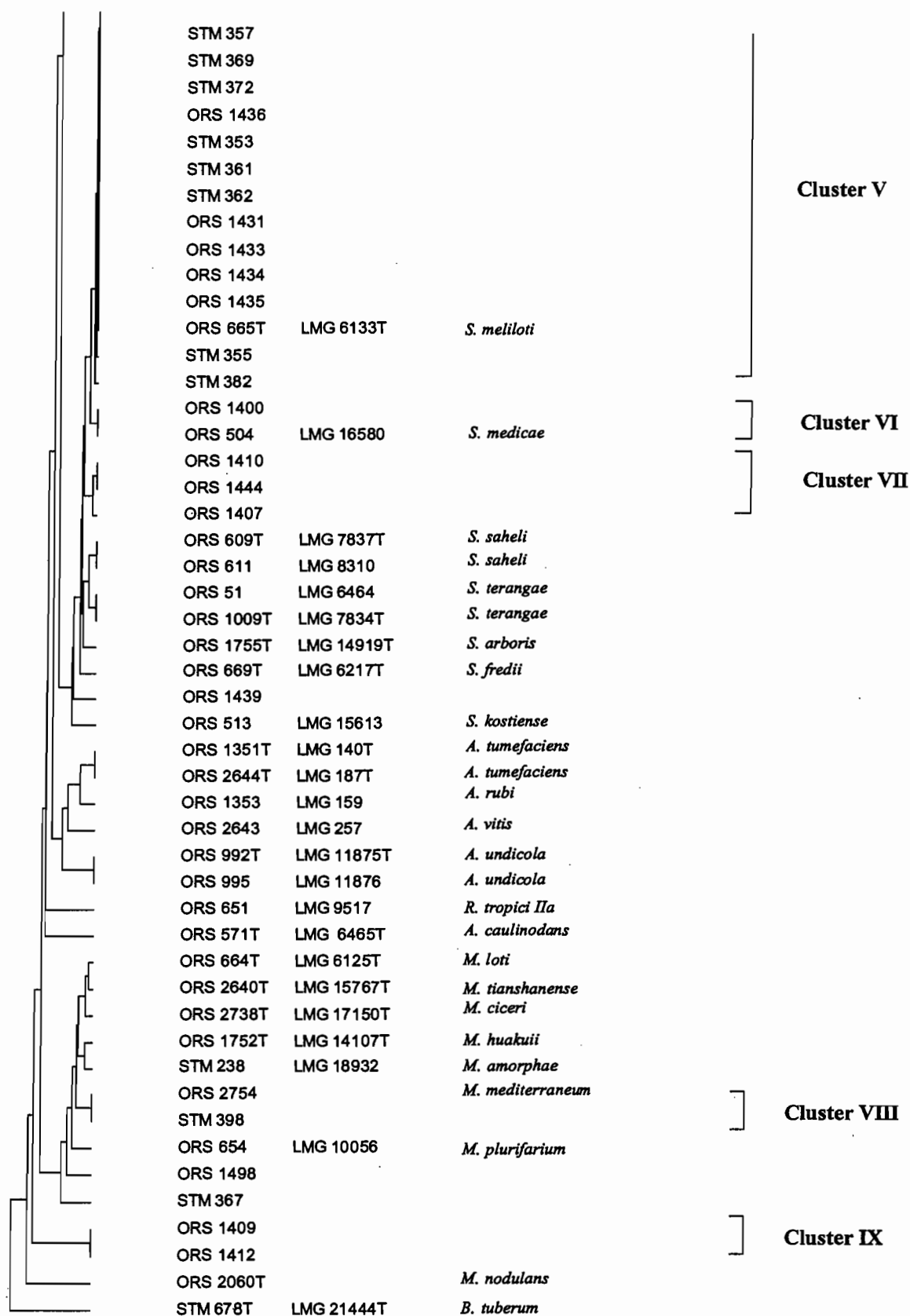


Fig. 2 suite

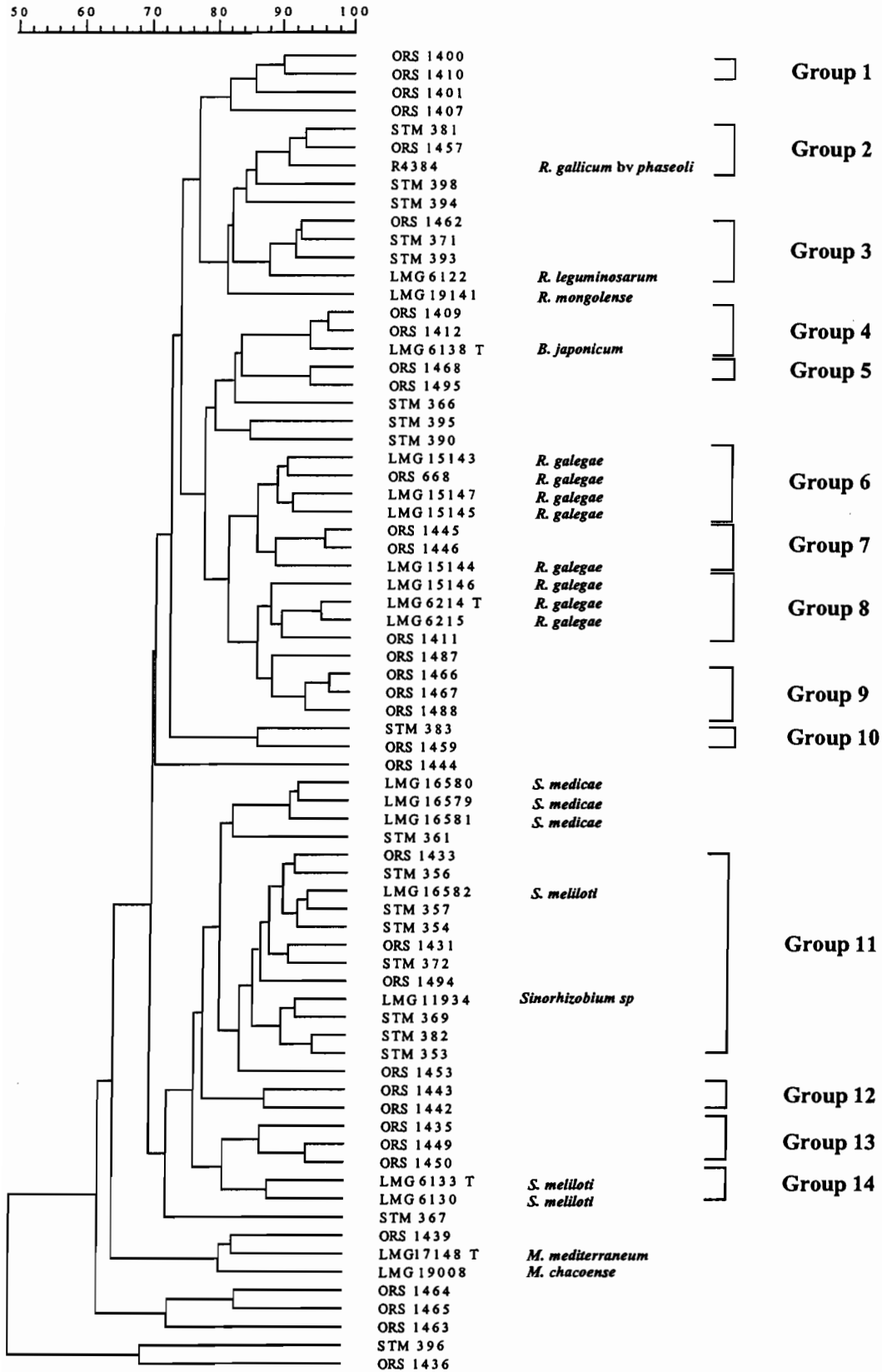


Fig.3 Dendrogram showing the relationships between the electrophoretic protein patterns of tunisian wild legume isolates using GelCompar 4.2 software package. The mean correlation coefficient (r) was represented as a dendrogram and calculated by the unweighted average pairs grouping method (UPGMA)

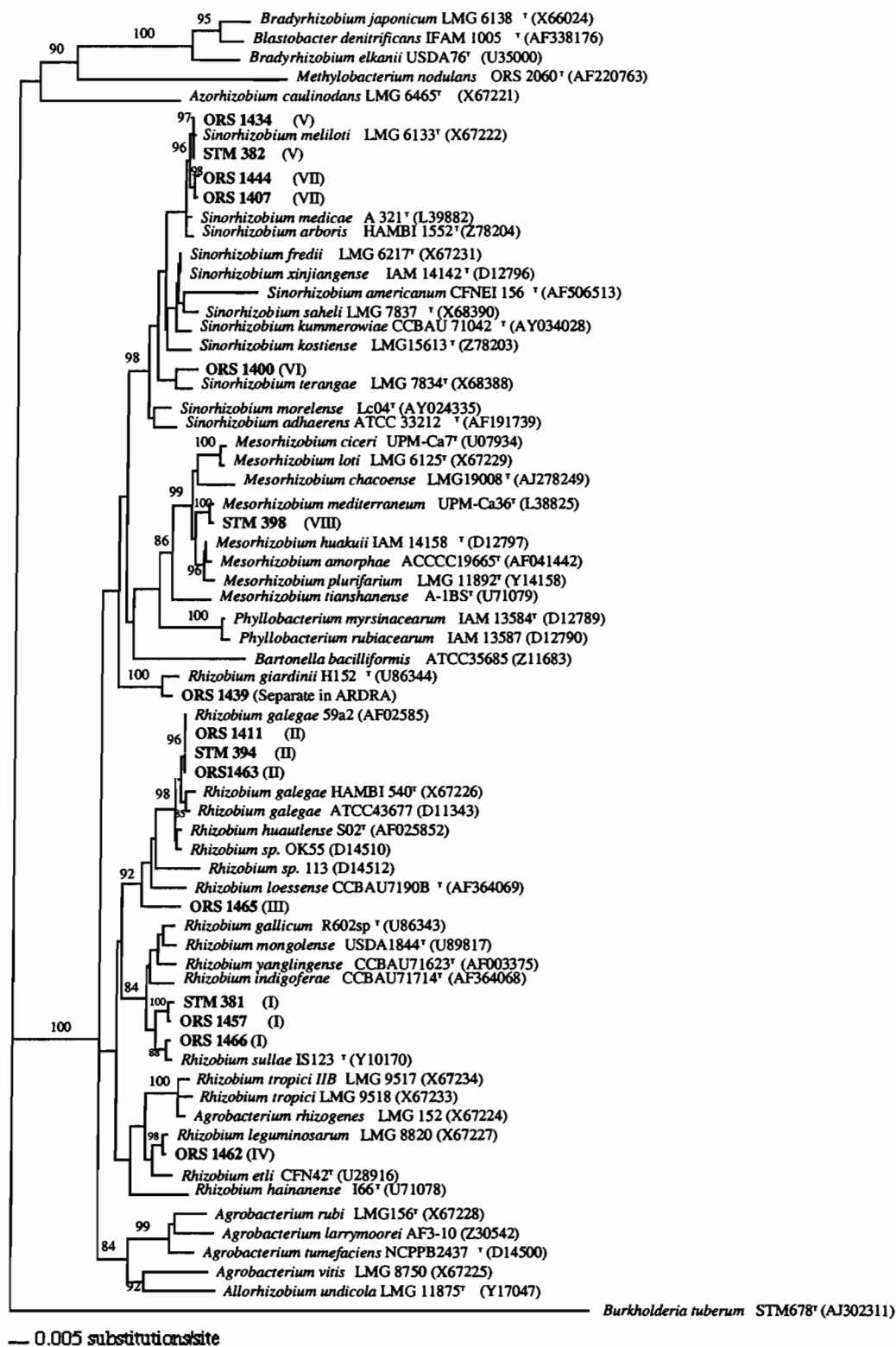


Fig. 4. 16S rRNA gene sequence-based dendrogram obtained by neighbour-joining method, showing the phylogenetic positions of representative strains for each ARDRA cluster. Roman numbers between brackets indicate the ARDRA cluster of the strain. New sequences are in bold. Numbers at branching points indicate significant bootstrap percentages (> 80) derived from 1000 samples. The tree is rooted on *B. tuberum*.

Unusual bacteria associated to root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for *nifH* gene-like within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*

Frédéric Zakhia¹, Habib Jeder², Anne Willems³, Monique Gillis³, Bernard Dreyfus¹ and Philippe de Lajudie^{1*}.

¹Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes. Montpellier. France.

²Institut des Régions Arides, Nahal-Gabès. Tunisia.

³Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgium.

*Corresponding Author

LSTM UMR113 IRD/CIRAD/AGRO-M/UM II/USC-INRA, Campus International de Baillarguet, TA10 / J, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Tél. ++33-467-593-851 ; Fax : ++33-467-593-802

Email: P-De.Lajudie@mpl.ird.fr

Running title: Bacteria associated to spontaneous legumes in Tunisia

Key words : *Inquilius* – *Starkeya* – *Bosea* – *Phyllobacterium* – *Ochrobactrum* – *Paracraurococcus* – *Rhodopseudomonas* – *Sphingomonas* – *Pseudomonas* – *Microbacterium* – *Agromyces* – *Ornithinococcus* – *Bacillus* – *Paenibacillus* – root nodules – legume – arid regions – *nifH*.

Summary

We characterized 34 endophytic bacterial isolates associated to root nodules collected from spontaneous legumes in the arid zone of Tunisia by 16S rDNA PCR-RFLP, whole cell protein SDS-PAGE, 16S rDNA and 16S-23S rDNA IGS sequencing. Phylogenetically, these isolates belong to the branches containing the genera *Inquilinus*, *Bosea*, *Rhodopseudomonas*, *Paracraurococcus*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Starkeya*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Agromyces*, *Microbacterium*, *Ornithinicoccus*, *Bacillus* and *Paenibacillus*. These strains did not induce nodule formation when inoculated on the wide host spectrum legume species *Macroptilium atropurpureum* (Siratro). However *nifH* sequences, most similar to those of *Sinorhizobium meliloti*, were detected within strains of the genera *Microbacterium*, *Agromyces*-like, *Starkeya* and *Phyllobacterium*-like strains.

INTRODUCTION

Legume Nodulating Bacteria (LNB) are soil bacteria that can establish a symbiosis with Legume plants. During specific interactions with legumes, these bacteria enter root tissues via root hairs or directly via wounded tissues ("crack entry") and induce nodule formation on roots and/or shoots (DOMMERGUES et al., 1999). Inside the nodule, they fix dinitrogen to the benefit of the plant. Until recently, all known LNB belonged to genera within the α class of Proteobacteria namely *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, (ZAKHIA and de LAJUDIE, 2001). During the past three years, the investigation of new nodule isolates has led to the discovery of LNB in unexpected genera in the α proteobacteria, i.e. *Methylobacterium* (Sy et al., 2001), *Devosia* (RIVAS et al., 2002) and *Blastobacter* (VAN BERKUM and EARDLY, 2002), and even more surprisingly belonging to the β proteobacteria, i.e. *Burkholderia* (MOULIN et al., 2001) and *Ralstonia* (CHEN et al., 2001).

Bacteria are abundant in soils - up to 10^9 cells per gram (RANJARD et al., 2000) - and diverse - a minimum of 4000 - 7000 different bacterial genomes per gram (TORSVIK et al., 1990). Therefore plants are constantly involved in interactions with a wide range of bacteria and a number of plant-associated bacteria colonize the rhizosphere (rhizobacteria), the phyllosphere (epiphytes) and the inside of plant tissues (endophytes). Several authors have reported techniques for plant endophyte isolation (LODEWYCKX et al., 2002; KOBAYASHI and PALUMBO, 2000). Our group showed that some photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strains can both induce nitrogen-fixing stem nodules on *Aeschynomene* spp. and be natural endophytes of rice roots in Africa (CHAINTREUIL et al., 2000). Other LNB have been reported to enter beneficial endophytic associations with cereals, i.e. *Rhizobium leguminosarum* with rice and wheat in Egypt (YANNI et al., 1997; BISWAS et al., 2000; YANNI et al., 2001; DAZZO et al., 2003) or *Rhizobium etli* with maize (GUTIERREZ-ZAMORA and MARTINEZ-ROMERO, 2001). Some nitrogen-fixing bacteria are endophytic of rice like *Serratia marcescens* (GYANESHWAR et al., 2001) and others have been shown to be Plant Growth Promoting (PGP) endophytes like *Acetobacter*, *Herbaspirillum* (RIGGS et al., 2001), *Burkholderia* (ESTRADA et al., 2002; COENYE and VANDAMME, 2003), *Azoarcus* (REINHOLD-HUREK et al., 1993). More and more plant associated bacteria are characterised like bacteria of the genera *Microbacterium*, *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Curtobacterium* able to colonize tissues of agronomic and prairie plants (ZINNIEL et al., 2002). Endophytic *Bacillus* strains were isolated from soybean root nodules (BAI et al., 2002). Therefore, internal colonization of plants by various endophytic bacteria is not necessarily pathogen and may be beneficial to the plant. Although the contribution of endophytic diazotrophic bacteria in fixed nitrogen is very low in comparison to that provided by LNB to the legumes (LADHA and REDDY, 2000), some plants (Brazilian sugarcane varieties) have been shown to derive a substantial percentage of their nitrogen requirements from N_2 fixation (BODDEY et al., 1995).

On the other hand, *Agrobacterium* strains have been isolated from nodules of many legume species (de LAJUDIE et al., 1999), but no definitive explanation of the presence of these bacteria inside nodules could be demonstrated.

We previously investigated nodulation of 42 spontaneous wild legumes in the arid zone of South Tunisia, where rainfalls do not exceed 180 mm (JEDER et al., 1996). We characterized 60 LNB associated to 19 of these legumes by a polyphasic approach (ZAKHIA et al., submitted) and identified them as *Rhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp. and *Bradyrhizobium* sp. In the time course of isolation of these LNB, we obtained 34 more bacterial isolates belonging to genera where no LNB were described so far, and on characterization of which we report here. We first performed 16S ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), a technique described as a convenient grouping method for several kinds of bacteria like LNB (LAGUERRE et al., 1994; TEREFEWORK et al., 1998; NICK, 1999), bacteria belonging to the genera *Brevibacterium* (CARLOTTI et al., 1994), *Bacillus* and *Paenibacillus* (HEYNDRICKX, et al., 1996). We also performed SDS-PAGE technique also widely used for taxonomic analysis of many taxons, i.e. in *Clostridium* (CATO et al., 1982), *Xanthomonas*, *Campylobacter*, lactic acid bacteria (VANDAMME et al., 1996) and LNB (de LAJUDIE et al., 1994; 1998a; 1998b; NICK et al., 1999). We also submitted strains to 16S rDNA sequencing, which is most commonly applied for bacterial phylogenetic studies (WOESE, 1987). For strains found phylogenetically close to in *Bradyrhizobium* where 16S rDNA is much conserved among species, we performed partial sequencing of the 16S-23S rDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) known to be more resolutive (Willems et al., 2001). New isolates were screened for nodulation capacity. Since seeds of their original plants of isolation were not available (except for *Retama raetam*), we performed nodulation tests on *Macroptilium atropurpureum*, a legume species known to be nodulated by a wide range of LNB. Presence of *nodA* and *nifH* genes was looked for by PCR amplification.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strain and culture media

The new isolates and their plants of isolation are listed in Table 1. Reference strains included in our study are listed in Table 2. All strains were maintained on yeast mannitol agar (YMA) (VINCENT, 1970) at 28°C, containing (g L⁻¹): mannitol, 10; sodium glutamate, 0.5; K₂HPO₄, 0.5; MgSO₄.7H₂O, 0.2; NaCl, 0.05; CaCl₂, 0.04; FeCl₃, 0.004; yeast extract (Difco), 1; pH 6.8; agar, 20. All strains were stored at -80 °C on the same medium plus 20 % v/v glycerol. For protein preparations we used Tryptone-Yeast Extract medium (TY) containing (in g L⁻¹, pH 6.8 to 7): tryptone (Oxoid), 5; yeast extract (Oxoid), 0.75; KH₂PO₄, 0.454; Na₂HPO₄.12H₂O, 2.388; CaCl₂, 1; LabM agar, 20.

Bacterial isolation procedure

Naturally occurring root nodules were collected *in natura* and either directly used for bacterial isolation or stored dried in tubes containing CaCl₂ (DATE, 1982). Upon utilisation, nodules were rehydrated in sterile water and surface sterilised by immersion in Calcium hypochlorite (3 %) for 5 min. The nodules were then aseptically rinsed 8 times with sterile water, crushed in a drop of sterile water and the suspension was streaked on YMA in Petri dishes. Colonies appeared after several days of incubation at 28°C in aerobic conditions. They were checked for purity by repeated streaking on YMA and by microscopic examination of living cells. *Microbacterium* strains (For which we have a doubt of purity) were checked for purity using Gram stains (Biomérieux), according to the manufacturer instructions. Isolates were stored at – 80°C in YM adjusted to 20 % (v / v) glycerol.

Plant cultivation and nodulation tests

As seeds of the original host plants were not available (except for *Retama raetam*), we used *Macroptilium atropurpureum* for nodulation tests. Seeds were surface sterilised with 96 % sulphuric acid. The time for treatment with H₂SO₄ was as follow: *M. atropurpureum*: 20 min, *Retama raetam*: 15 minutes. Seeds were then washed 10 times with sterile water to remove all traces of acid. Then they were placed into sterile water for 24 hours at 4°C. The seeds were then incubated in sterile Petri dishes containing 10 % water agar for 24 h to 48 h at obscurity to allow germination. Plants were then transferred to tubes containing Jensen seedling slant agar (VINCENT, 1970) for root nodulation trials (3 plants were routinely tested with each strain). Plants were grown under continuous light (20 W / m²) at 28°C and inoculated using 1 mL of YM bacterial suspension in exponential stage of growth. Roots were observed for nodule formation during 6 – 8 weeks after inoculation.

Analysis of protein electrophoretic patterns

All strains were grown at 28°C for 48 h in Roux flasks on buffered TY medium. Whole cell protein extracts were prepared from 80 mg cells and SDS-PAGE was performed using small modifications of the procedure of LAEMMLI (1970), as described previously (de LAJUDIE et al., 1994). The normalised densitometric traces of the protein electrophoretic patterns were grouped by numerical analysis, using the Gel-Compar 4.2 software package (VAUTERIN & VAUTERIN, 1992). The similarity between all pairs of traces was expressed by the Pearson product moment correlation coefficient (r) converted for convenience to a percent value (POT et al., 1989; 1994).

DNA preparation

Cells from 2-3 day old YMA plate cultures were suspended in sterile water and washed twice. The optical density at 620 nm (O. D.) was then measured, and a volume corresponding to 200 μL matching an O. D. (620 nm) = 1 was centrifuged at 12 000 rpm during 2 min. The cell pellet was suspended in 100 μL of sterile water. 100 μL of Tris-Cl (10 mM, pH 8,3) and 20 μL of proteinase K (1 mg L⁻¹ solution) (Promega, Madison WI USA) were successively added. After 2h incubation at 55°C, proteinase K was denaturated by incubation 10 min in boiling water. The solution was then centrifugated at 14 000 rpm for 10 min. The supernatant containing DNA was stored at - 20°C until use.

16S ARDRA

Nearly full-length 16S ribosomal DNA was amplified using the universal eubacterial 16S rDNA primers FGPS6 and FGPS1509 (Table 3). PCR amplification was carried out in a 50 μL reaction mixture containing template DNA (2 μL), 5 μL of reaction buffer (Invitrogen, USA), 1,5 μL of MgCl₂ 50 mM, 4 μL of dNTP 2,5 mM each (Sigma-ALDRICH, Germany), 2 μL of each primer (20 μM) (Biotech AG), 1 unit of *Taq* polymerase (Invitrogen, USA) and 33,2 μL of sterile Milli-Q water. A negative control without template was included in every PCR run. Amplification was performed in a Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer, Nieuwerkerk a / d Ijssel, The Netherlands) using the following program : initial denaturation (5 min at 94°C), 35 cycles of denaturation (30 sec at 94°C), annealing (30 sec at 55°C) and extension (7 min at 72°C), and final extension (7 min at 72°C).

PCR products were checked by electrophoresis in 1 % agarose gel in TAE buffer (40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA, pH 8,3) containing 2 drops of 0,5 mg / mL ethidium bromide.

For ARDRA analysis, 10 μL aliquots of PCR products were digested with *MspI*, *CfoI*, *HinfI*, *RsaI*, *AluI*, *NdeII*, *TaqI* (LAGUERRE et al., 1994) during 2 hours in a 20 μL final volume as specified by the manufacturer (Promega) but with an excess of enzyme (5 units per reaction). Restriction fragments were analysed by horizontal gel electrophoresis using 3 % Metaphor agarose (FMC bioproducts USA) in TBE buffer (89 mM Tris-Borate, 2 mM EDTA, pH 8,3) containing 2 drops of 0,5 mg.mL⁻¹ ethidium bromide. The electrophoresis was performed using a 15 x 10 cm tray, 12 wells (Easy Cast, Electrophoresis system Model # B1, OW1, Scientific Inc.) at 50 V during 15 min and at 80 V for 3 hours. The gel images were scanned, digitised and stored in a computer using Perfect Image software (V-5.3, Clara Vison, Germany). Profiles were normalised, combined and clustered using the Gel-Compar II 2.5 software package (Applied Maths) (VAUTERIN & VAUTERIN, 1992). Dice coefficient and UPGMA clustering were used.

16S rDNA sequencing

PCR products of 16S rRNA gene were run on a 1% agarose gel, band was excised and DNA purified using a QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and sequenced by using the primers FGPS6, FGPS1509, 16S-370f, 16S-1080r, 16S-870f and 16S-1924r (Table 3). Sequence reactions were performed using the ABI Prism BigDye Terminator Cycle sequence kit (Applied Biosystem, Foster City, Calif.) and analysed on an Applied Biosystems model 310 DNA sequencer. Sequences were assembled using the Autoassembler program (Perkin Elmer) and aligned with Clustal X and Genedoc softwares. Phylogenetic tree was constructed using the neighbor joining algorithm (SAITOU and NEI, 1987) with PAUP 4 software and the stability of the groupings was assessed by performing a bootstrap analysis. For partial 16S rDNA sequencing, we used either FGPS6, FGPS1509 or 16S-1080r.

16S-23S rDNA (IGS) sequencing

The internal spacer of 16S-23S rDNA region was amplified using the primers 16S-870f and FGPL2054' (Table 3). A touch down PCR (DON et al., 1991) was performed with a Perkin Elmer model 2400 thermocycler. In a total volume of 25 μ L the reaction mixture contained 2 μ L of the bacterial suspension, 2,5 μ L of 10 X buffer (Eurogentec), 1,5 μ L 25 mM MgCl₂, 2 μ L of dNTPs (2,5 mM each), 1 μ L of each primer (20 μ M), one unit Taq DNA polymerase (GIBCO BRL). The amplification was performed using the following program: "Touchdown" PCR consisting of an initial denaturation step (96°C, 5 min), followed by 20 cycles of denaturation (96°C, 30 s), annealing (from 65°C to 55°C, 30 s) and extension (72°C, 90 s), followed by 20 cycles of denaturation (96°C, 30 s), annealing (55°C, 30 s), extension (72°C, 90 s) and final extension (72°C, 7 min). The PCR products were purified using a Quiaquick PCR purification kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and sequenced using the primers Br5* as described by WILLEMS et al. (2001), and FGPL2054' (NORMAND et al., 1992).

Amplification and sequencing of *nifH* genes

Presence of *nifH* sequences was checked by amplification using a *nested* PCR (BEYER et al., 1995; EL FANTROUSSI et al., 1997) with three primers (Table 3) as described by WIDMER et al., (1999). The first PCR was performed with the forward primer *nifH*(forA) and the reverse primer *nifH*(rev). The second (nested) PCR was performed with the forward primer *nifH*(forB) and the same reverse primer *nifH*(rev). The expected band size was of 370 bp.

The two PCR were carried out in a 25 μ L reaction volume (the reaction mixture is the same as described for IGS amplification except addition of 1,25 μ L of 1 % W-1 solution). The template for the first PCR was 2 μ L of DNA, the template for the second one was 2 μ L from the first PCR product.

After an initial denaturation consisting of 5 min at 95°C, The cycling conditions were as follows (for both PCR): denaturation for 11s at 94°C and for 15s at 92°C, annealing for 8s at 48°C and for 30s at 50°C, and extension for 10s at 74°C and for 10s at 72°C. A final 10-min extension step at 72°C was performed after the cycling steps. We performed 40 cycles for both PCR. The nested PCR products were visualized using a 2 % agarose gel and the bands corresponding to 370 bp were excised, purified by Qiaquick kit and sequenced (as described above) using the same primers as for the nested PCR. Sequences were assembled, aligned and a phylogenetic tree was drawn as described above (Fig. 4)

Amplification of *nodA* gene

Primers *nodA*fbrad and *nodA*rbrad (Table 3) were used for *nodA* amplification. A touch down PCR (DON et al., 1991) was performed using the following conditions: an initial denaturation step (94°C, 5 min), followed by 20 cycles of denaturation (94°C, 30s), annealing (from 60°C to 50°C, 30s) and extension (72°C, 42s), followed by 22 cycles of denaturation (94°C, 30s), annealing (50°C, 30s), extension (72°C, 42s) and final extension (72°C, 7 min). The bands corresponding to the expected size (550 to 600 bp) were cut, purified and sequenced as described above. A positive control was added (Strain ORS 2060^T of *Methylobacterium nodulans*) for which these primers were originally designed (SY et al., 2001).

RESULTS

Collection of new bacterial isolates

Nodules were collected from wild legumes in the infra-arid zone of Tunisia. Classical procedure was performed for nodule surface sterilisation and bacterial isolation. Beside nodule forming bacteria (LNB) characterised as *Rhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp. and *Bradyrhizobium* spp. (ZAKHIA et al., submitted), other colonies grew on YMA. A total of 34 isolates were obtained from nodule samples of the legume species *Argyrolobium uniflorum*, *Astragalus algerianus*, *Astragalus armatus*, *Astragalus gombiformis*, *Calycotome villosa*, *Hedysarum carnosum*, *Lathyrus numidicus*, *Lotus argenteus*, *Medicago truncatula*, *Ononis natrix subsp. falcata*, *Ononis vaginalis*, *Retama raetam* (Table 1).

16S ARDRA analysis

(For the sake of clarity, the word cluster is used for ARDRA grouping and the word group is used for SDS-PAGE grouping).

Thirty-two new isolates were characterised by ARDRA. We included reference strains representative for known LNB species in our study (Table 2). 16S ribosomal DNA was PCR-amplified and all strains produced a single band of the expected size of approximately 1500 bp. Profiles obtained with 7 restriction enzymes were combined and analysed using the GelCompar II version 3.0 software. The resulting patterns matched 3 to 5 bands (*NdeII*, *RsaI*, *TaqI*, *AluI*), 5 to 6 bands (*HinfI*, *MspI*) or 3 to 6 bands (*CfoI*). Altogether, the combined profiles resulted in around 38 bands for cluster analysis. Reproducibility of the method was assessed on several reference species and different strains of a given species shared the same profiles. Results are shown as a dendrogram on Fig. 1 and recorded on Table 1. New isolates grouped separately from reference strains and formed 8 main clusters (I to VIII). Cluster I (52,29 % similarity level), heterogenous, contains 3 new isolates. Cluster II (100 % similarity level), contains 3 new isolates. Cluster III (89,95 % similarity level) consists of 3 isolates. Cluster IV (75,20 % similarity level) consists of 2 new isolates. Cluster V (65,15 % similarity level) comprises 3 new isolates. Cluster VI (75,10 % similarity level) was the largest cluster with 6 strains. Cluster VII (76,11 % similarity level) consists of 2 new isolates. Cluster VIII (50,6 % similarity level), heterogenous, includes 4 new isolates. Strains STM 379, STM 388, STM 392, ORS 1437, ORS 1473, ORS 1478, ORS 1481 had separate positions.

SDS-PAGE analysis

The results of SDS-PAGE analysis are presented as a dendrogram (Fig. 2 and recorded in Table 1). As expected, none of the new isolates grouped with any of the reference strains. Only 3 groups could be delineated at a level of 90 %: Group 1 (STM 379 and STM 368) which consists of one strain from ARDRA Cluster VII and one strain with separate position in ARDRA. Group 2 consisting of ORS 1421, ORS 1422 (ARDRA cluster VI) and ORS 1419 (ARDRA cluster II). The Group 3 contains ORS 1402 and ORS 1403 (ARDRA Cluster II).

16S rDNA sequencing

We performed DNA sequencing on almost all isolates (Table 1). The nearly full-length 16S rDNA sequences of 15 strains was determined. The results of analysis are shown as a phylogenetic tree (Fig. 3). The studied strains are distributed close to genera different from known LNB such as *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Bosea*, *Phyllobacterium*, *Starkeya*, *Sphingomonas*, *Paracraurococcus* and *Microbacterium*. In addition, partial 16S rDNA sequencing was performed for 17 strains (Table 1). Closest matches included *Inquilinus*, *Ornithinicoccus*, *Agromyces*, *Bacillus*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus*.

IGS DNA sequencing

According to 16S rDNA sequencing results, strains ORS 1414, ORS 1496 and STM 358 belong to the Bradyrhizobiaceae family. We thus performed IGS DNA sequencing on two of these strains (ORS 1414, STM 358) and compared the obtained sequences with all the *Bradyrhizobium* ITS sequences of our database and also with those of *Afipia*, *Rhodopseudomonas*, *Nitrobacter* and *Blastobacter* (FIG ? SEE ANNE). Sequences of ORS 1414 and STM 358 grouped outside all of these and are the most peripheral of the dendrogram. On the basis of these partial sequences it appears that the two strains are not that close to all these genera. It would be needed to sequence the ITS region of real *Bosea* strains, but these are not available in our research groups. Moreover, the two strains, having an ITS sequence similarity of only 59%, seem to belong to different species and maybe even to different genera.

Amplification and sequencing of *nifH* genes

Eighteen strains (see Table 1) were tested for presence of *nifH* gene-like sequences by PCR amplification. Amplificates of the expected size (370 bp) were produced by only 10 strains. The PCR products of these strains were sequenced and only seven sequences showed homology to *nifH* sequences (as revealed by NCBI blast, Table 4). These sequences corresponded to isolates previously identified as *Microbacterium* sp., *Agromyces* sp. and *Phyllobacterium* sp. The phylogenetic analysis (Fig. 4) showed that these sequences are all closely related to that of *S. meliloti*. No amplification could be obtained using forward primer *nifH*(forB) with strains ORS 1403 and ORS 1474. ORS 1403 reverse sequence was 95 % homologous with *Sinorhizobium xinjiangense nifH* gene while ORS 1474 reverse sequence showed 90 % homology with *S. meliloti nifH* gene.

Nodulation tests and *nodA* gene amplification

Nodulation tests on *M. atropurpureum* and *Retama raetam* were negative with all the tested strains. However, some strains (ORS 1414, STM 358, ORS 1419, ORS 1474, STM 397, STM 385, ORS 1432, ORS 1481) had some effect on plant roots which became inflated. The plants with inflated root didn't show any pathogenic symptom and sometimes the foliage color was similar to control plants. Strain ORS 1472 induced a black color covering *M. atropurpureum* and *R. raetam* roots. On the other hand, 15 strains (see Table 1) were screened for *nodA* gene by PCR. No amplification could be obtained using primers designed from *Bradyrhizobium nodA* gene alignment (Table 3).

DISCUSSION

During bacterial isolation from root nodules of spontaneous legumes in the arid zone of Tunisia, we obtained 32 strains belonging to genera not known to include LNB. These bacteria are, if not inside the nodule tissue, at least intimately associated to it since they survived to standard nodule surface sterilisation. Sterility of the water used for the last rinsing of the nodules was checked by inoculation on YMA agar plates and incubation. It was most interesting to characterise these strains since several new LNB were recently found in genera unexpected to include LNB so far (SY et al, 2001; MOULIN et al, 2001; CHEN et al., 2001; RIVAS et al., 2002; VAN BERKUM and EARDLY, 2002;) and to obtain more information on bacterial community inhabiting nodules or intimately associated to root (nodule) rhizoplane. To characterise these new isolates we performed 16S ARDRA, SDS-PAGE of total cell proteins, 16S and ITS rDNA sequencing. Both in ARDRA and SDS-PAGE analyses, the new isolates appeared rather diverse and externally distributed from reference strains of known LNB. Some degree of inconsistency was observed between results from SDS-PAGE and ARDRA, i.e. SDS-PAGE group 1 which encompasses strains from ARDRA Clusters VII and an ARDRA separate strain; Group 2 includes strains from ARDRA Clusters II and VI.

The 16S rDNA sequencing results revealed that these strains belong to 3 different *phyla*: the Proteobacteria (gram-negative), the Actinobacteria and the Firmicutes (gram-positive). Within the Proteobacteria, 23 isolates belong either to the α -class (*Bosea*, *Starkeya*, *Phyllobacterium*, *Sphingomonas*, *Inquilinus*, *Ochrobactrum*, *Rhodopseudomonas*) and 2 isolates to the γ -class (*Pseudomonas*). Within the Actinobacteria, 7 isolates grouped in *Microbacterium*, *Agromyces*, *Mycobacterium*, *Ornithinicoccus* all belonging to Actinomycetales order. 2 isolates grouped in *Bacillus* and *Paenibacillus* inside the Firmicutes *phylum*.

Proteobacteria were distributed in ARDRA Clusters I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII or had ARDRA separate positions.

Together with the two other strains of ARDRA Cluster I, strain STM 358 belongs to the genus *Bosea* since its 16S rDNA sequence is 99 % similar to that of *Bosea thioxidans*. The genus *Bosea* and *B. thioxidans* were described for the first time by DAS et al. (1996) to designate a bacterial isolate from agricultural soil. Since then, the genus was emended and now encompasses 4 *Bosea* species (LA SCOLA et al., 2003 ; OUATTARA et al., 2003). Phylogenetically, this genus belongs to the *Bradyrhizobiaceae* family. According to the standards established in *Bradyrhizobium* (WILLEMS et al., 2001), results from ITS sequence analysis suggest that *Bosea* strains from Tunisia represent different species since they share only 59 % ITS sequence similarity. Unfortunately, no ITS sequence from *Bosea* is available in Genbank for comparison. We couldn't evidence nodulation capacity among these strains nor could we amplify any *nodA* gene.

Strains ORS 1420, STM 370 and STM 391 are phylogenetically close to *Phyllobacterium myrsinacearum* on the basis of their 16S rDNA sequences (Table 1). The genus *Phyllobacterium* (KNÖSEL, 1984) was proposed to accommodate bacteria isolated from leaf nodules of Rubiaceae and Myrsinaceae tropical plants. However, the nodulation inducing capacity of *Phyllobacterium* was never clearly demonstrated. Recently the 2 species of the genus, *P. myrsinacearum* and *P. rubiacearum*, were fused into *P. myrsinacearum* (MERGAERT et al., 2002). Some *Phyllobacterium* strains exhibit a plant growth promoting (PGP) capacity (BERTRAND et al., 2000). Nitrogen-fixing activity and presence of *nifHDK*-like genes were never demonstrated in *Phyllobacterium* (LAMBERT et al., 1990) and here attempts to amplify *nifH* DNA within ORS 1420 and STM 370 also failed. Plants inoculated with ORS 1420 and STM 370 didn't produce any root nodule but had green foliage compared to control plants suggesting a possible PGP effect. *Phyllobacterium* strains having been reported to develop inside leaf nodules, we cannot exclude the hypothesis that they may also develop in root nodules of compatible host legumes.

Strain ORS 1478, close to *Ochrobactrum* according to its partial 16S rDNA sequence, is the nearest neighbour of *Phyllobacterium* sp. strains in our ARDRA results. The genera *Phyllobacterium* and *Ochrobactrum* are known to be phylogenetically closely related between them and with the *Rhizobiaceae* (WILLEMS and COLLINS, 1993). *Ochrobactrum* strains were first isolated from human clinical samples (TATUM et al., 1974; HOLMES et al., 1988) and soil (HOLMES et al., 1988) and they were never reported as nitrogen fixers. Complete sequencing of 16S rDNA is required to precise the taxonomic position of ORS 1478 .

Three strains, ORS 1402, ORS 1403 and ORS 1419 formed a distinct ARDRA cluster (Cluster II) between *Sinorhizobium* and *Rhizobium* suggesting a separate genus. Based on their 16S rDNA sequence, these strains have *P. myrsinacearum* as their closest phylogenetic neighbour (96% sequence homology). DNA:DNA hybridisations are needed to confirm their taxonomic status. No nodulation capacity could be evidenced within these strains in our hands. Presence of *nifH*-like gene (homologous to that of *S. meliloti* or *S. xinjiangense*) in their genome (Table 4) suggests that strains ORS 1402 and ORS 1403 could be nitrogen fixers.

Strains ORS 1474 and ORS 1476 (ARDRA Cluster IV) originate from *R. raetam* root nodules. ORS 1474 16S rDNA sequence is 98 % homologous to that of *Starkeya novella*, formerly *Thiobacillus novellus* (KELLY et al., 2000), originally isolated from soil (STARKEY, 1935). *Starkeya* was recently created for *T. novellus* since it was the only species of the genus *Thiobacillus* grouping in the α -class of the Proteobacteria, the other species being members of the β Proteobacteria (KELLY et al., 2000). Within the genus *Starkeya*, no nitrogen fixing bacterium is known so far. Within *Thiobacillus*, only the species *T. ferrooxidans* is known to be a nitrogen-fixing bacterium (YOUNG, 1992). In the strain ORS 1474, which belong to *Starkeya* genus, we detected a *nifH*-like sequence close to that of *S. meliloti* (Table 4). To our knowledge, This is the first report of *nifH*-like gene in the genus

Starkeya. Attempts to amplify the forward sequence of this gene should be done again using adequate primers.

ARDRA Cluster V included *Sphingomonas*-like strains (STM 384, STM 397, ORS 1497). The genus *Sphingomonas* was created by YABUUCHI et al. (1990) for the former species *Pseudomonas paucimobilis* which was referred to as a nitrogen-fixer by BARRAQUIO et al. (1988). Strains of *Sphingomonas adheasiva* have been reported to be endophytic of rice (*Oryza sativa*) (ELBELTAGY et al., 2000). Here, we couldn't evidence nodulation capacity nor obtain *nifH* gene amplification for both STM 384 and STM 397 strains.

Members of ARDRA cluster VI (6 isolates) belong to the α proteobacteria, 2 of them (ORS 1421 and ORS 1422) forming a distinct group by SDS-PAGE analysis. Partial 16S rDNA sequencing on all isolates of cluster VI indicated their close relationship to the recently described genus *Inquilinus*, which encompasses clinical strains (COENYE et al., 2002). No report concerning plant interactions or nitrogen fixation has been done in this genus. A total 16S rDNA sequencing is required to elucidate the precise phylogenetic position of these isolates.

In our collection, ORS 1416ri is identified at the genus level by 16S rDNA sequencing as a *Rhodopseudomonas* sp. strain. *Rhodopseudomonas palustris* has been reported to be endophytic of rice (*O. ridleyi*) (ELBELTAGY et al., 2000) and some *Rhodopseudomonas* species are nitrogen-fixers (YOUNG, 1992).

The isolate ORS 1473 occupied a separate position in both ARDRA and SDS-PAGE dendrograms. The total 16S rDNA sequencing showed that the closest 16S rDNA sequence (98 % homology) was that of *Paracraurococcus ruber* (α proteobacteria) the unique species of the genus *Paracraurococcus* which was created by SAITOH (1998) for soil isolates containing bacteriochlorophyll a.

The ARDRA cluster VII consisted of two *Pseudomonas*-like strains, STM 368 and ORS 1432. The genus *Pseudomonas* formerly consisted of phylogenetically unrelated groups of proteobacteria including more than 100 validly described species (PALLERONI, 1984; SKERMAN et al., 1989). This genus has undergone many changes in its classification and the former *Pseudomonas* species are now classified in about 15 genera belonging to the α , β and γ subclasses of Proteobacteria (KERSTERS et al., 1996; ANZAI et al., 2000). The species belonging to the genus *Pseudomonas* sensu sticto are now members of the γ subclass of Proteobacteria (KERSTERS et al., 1996). *Pseudomonas* has been reported to be endophytic of pea shoot tissues (ELVIRA-RECUENCO and VAN VUURDE, 2000) or colonizing bean root surface and possibly conferring protection to bean against disease development (ANDERSON and GUERRA, 1985). Other *Pseudomonas* strains are endophytic of numerous non legume plants (LODEWYCKX et al., 2002). Nitrogen fixation has been reported for the species

Pseudomonas stutzeri (YOUNG, 1992). We couldn't succeed in amplifying *nifH* gene from the strain ORS 1432.

7 strains belonged to Actinomycetales: ARDRA cluster VIII and strains in separate positions (Fig. 1; Table 1). The genus *Microbacterium* has been emended recently to combine the genera *Microbacterium* and *Aureobacterium* (TAKEUCHI and HATANO, 1998). Some species of this genus have already been reported to be endophytes of agronomic and prairie plants (ZINNIEL et al., 2002). The genus *Agromyces* was established by GLEDHILL and CASIDA (1969) and includes filamentous bacteria, abundant in soils. The microscopic observation of the strain ORS 1437 showed no filamentous bacteria but rod shaped ones. Total 16S rDNA sequencing is needed to identify this strain. No report of endophytic *Agromyces* strains has been published so far. In our collection, the strain ORS 1481 (separate position in ARDRA) is close to the *Mycobacterium* genus according to its 16S rDNA partial sequence. The genus *Mycobacterium* is known to be the casual agents of two important diseases, tuberculosis and leprosy, but some *Mycobacterium* species are free living saprophytes found in salt water, soil and dust but could be endophytic of winter wheat root (RUPPEL, 1989). The genus *Ornithinococcus* has been created for bacteria isolated from a garden soil (GROTH et al., 1999) and no report on its endophytic ability has been published so far. Total 16S rDNA sequencing should be performed to confirm the affiliation of the strain STM 379 to this genus. None of these Actinomycetales strains was able to induce nodule formation on the tested plants. But we noticed that ORS 1472 induced a black pigment, which covered the whole root system of both *M. atropurpureum* and *R. raetam* plants. We reported (JEDER et al., 1996) that some natural occurring nodules of *R. raetam* were black. This suggests that contact with this bacterium, results in this plant reaction.

Nitrogen fixation within the Actinomycetales has been demonstrated for *Frankia* (WILLIAMS, 1989), *Arthrobacter* (CACCIARI et al., 1971), *Streptomyces* (DING et al., 1981; KNAPP, 1988) and *Propriobacterium* (BARANOVA et al., 1974). Although RAO et al. (1973) reported C₂H₂ reducing activity for some *Mycobacterium* species no further characterization was reported and YOUNG (1992) doesn't mention any nitrogen fixing activity within this genus. RUPPEL (1989) reported that *Mycobacterium* and *Microbacterium* had some low nitrogen fixing activity as measured by acetylene reducing capacity. Here we found *nifH* gene-like sequences within the actinobacteria *Microbacterium* and *Agromyces*-like (Table 4) and to our knowledge this is the first report for *nifH* within these genera. We couldn't amplify any *nifH* gene within the genera *Ornithinococcus* and *Mycobacterium*. This may be due to the lack of specificity of the primers we used. For the genus *Ornithinococcus*, no report about nitrogen fixation has been done so far.

The other gram-positive strains belong to the Firmicutes phylum. Isolates STM 388 and STM 392 are respectively *Paenibacillus* and *Bacillus*-like strains (Table 1). For a long time, the

genus *Bacillus* remained heterogeneous. Recently, some *Bacillus* species were transferred to the new genus *Paenibacillus* (ASH et al., 1993). Both genera include nitrogen-fixers (SNEATH, 1986; ASH et al., 1993)

The genus *Bacillus* comprises rice endophytes (STOLTZFUS et al., 1997), plant-growth-promoting bacteria isolated from soybean root nodules (BAI et al., 2002) and legume nodulation enhancers (HALVERSON and HANDELSMAN, 1991; SRINIVASAN et al., 1997). Some *Paenibacillus* strains are root surface colonizers (BENT et al., 2002) and PGP bacteria (TIMMUSK and WAGNER, 1999).

In conclusion, the 16S-ARDRA technique allowed good separation of the studied strains at the genus level but 16S rDNA sequencing was essential for phylogenetic affiliation. In this study, sequences homologous to *nifH* gene were found for the first time within strains belonging to *Microbacterium* and *Starkeya* genera, and within strains belonging to genera close to *Agromyces* and *Phyllobacterium*. The studied strains couldn't nodulate *M. atropurpureum* and we couldn't evidence any *nodA* gene-like sequence by PCR amplification with the primers we used. Probably more primers should be tested for further nodulation gene screening. In our collection we found strains belonging to the genera *Phyllobacterium*, *Sphingomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Bacillus* and *Paenibacillus* some members of which were reported in literature to interact at different levels with plants. Some colonize the root surface (*Paenibacillus*), others are found inside nodule (*Phyllobacterium*, *Bacillus*) and others are root endophytic bacteria (*Sphingomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*).

Acknowledgments: The authors are grateful to SOPHIE MANTELIN, LIONEL MOULIN, GILLES BENA for helpful discussions and to ODILE DOMERGUE, LUCETTE MAURE, EMMANUEL PROTIERE and CATHY VADALA for technical assistance. FZ is indebted to IRD France for PhD fellowship, AW and MG to the Fund for Scientific Research - Flanders for a postdoctoral research fellow position and research and personnel grants respectively

Table 1. New isolates and main results

Strain*	Other strain designation	Origin (root nodules)	16S-ARDRA cluster	SDS-PAGE group	16S rDNA sequencing**
<i>Bosea</i>					
ORS 1414 ^A	RAT 304	<i>Retama raetam</i>	I	Sep	<i>Bosea thioxidans</i> ^t (97%, 1443 bp),
ORS 1496 ^A	RAT 1301	<i>Astragalus gombiformis</i>	I	Nt	<i>Bosea mexicana</i> ^p (95%, 600 bp)
STM 358 ^A	RAT 1901	<i>Ononis vaginalis</i>	I	Nt	<i>Bosea thioxidans</i> ^t (99%, 1365 bp)
<i>Phyllobacterium-like</i>					
ORS 1419 ^H	RAT 800	<i>Astragalus algerianus</i>	II	2	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> ^t (96%, 1438 bp)
ORS 1402 ^{A,H}	RAT 003	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	II	3	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> ^t (96%, 1449 bp)
ORS 1403 ^H	RAT 004	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	II	3	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> ^t (96%, 1419 bp)
ORS 1420 ^H	RAT 801	<i>Astragalus algerianus</i>	III	Sep	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> ^t (98%, 1428 bp)
STM 391	RAT 2204	<i>Calycotome villosa</i>	III	Sep	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> ^t (98%, 1430 bp)
STM 370 ^H	RAT 3000	<i>Lathyrus numidicus</i>	III	Nt	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> ^t (98%, 1408 bp)
<i>Starkeya</i>					
ORS 1476	RAT 312	<i>Retama raetam</i>	IV	Sep	Nt
ORS 1474 ^{A,H}	RAT 310	<i>Retama raetam</i>	IV	Sep	<i>Starkeya novella</i> ^t (98%, 1438 bp)
<i>Sphingomonas</i>					
ORS 1497 ^A	RAT 1302	<i>Astragalus gombiformis</i>	V	Sep	<i>Sphingomonas asaccharolytica</i> ^t (97%, 1443 bp)
STM 397 ^H	RAT 2301	<i>Lotus argenteus</i>	V	Sep	<i>Sphingomonas asaccharolytica</i> ^p (99%, 595 bp)
STM 384 ^H	RAT 2101c	<i>Calycotome villosa</i>	V	Nt	<i>Sphingomonas asaccharolytica</i> ^p (99%, 466 bp)
<i>Inquilinus</i>					
ORS 1421 ^A	RAT 802	<i>Astragalus algerianus</i>	VI	2	<i>Inquilinus limosus</i> ^p (99%, 611 bp)
ORS 1422 ^A	RAT 803	<i>Astragalus algerianus</i>	VI	2	<i>Inquilinus limosus</i> ^p (98%, 674 bp)
STM 378 ^A	RAT 863b	<i>Astragalus sp.</i>	VI	Sep	<i>Inquilinus limosus</i> ^p (98%, 343 bp)
STM 364 ^A	RAT 2101b	<i>Calycotome villosa</i>	VI	Nt	<i>Inquilinus limosus</i> ^p (99%, 472 bp)
STM 385 ^A	RAT 2101d	<i>Calycotome villosa</i>	VI	Nt	<i>Inquilinus limosus</i> ^p (98%, 548 bp)

Table 1 continued

STM 377 ^A	RAT 863a	<i>Astragalus sp.</i>	VI	Nt	<i>Inquilius limosus</i> ^P (99%, 126 bp)
<i>Pseudomonas</i>					
STM 368	RAT 2401	<i>Medicago truncatula</i>	VII	1	<i>Pseudomonas syringae</i> ^{t,n} pv. <i>phaseolicola</i> (99%, 1474 bp)
ORS 1432 ^H	RAT 1001	<i>Hedysarum carnosum</i>	VII	Sep	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> ^P (98%, 582 bp)
Actinomycetales					
ORS 1472 ^H	RAT 308	<i>Retama raetam</i>	VIII	Sep	<i>Microbacterium flavescens</i> ^t (97%, 1489 bp)
ORS 1417 ^H	RAT 603	<i>Ononis natrix subsp falcata</i>	VIII	Sep	<i>Microbacterium flavescens</i> ^t (98%, 1456 bp)
ORS 1418 ^H	RAT 604	<i>Ononis natrix subsp falcata</i>	VIII	Sep	<i>Microbacterium flavescens</i> ^t (98%, 1489 bp)
ORS 1480 ^H	RAT 317	<i>Retama raetam</i>	VIII	Nt	<i>Microbacterium barkeri</i> ^P (98%, 417 bp)
ORS 1437 ^H	RAT 15	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	Sep	Nt	<i>Agromyces cerinum</i> ^P (98%, 550 bp)
ORS 1481 ^H	RAT 405	<i>Astragalus armatus</i>	Sep	Nt	<i>Mycobacterium frederiksbergense</i> ^P (100%, 552 bp)
STM 379 ^H	RAT 2400	<i>Medicago truncatula</i>	Sep	1	<i>Ornithinicoccus hortensis</i> ^P (97%, 573 bp)
Others					
STM 392 ^H	RAT 2200	<i>Calycotome villosa</i>	Sep	Sep	<i>Bacillus circulans</i> ^P (97%, 333 pb)
ORS 1478 ^A	RAT 314	<i>Retama raetam</i>	Sep	Sep	<i>Ochrobactrum grignonense</i> ^P (95%, 604 bp)
STM 388 ^A	RAT 2303	<i>Lotus argenteus</i>	Sep	Sep	<i>Paenibacillus lautus</i> ^P (96%, 450 bp)
ORS 1473 ^A	RAT 309	<i>Retama raetam</i>	Sep	Sep	<i>Paracraurococcus ruber</i> ^t (94%, 1443 bp)
ORS 1416ri ^H		<i>Ononis natrix subs.falcata</i>	Nt	Nt	<i>Rhodopseudomonas rhenobacensis</i> ^t (97%, 1446 bp)

* All strains except ORS 1416ri have been tested for nodulation on *Macroptilium atropurpureum*.

** The closest match in NCBI is shown. Between brackets are given respectively the percentage of homology with the most similar published 16S rDNA sequence and the number of base pair considered.

t, total 16S rDNA sequence

p, partial rDNA sequence

n, one sense sequence was determined

Nt : not tested

H, strain screened for *nifH* gene.

A, strain screened for *nodA* gene.

Table 2. Reference Strains used in this study

Strain	Other designation	Host plant	Geographical origin	Reference	16S-ARDRA	SDS-
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>						
ORS 1352 ^T	LMG 150 ^T	-	-		Sep	Sep
<i>Agrobacterium rubi</i>						
ORS 1353	LMG 159	<i>Rubus sp.</i>	USA, 1942	KERSTERS et al., 1973	Sep	Nt
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>						
ORS 1351 ^T	LMG 140 ^T		-		Sep	Sep
ORS 2644 ^T	LMG 187 ^T	<i>Lycopersicon lycopersicon</i>	U.S.A.	KERSTERS et al., 1973	Sep	Nt
<i>Agrobacterium vitis</i>						
ORS 2643	LMG 257	<i>Vitis vinifera</i>	Greece	LMG	Sep	Sep
<i>Allorhizobium undicola</i>						
ORS 992 ^T	LMG 11875 ^T	<i>Neptunia natans</i>	Senegal	de LAJUDIE et al., 1998b	Sep	Nt
ORS 995	LMG 11876	<i>Neptunia natans</i>	Senegal	de LAJUDIE et al., 1998b	Sep	Sep
<i>Azorhizobium caulinodans</i>						
ORS 571 ^T	LMG 6465 ^T	<i>Sesbania rostrata</i>	Senegal	DREYFUS et al., 1988	Sep	Sep
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>						
NZP 5549 ^T	LMG 6138 ^T	<i>Glycine max</i>	Japan	-	Nt	Sep
<i>Burkholderia tuberum</i>						
STM 678 ^T	LMG 21444 ^T	<i>Aspalathus carnosa</i>	South Africa	MOULIN et al., 2001	Sep	Nt
<i>Mesorhizobium amorphae</i>						
STM 238	LMG 18932 or 18960	<i>Amorpha fruticosa</i>	China		Sep	Nt
<i>Mesorhizobium chacoense</i>						
pr5	LMG 19008 ^T	<i>Prosopis alba</i>	Argentina	VELÁZQUEZ et al., 2001	Nt	Sep
<i>Mesorhizobium ciceri</i>						
ORS 2738 ^T	LMG 17150 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	Spain	NOUR et al., 1994	Sep	Nt
	LMG 14989 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	Spain	NOUR et al., 1994	Nt	Sep
<i>Mesorhizobium huakuii</i>						
ORS 1752 ^T	LMG 14107 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	China	CHEN et al., 1991	Sep	Sep
<i>Mesorhizobium loti</i>						
ORS 664 ^T	LMG 6125 ^T	<i>Lotus tenuis</i>	New Zealand	JARVIS et al., 1986	Sep	Sep

Table 2 continued

<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>						
Ca-36 ^T , ORS 2739 ^T	LMG 17148 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	Spain	NOUR et al., 1995	Nt	Sep
ORS 2754					Sep	Nt
<i>Mesorhizobium plurifarium</i>						
ORS 654	LMG 10056	<i>Leucaena diversifolia</i>	Brazil	de LAJUDIE et al., 1998a	Sep	Nt
ORS 1030	LMG 11890	<i>Acacia senegal</i>	Senegal	de LAJUDIE et al., 1998a	Nt	Sep
ORS 1032 ^T	LMG 11892 ^T	<i>Acacia senegal</i>	Senegal	de LAJUDIE et al., 1998a	Nt	Sep
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>						
ORS 2640 ^T	LMG 15767 ^T	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	China	CHEN et al., 1995	Sep	Sep
<i>Methylobacterium nodulans</i>						
ORS 2060 ^T		<i>Crotalaria podocarpa</i>	Senegal	SY et al., 2001	Sep	Sep
<i>Rhizobium etli</i>						
ORS 645 ^T	LMG 11937 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Mexico	SEGOVIA et al., 1993	Sep	Sep
<i>Rhizobium galegae</i>						
HAMBI 540 ^T	LMG 6214 ^T , ORS 668 ^T	<i>Galega orientalis</i>	Finland	LINDSTRÖM, 1989	Sep	Sep
<i>Rhizobium gallicum</i> bv. phaseoli						
R4384	PHI21	<i>Phaseolus vulgaris</i>	France	AMARGER et al., 1997	Nt	Sep
<i>R. giardinii</i> bv. giardinii						
R4385	H152 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	France	AMARGER et al., 1997	Nt	Sep
<i>R. hainanense</i>						
CCBAU 57003	LMG 18075					
<i>R. huautlense</i>						
STM 279 ^T	LMG 18254 ^T	<i>Sesbania herbacea</i>	Sierra de Huautla, Mexico	WANG et al., 1998	Sep	Sep
	LMG 18256	<i>Sesbania herbacea</i>	Sierra de Huautla, Mexico	WANG et al., 1998	Nt	Sep
<i>R. leguminosarum</i> bv phaseoli						
ORS 662	LMG 8819T2				Sep	Nt
<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii						
ORS 663	LMG 8820				Sep	Nt
<i>R. leguminosarum</i> bv viciae						
ORS 639	LMG VF39SM				Sep	Nt
	LMG 8817T				Nt	Sep

Table 2 continued

<i>Rhizobium mongolense</i> USDA 1844 ^T , STM 246 ^T	LMG 19141 ^T	<i>Medicago ruthenica</i>	Mongolia, China	VAN BERKUM et al., 1998	Sep	Sep
<i>Rhizobium tropici</i> IIa ORS 651	LMG 9517	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brazil	MARTINEZ-ROMERO et	Sep	Nt
<i>Rhizobium tropici</i> IIb ORS 625 ^T , CIAT 899 ^T	LMG 9503 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Colombia	MARTINEZ-ROMERO et al., 1991	Sep	Sep
<i>Sinorhizobium adhaerens</i> R-14065 ^T	ATCC 33212 ^T	Soil	USA	CASIDA, 1982 ; WILLEMS	Nt	Sep
<i>Sinorhizobium arboris</i> ORS 1755 ^T	LMG 14919 ^T	<i>Prosopis chilensis</i>	Sudan	NICK et al., 1999	Sep	Nt
	LMG 15624	<i>Acacia senegal</i>	Sudan	NICK et al., 1999	Nt	Sep
	LMG 15626	<i>Acacia senegal</i>	Sudan	NICK et al., 1999	Nt	Sep
<i>Sinorhizobium fredii</i> ORS 669 ^T	LMG 6217 ^T	<i>Glycine max</i>	China	JARVIS et al., 1986	Sep	Sep
<i>Sinorhizobium kostiense</i> ORS 513	LMG 15613	<i>Prosopis chilensis</i>	Soudan	NICK et al., 1999	Sep	Nt
<i>Sinorhizobium medicae</i> M 102, ORS 504	LMG 16580, HAMB I 1809	<i>Medicago truncatula</i>	Syria	EARDLY et al., 1990	Sep	Nt
M75	LMG 16579, HAMB I 1808	<i>Medicago radiata</i>	Syria	EARDLY et al., 1990	Nt	Sep
<i>Sinorhizobium meliloti</i> NZP 4027 ^T , ORS 665 ^T	LMG 6133 ^T	<i>Medicago sativa</i>	Virginia, USA	-	Sep	Sep
<i>Sinorhizobium morelense</i> R-13987 ^T , Lc04 ^T	LMG 21331 ^T	<i>Leucaena leucocephala</i>	Mexico	WANG et al., 2002	Nt	Sep
<i>Sinorhizobium saheli</i> ORS 609 ^T	LMG 7837 ^T	<i>Sesbania cannabina</i>	Senegal	de LAJUDIE et al, 1994	Sep	Sep
ORS 611	LMG 7842, LMG 8310	<i>Sesbania grandiflora</i>	Senegal	de LAJUDIE et al, 1994	Sep	Sep
<i>Sinorhizobium teranga</i> ORS 51	LMG 6464	<i>Sesbania rostrata</i>	Senegal	de LAJUDIE et al., 1994	Sep	Nt
ORS 1009 ^T	LMG 7834 ^T	<i>Acacia laeta</i>	Senegal	de LAJUDIE et al, 1994	Sep	Sep
ORS 1007	LMG 7847	<i>Acacia laeta</i>	Senegal	de LAJUDIE et al, 1994	Nt	Sep

Nt, not tested; Sep, separate

Table 3. Primers used for DNA amplification and sequencing

Primer name	Primer sequence	Target gene	Reference
FGPS 6	5' GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA G 3'	16S rDNA	NORMAND et al., 1992
FGPS 1509	5' AAG GAG GGG ATC CAG CCG CA 3'	16S rDNA	NORMAND et al., 1992
16S-870f	5' CCT GGG GAG TAC GGT CGC AAG 3'	16S rDNA	SY et al., 2001
16S-1080r	5' GGG ACT TAA CCC AAC ATC T 3'	16S rDNA	SY et al., 2001
16S-370f	5' GGC AGC AGT GGG GAA TAT TG 3'	16S rDNA	SY et al., 2001
16S-1924 rev	5' GGC ACG AAG TTA GCC GGG GC 3'	16S rDNA	SY et al., 2001
FGPL2054'	5' CCG GGT TTC CCC ATT CGG 3'	23S rDNA	NORMAND et al., 1992
*Br5	5' CTT GTA GCT CAG TTG GTT AG 3'	RNA ^{ile}	WILLEMS et al., 2001
<i>nodA</i> fbrad	5' GTY CAG TGG AGS STK CGC TGG G 3'	<i>nodA</i>	SY et al., 2001
<i>nodA</i> rbrad	5' TCA CAR CTC KGG CCC GTT CCG 3'	<i>nodA</i>	SY et al., 2001
<i>nifH</i> (forA)	5' GCI WTI TAY GGN AAR GGN GG 3'	<i>nifH</i>	WIDMER et al., 1999
<i>nifH</i> (forB)	5' GGI TGT GAY CCN AAV GCN GA 3'	<i>nifH</i>	WIDMER et al., 1999
<i>nifH</i> reverse	5' GCR TAI ABN GCC ATC ATY TC 3'	<i>nifH</i>	WIDMER et al., 1999

DNA sequence degeneracies are indicated by using the International Union of Pure and Applied Chemistry conventions, as follows (LIÉBECQ, 1992): R, A/G; Y, C/T; W, A/T; V, A/C/G; B, C/G/T and N, A/C/G/T. Inosine (I) was used to reduce the degeneracy of the primers by replacing fourfold-degenerate positions (N) in the 5' portions (BARTL and Weissman, 1994; CANDRIAN et al., 1991; UEDA et al., 1995).

Table 4. Results for *nifH* gene sequencing.

Strain	Genus	Closest match in NCBI*
ORS 1417 ^a	<i>Microbacterium</i>	<i>Sinorhizobium meliloti nifH</i> gene (94%, 329 bp)
ORS 1418 ^a	<i>Microbacterium</i>	<i>Sinorhizobium meliloti nifH</i> gene (93%, 338 bp)
ORS 1472 ^a	<i>Microbacterium</i>	<i>Sinorhizobium meliloti nifH</i> gene (96%, 320 bp)
ORS 1437 ^a	<i>Agromyces</i>	<i>Sinorhizobium meliloti nifH</i> gene (93%, 314 bp)
ORS 1402 ^a	<i>Phyllobacterium-like</i>	<i>Sinorhizobium meliloti nifH</i> gene (96%, 342 bp)
ORS 1403 ^b	<i>Phyllobacterium-like</i>	<i>Sinorhizobium xinjiangense nifH</i> gene (95%, 182 bp)
ORS 1474 ^b	<i>Starkeya</i>	<i>Sinorhizobium meliloti nifH</i> gene (90%, 346 bp)

*between brackets are given respectively the percentage of homology with the most similar published 16S rDNA sequence and the number of base pairs considered.

a, result of sequencing by two primers: forward and reverse.

b, result of sequencing for one primer only.

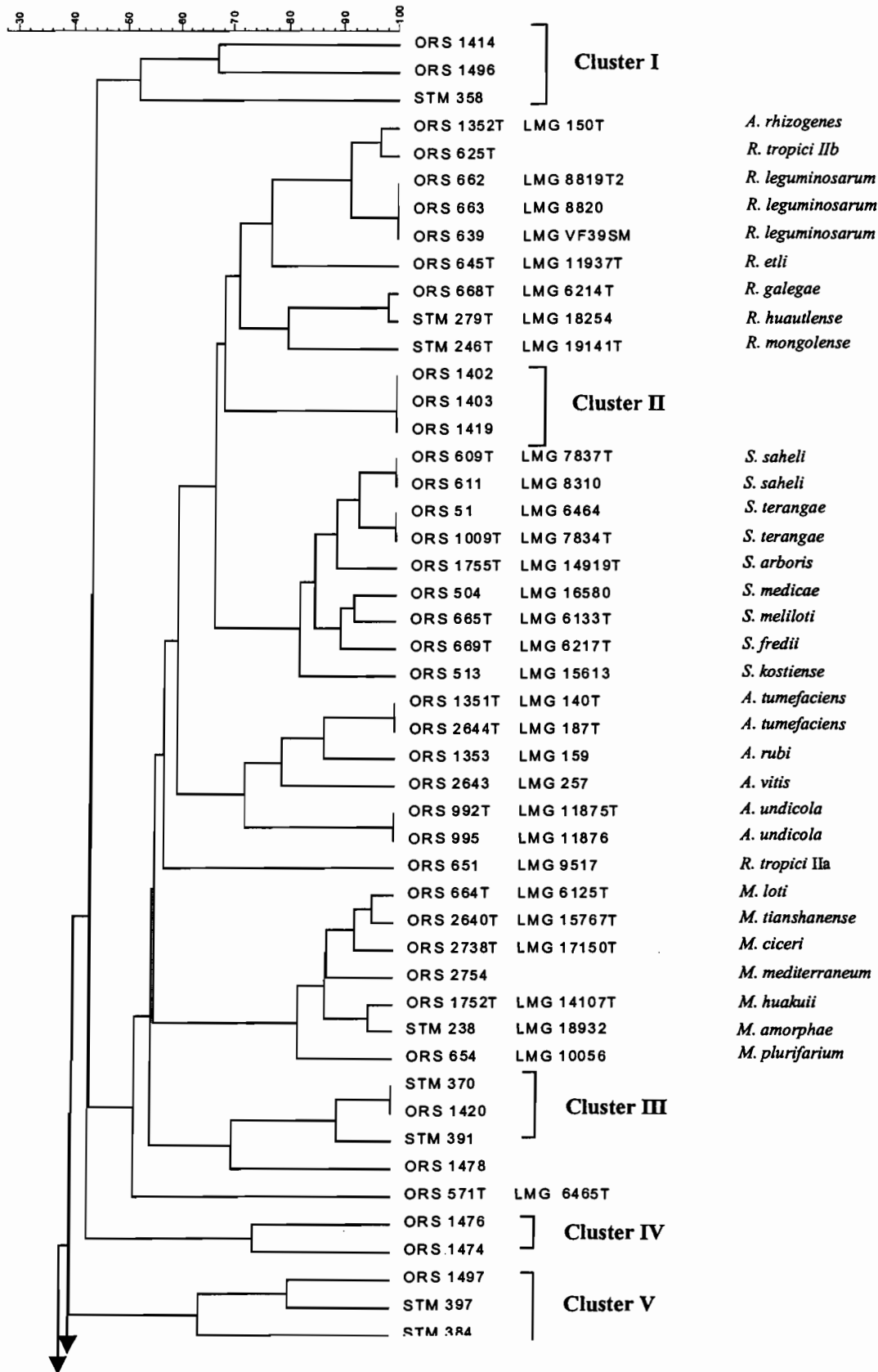


Fig. 1 Dendrogram based on the unweighted pair group method using average linkage (UPGMA) clustering of Dice correlation values (S_D) of normalised and combined 16S ARDRA patterns of Tunisian isolates and reference strains using 7 enzymes (*MspI*, *CfoI*, *HinfI*, *RsaI*, *NdeII*, *AluI*, *TaqI*).

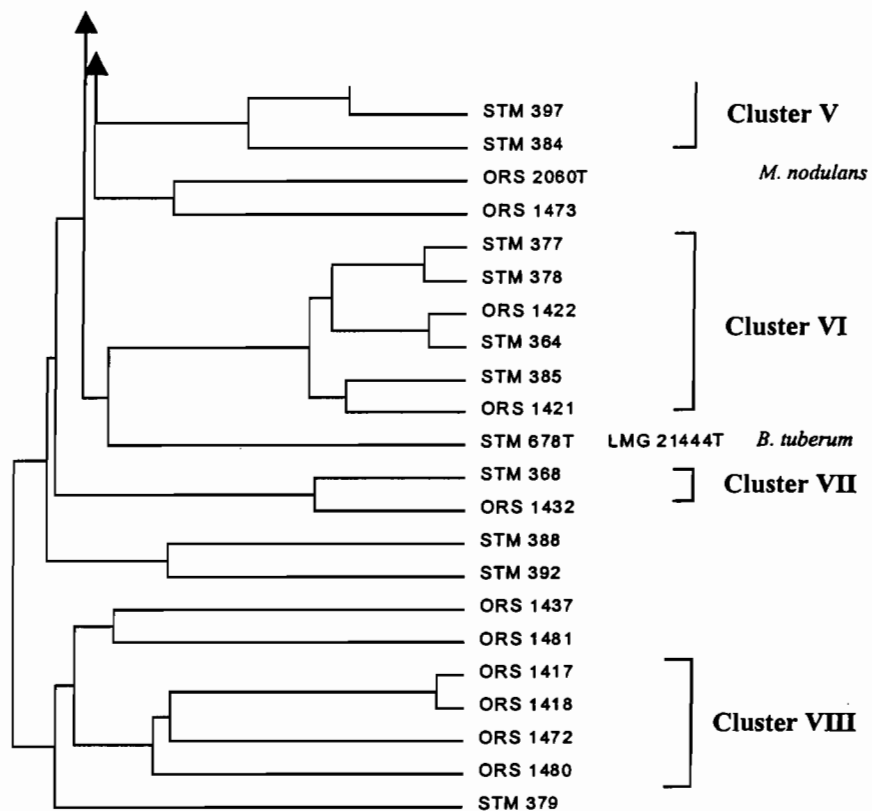


Fig. 1 continued

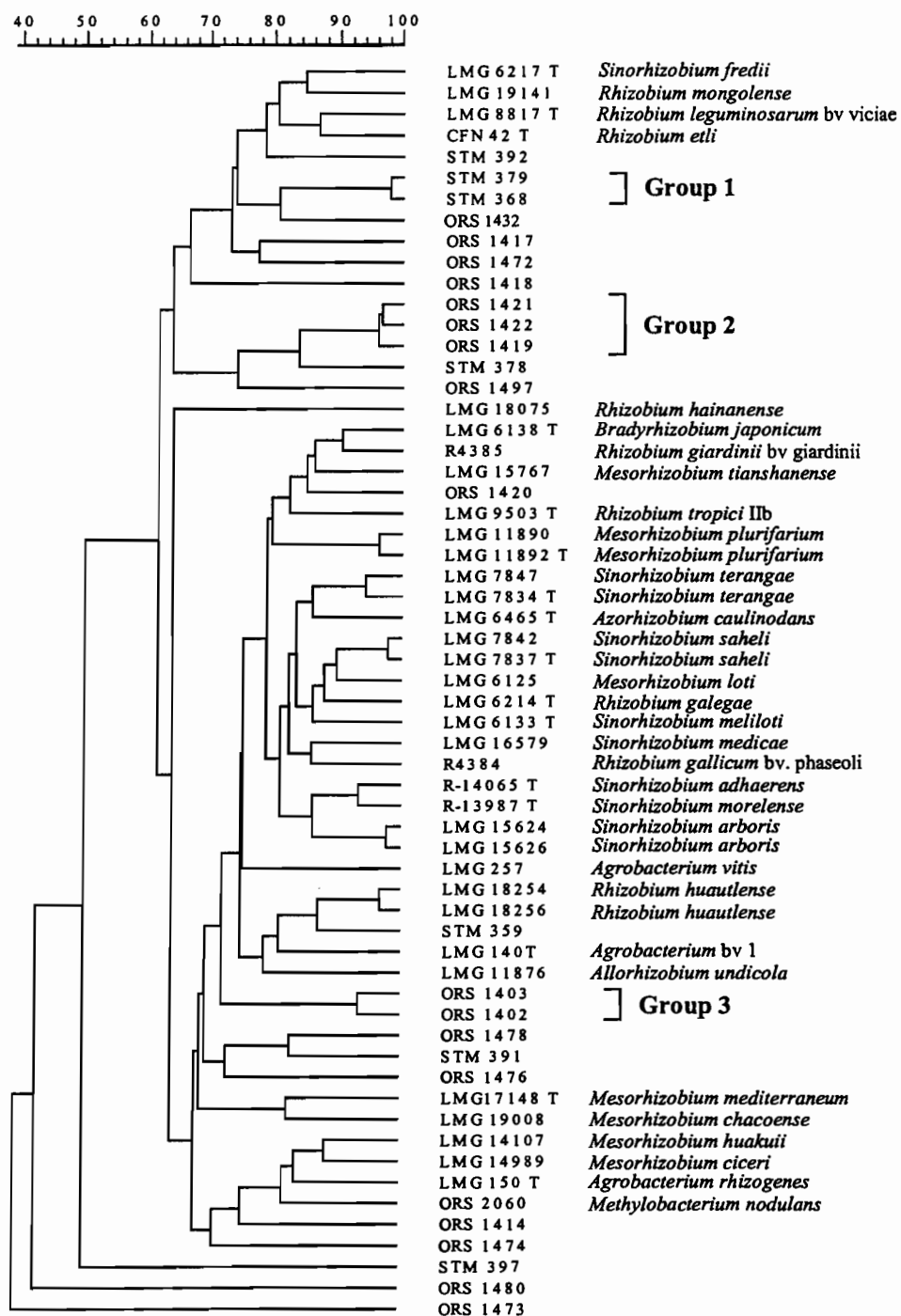


Fig. 2 Dendrogram showing the relationships between the electrophoretic protein patterns of tunisian legume bacterial isolates using Gelcompar 4.2 software package. The dendrogram is based on mean correlation coefficient (r) values which were grouped by the unweighted average pairs grouping method (UPGMA).

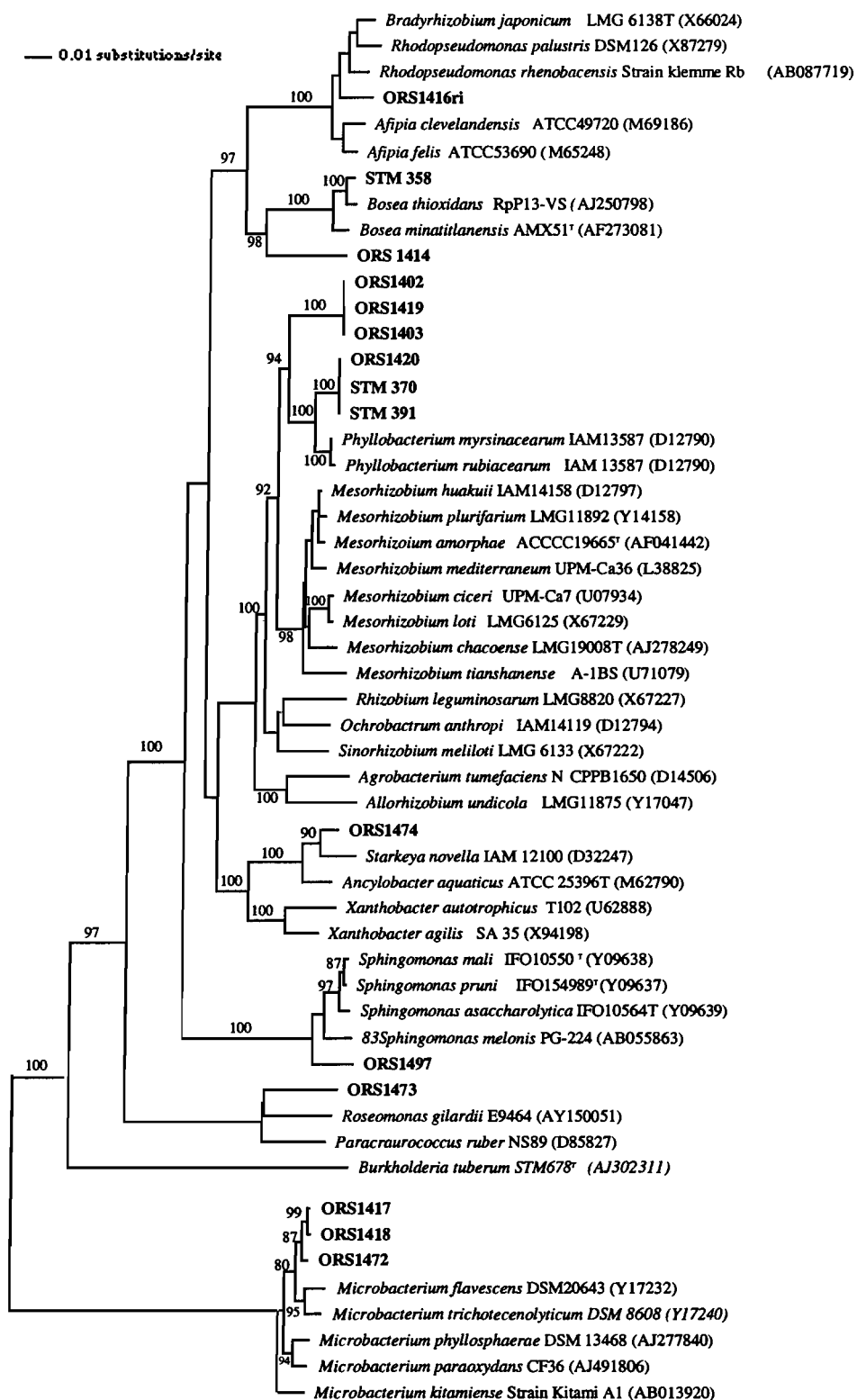


Fig. 3. 16S rRNA gene sequence-based dendrogram obtained by neighbour-joining method, showing the phylogenetic positions of Tunisian isolates. Significant bootstraps (>80 %) are indicated as percentages (1000) replications. The tree is rooted on *M. kitamiense*

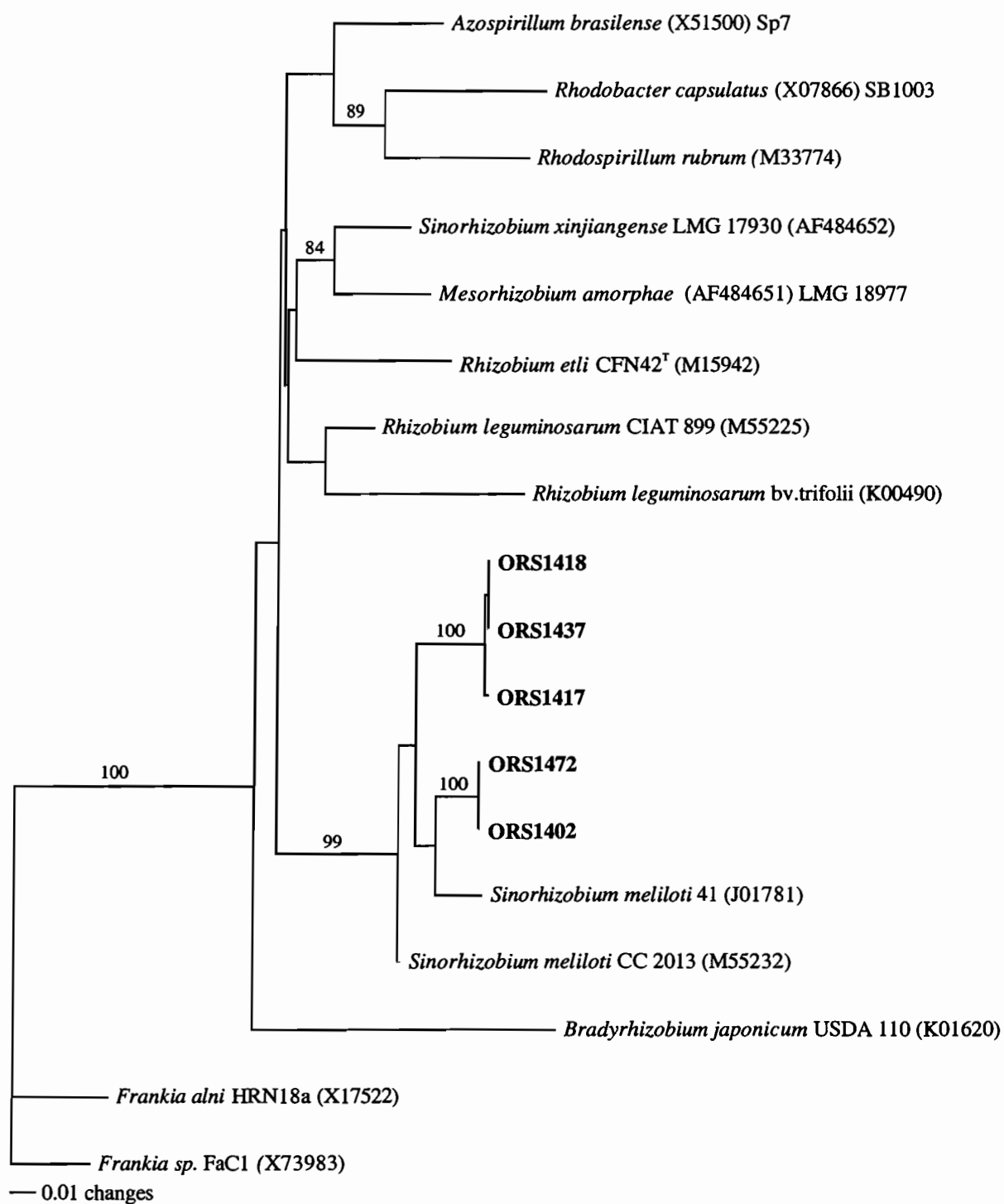


Fig. 4. Phylogenetic tree based on nearly full length (370 bp) *nifH* sequence of some new isolates from Tunisia. New sequences are indicated in bold. The significant bootstrap values are indicated as percentages (> 80%) derived from 1000 replications. The tree is rooted on *Frankia sp.* strain FaCl.

**RESULTATS COMPLEMENTAIRES AU CHAPITRE III :
TESTS DE NODULATION**

INTRODUCTION

Les tests de nodulation qui visent à vérifier la capacité d'une souche bactérienne à noduler ont été entrepris sur les graines disponibles des plantes de Tunisie ou sur des graines de *Macropitium atropurpureum*. Dans le chapitre II, nous avons exposé les trois techniques utilisées pour effectuer ces tests : Tests en tubes, en pots et en sachets.

MATERIELS ET METHODES

Voir le chapitre II.

RESULTATS

Les souches testées n'ont pas toutes induit des nodules. Les trois techniques que nous avons employées sont illustrées par les figures 1, 2 et 3. Le tableau 1 présente les tests de nodulation négatifs et le tableau 2 ceux qui sont positifs. Pour connaître les plantes d'origine et l'identification des souches, se référer au tableau n°1 du chapitre II et aux articles n°2 et 3 respectivement.

Tableau 1. Tests de nodulation négatifs (trois techniques ont été employées).

Souches	Plantes testées	Technique
ORS 1463	<i>Anthyllis vulneraria</i>	Tubes
ORS 1402, ORS 1439, ORS 1442, ORS 1443, ORS 1445, ORS 1446, ORS 1448, ORS 1449, ORS 1450, ORS 1453, ORS 1454, STM 353	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	Tubes
ORS 1445	<i>Argyrolobium uniflorum</i>	Pots
ORS 1411	<i>Galega officinalis</i>	Tubes
STM 360, ORS 1411, ORS 1445, ORS 1446, ORS 1448, ORS 1463, ORS 1465	<i>Galega orientalis</i>	Tubes
ORS 1409, ORS 1411	<i>Lotus creticus</i>	Pots
Toutes les souches de l'article n°3 sauf ORS 1416ri	<i>Macropitium atropurpureum</i>	Tubes
STM 383, STM 390, ORS 1407, ORS 1410, ORS 1444, ORS 1459, ORS 1464, ORS 1465	<i>Medicago sativa</i>	Tubes
ORS 1494	<i>Ononis minutissima</i>	Sachets
STM 358, STM 359A, STM 359B, STM 360, ORS 1416, ORS 668, ORS 1494	<i>Ononis natrix subsp falcata</i>	Pots
ORS 1494	<i>Ononis natrix subsp falcata</i>	Sachets
ORS 1494	<i>Ononis repens</i>	Tubes

ORS 1475, ORS 1474, ORS 1476, ORS 1478 *Retama raetam* Tubes

Tableau 2. Résultats des tests de nodulation positifs

Souche	Plantes testées	Nodulation*	Efficience**
ORS 1463	<i>Galega officinalis</i>	±	-
ORS 1400	<i>Argyrobium uniflorum</i>	±	+
ORS 1401	<i>Argyrobium uniflorum</i>	±	+
ORS 1403	<i>Argyrobium uniflorum</i>	±	+
ORS 1407	<i>Argyrobium uniflorum</i>	+	+
ORS 1444	<i>Argyrobium uniflorum</i>	+	+
STM 382	<i>Medicago sativa</i>	+	+
ORS 1436	<i>Medicago sativa</i>	+	+
ORS 1416	<i>Ononis natrix subsp falcata</i>	±	+

* +, Nodulation ; ±, 10-30 % des plantes sont nodulées

** +, nodules efficaces, -, nodules non efficaces

Toutes ces plantes sont cultivées en tube à l'exception de *O. natrix subsp falcata* qui est cultivée en sachets dans le cas de ORS 1416.

DISCUSSION

Conditions de culture :

En fonction des graines disponibles, nous avons testé la capacité de ces souches à induire des nodules. Jusqu'à présent, au laboratoire, les tests de nodulation classiques se faisaient en tubes Gibson (Vincent, 1970), et ils ont donné des résultats positifs notamment pour plusieurs légumineuses tropicales (de Lajudie et al., 1994 ; 1998a ; 1998b). Dans notre étude, nous avons rencontré plusieurs obstacles :

1) Manque de graines : la majorité des espèces étudiées sont des espèces de l'étage aride inférieur de Tunisie et aucune banque de graines n'existe. Nous disposions cependant de certaines graines récoltées au cours d'un travail de terrain dans cette région (Jeder et al., 1996).

2) Technique de culture convenable : nous avons tout d'abord commencé par cultiver les plantes en utilisant la méthode classique en tubes Gibson (Vincent, 1970). Pour certaines plantes qui ne poussaient pas bien, nous avons été amenés à utiliser d'autres techniques :

culture en pots puis en sachets. Les principales conclusions concernant la culture de ces plantes sont les suivantes :

Argyrolobium uniflorum se développe mieux en tubes qu'en pots.

Ononis natrix subsp falcata se développe aussi bien en tubes qu'en pots ou sachets.

Retama raetam se développe bien en tubes.

Ononis repens * se développe bien en tubes.

Anthyllis vulneraria * se développe mieux en pots qu'en tubes.

3) Tests de nodulation négatifs (Tableau 1)

Nous n'avons pas observé de nodules dans nos conditions de cultures pour la majorité des souches testées. Peut-être que les conditions optimales de la nodulation ne sont pas réunies (température, milieu de culture...). D'autre part, les souches de l'article N°3, identifiées comme différentes des BNL classiques, ont été testées sur *Macroptilium atropurpureum*, plante à large spectre d'hôte. Elles n'ont pas produit de nodules. Cela peut-être dû au fait qu'elles ne sont pas symbiotiques mais endophytes ou opportunistes dans les nodules. Cependant, deux souches identifiées comme appartenant au genre *Bradyrhizobium* (Article N°2) : ORS 1409 et ORS 1412 ont été inoculées sur *M. atropurpureum*. Aucun nodule n'a été obtenu sur cette plante, pourtant connue d'être nodulée par des souches de *Bradyrhizobium*. Cela peut-être dû au manque de spécificité entre ces souches et la plante.

D'autre part, nous avons réussi à obtenir des nodules dans quelques cas (Tableau 2) :

Rhizobium galegae

La souche ORS 1463 ayant 100 % d'homologie de séquence ADNr 16S avec *R. galegae* bv. *officinalis* induit des nodules inefficients sur *G. officinalis*, mais n'induit aucun nodule ni sur *G. orientalis* ni sur *Anthyllis vulneraria* (tests en pots, Fig.2). Cette dernière espèce a été utilisée car nous ne disposions de graines de *A. henoniana*. Notre tentative d'amplification par PCR de la région *nod box* avec des amorces spécifiques des biovars *orientalis* ou *officinalis* n'a pas réussi (voir Partie II de ce supplément). ORS 1463 ne pouvant pas former de symbiose efficace avec *G. officinalis*, pourrait alors constituer un troisième biovar adapté à sa plante hôte, *Anthyllis henoniana*. De son côté, la souche ORS 1411, isolée de *Lotus creticus* (présentant 100 % d'homologie de séquence ADNr 16S avec *R. galegae* bv. *officinalis*) n'a produit aucun nodule ni sur *G. orientalis*, ni sur *G. officinalis* ni sur sa plante hôte, *Lotus creticus* (tests en pots).

* Plantes utilisées lorsqu'on n'avait pas de graines.

Sinorhizobium

La souche ORS 1400 (proche de *S. teranga* sur la base de la séquence de l'ADNr 16S) et ORS 1401 (qui appartient au groupe des *S. meliloti*) produisent des nodules efficaces sur quelques répétitions de *A. uniflorum* (Tableau 2).

Les souches ORS 1407 et ORS 1444, phylogénétiquement proches de *S. meliloti*, ont induit des nodules efficaces sur toutes les répétitions (9) d'*A. uniflorum*. C'est la première fois que des souches proches de *Sinorhizobium meliloti* ou de *S. teranga* sont trouvées capables de noduler des espèces végétales autres que *Medicago* spp ou *Melilotus* spp ou *Acacia* et *Sesbania* spp. Il faut noter que les souches ORS 1407 et ORS 1444 n'étaient pas capables de noduler *Medicago sativa*. Cela peut être dû à la spécificité entre ces souches et *A. uniflorum*. Les nodules observés sur *A. uniflorum* étaient de forme allongée, comme il a été décrit par Jeder *et al.*, (1996) et de couleur rose. D'autres auteurs (Jha *et al.*, 1995) ont observé des nodules roses et allongés sur des plantes d'*A. uniflorum* inoculées par souches de *Rhizobium*. Les autres isolats d'*A. uniflorum* n'ont pas induit la formation de nodules. Des hybridations ADN/ADN sont nécessaires pour les souches qui nodulent *A. uniflorum* et qui sont proches de *S. meliloti* afin de vérifier s'il s'agit de nouvelles espèces.

La souche STM 382, identifiée comme proche de *S. meliloti* sur la base de l'ADNr 16S (voir article N°2, chapitre III) a induit des nodules sur *M. sativa*. Les graines de la plante hôte *M. marina* n'étaient pas disponibles. Là aussi des hybridations ADN/ADN peuvent être entreprises.

ORS 1403

L'espèce la plus proche de ORS 1403 est *Phyllobacterium myrsinacearum* (96 % d'homologie entre les séquences d'ADNr 16S). ORS 1403 a induit sur quelques répétitions de *A. uniflorum* des nodules. Elle peut appartenir à un nouveau genre bactérien. Leur caractérisation phénotypiques est en cours.

ORS 1416

ORS 1416 a induit des nodules indéterminés, efficaces sur *Ononis natrix subsp falcata* cultivées en sachets (Fig. 3). Un premier essai pour isoler la souche d'un des nodules formés a donné une souche (ORS 1416ri) incapable de noduler de nouveau cette plante.

Conclusion :

Bien que la germination des graines disponibles soit mise au point par nos essais (Tableau 2, Chapitre II) et que dans quelques cas, ces plantes se développent bien *in vitro*, aucune des techniques de culture que nous avons employées ne semble conférer les conditions idéales pour ces tests de nodulation. En outre, les graines que nous avons utilisées étaient conservées au froid depuis plusieurs années. Cela peut expliquer en partie la difficulté d'obtention de germinations dans quelques cas. Pour pallier à ces problèmes, les conditions de culture au laboratoire devaient mieux correspondre aux conditions arides. Une procédure de multiplication de graines doit être mise en place. Cela permettra de rechercher les conditions optimales de culture et de nodulation de ces plantes en utilisant des graines viables. D'autre part, la difficulté pour cultiver ces plantes pourra être contournée par l'utilisation de techniques moléculaires (recherche de gènes de symbiose par PCR, Southern Blot...).



Fig. 1 Tests de nodulation en tubes. Une souche de *R. galegae* isolée en Tunisie (ORS 1463) induit des nodules inefficients sur *G. officinalis*. ORS 668 induit des nodules efficaces sur *G. orientalis* et des nodules inefficients sur *G. officinalis* (Radeva *et al.*, 2001).



Fig.2 Tests de nodulation en pots sur *Ononis natrix subsp falcata* et *Anthyllus vulneraria*

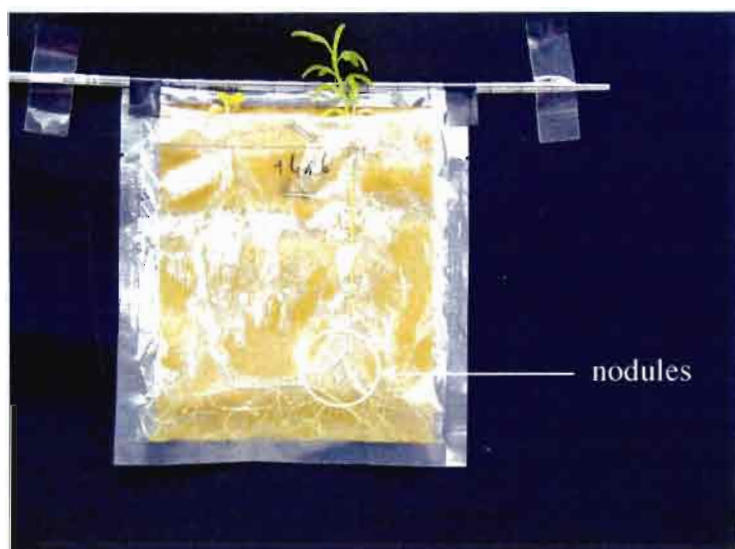


Fig.3 Tests de nodulation en sachets. La souche ORS 1416 induit des nodules (visibles sur la photo) sur *Ononis natrix subsp falcata* cultivées en sachets.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES AU CHAPITRE III :
Recherche de régions *nod box* chez *Rhizobium galegae*

RECHERCHE DE SEQUENCES *nod box* CHEZ *Rhizobium galegae*

INTRODUCTION

Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence des souches appartenant à l'espèce *Rhizobium galegae*. Les souches ORS 1411, ORS 1445, ORS 1446, ORS 1448, ORS 1463, STM 394 et STM 390 de la collection de Tunisie forment ensemble un seul groupe ARDRA (Article N°2). Deux de ces souches (ORS 1411 et ORS 1463) présentent une séquence d'ADNr 16S homologue à 100% avec celle de *R. galegae* souche bv. officinalis 59A2 (HAMBI 503, accession dans NCBI : AF 025853).

Afin d'analyser ces souches au niveau infra-spécifique, nous avons effectué des PCR en utilisant des amorces définies pour amplifier les *nodbox* (régions impliquées dans la régulation des gènes de nodulation) spécifiques de chacun des deux biovars orientalis et officinalis (Andronov *et al.*, 2003).

MATERIELS ET METHODES

Les séquences des amorces ainsi que les conditions des PCR sont indiquées au chapitre II.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les souches témoins positifs : ORS 668 (*R. galegae* bv orientalis) et STM 2085 (*R. galegae* bv officinalis) ont présenté une amplification comme décrit par Andronov *et al.*, 2003 ; Voir tableau ci-contre). Les souches ORS 1411, ORS 1445, ORS 1446, ORS 1448 et ORS 1463 testées par PCR n'ont pas présenté d'amplification. Les souche ORS 1411, ORS 1445 ont présenté quelques fois des amplifications non spécifiques (voir Fig. 1B). Les souches STM 394, et STM 390 n'ont pas été testées.

Tableau 1. Présence (+) ou absence (-) d'amplification par PCR en utilisant les amorces du *nodbox* (Nb) sur les deux biovars de *R. galegae* (d'après Andronov *et al.*, 2003)

	Nb1f et Nb1r	Nb2f et Nb2r	Nb3f et Nb3r	Nb4f et Nb4r	Nb5f et Nb5r
ORS 668	+	+	+	+	+
STM 2085	-	-	+	+	+

Le fait de ne pas pouvoir amplifier ces régions chez les nouveaux isolats de Tunisie signifie que ces souches n'ont pas de séquences *nodbox* homologues à celles qui existent chez les

biovars de référence. Nous pouvons avoir affaire à de nouveaux biovars. En effet, ces souches ont été isolées de légumineuses méditerranéennes alors que les souches de *R. galegae* n'ont été mises en évidence jusqu'à présent que dans le Caucase, comme symbiotes des plantes du genre *Galega*. La capacité à noduler de ces isolats doit être testée de nouveau.

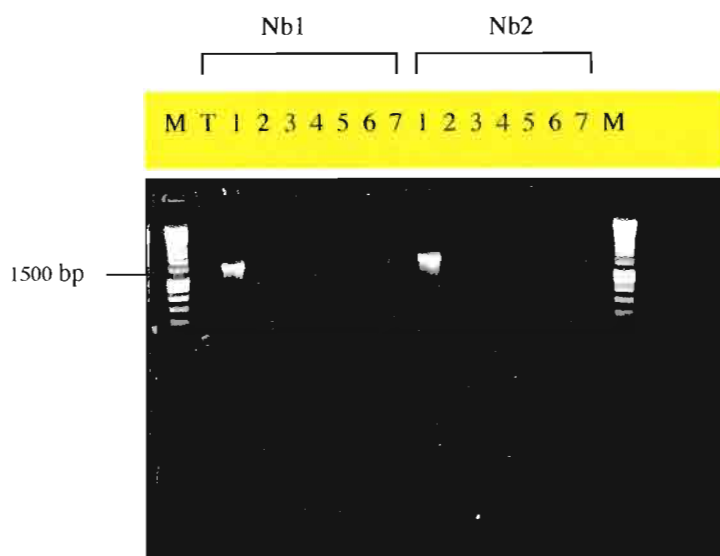


Fig 1A.

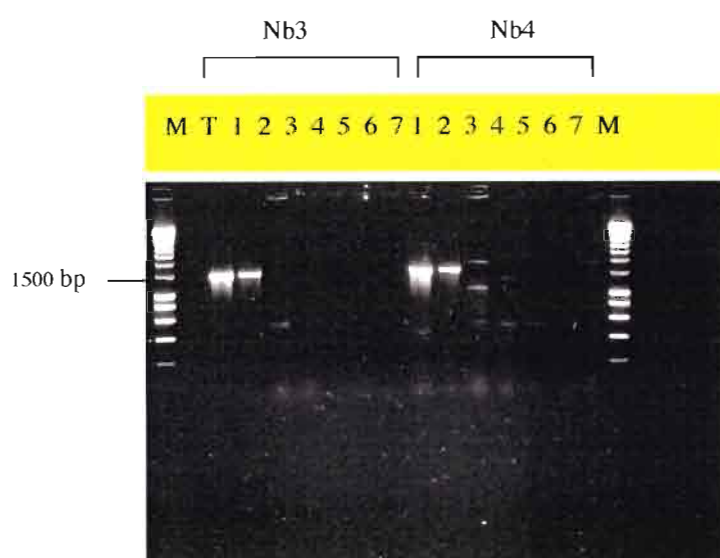


Fig 1B.

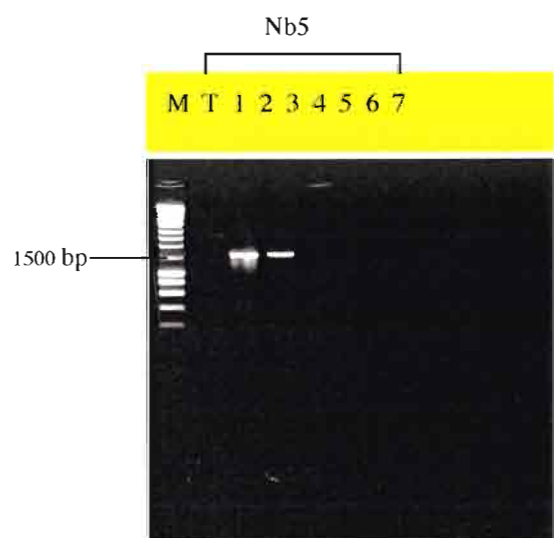


Fig. 1C

Fig.1 Essais d'amplification des régions symbiotiques *nodbox* chez *Rhizobium galegae*. M : Marqueur de poids moléculaires. Smart Ladder. T : témoin sans ADN. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 sont respectivement les souches : ORS 668 (*R. galegae* bv *orientalis*), STM 2085 (*R. galegae* bv *officinalis*), ORS 1411, ORS 1445, ORS 1446, ORS 1448, ORS 1463. Nb1, Nb2, Nb3, Nb4, Nb5 sont respectivement les amorces utilisées : Nb1f et Nb1r, Nb2f et Nb2r, Nb3f et Nb3r, Nb4f et Nb4r, Nb5f et Nb5r. Les conditions de PCR ainsi que les séquences des amorces figurent dans le chapitre Matériels et Méthodes.

CHAPITRE IV
CARACTERISATION DE BACTERIES ASSOCIEES
AUX NODULES DE LEGUMINEUSES SPONTANEEES DU
LIBAN

CHAPITRE IV
CARACTERISATION DE BACTERIES ASSOCIEES
AUX NODULES DE LEGUMINEUSES SPONTANEEES DU
LIBAN

Article N°4 : Zakhia, F., Atallah, T., Rizk, H., Hajj, S., El Hachem, C., Domergue, O., Chaintreuil, C., Willems, A. and de Lajudie, P. Preliminary characterisation of root nodule isolates from wild legumes in Lebanon by 16S-IGS ARDRA and 16S rDNA sequencing.

INTRODUCTION

En Méditerranée, la grande majorité des espèces de légumineuses appartient à la sous-famille des papilionoideae. La plupart sont des herbacées, mais certaines sont des arbres ou des arbustes (Polhill *et al.*, 1981). Certaines régions en Méditerranée sont des centres d'une grande richesse en espèces de légumineuses (Davis *et al.*, 1994 ; Akeroyed, 1999). La Turquie à elle seule, en compte 1300 (Davis, 1970). Au Liban, les inventaires botaniques ne sont pas mis à jour et l'on connaît seulement 20 % des espèces végétales, dont certaines sont menacées de disparition (Mouterde, 1970). Du point de vue topologique (voir carte, Figure 1, Article N°4), le Liban présente une diversité dans ses reliefs. Ainsi, deux chaînes de montagnes (Le Mont-Liban et l'Anti-Liban) s'étendent parallèlement sur l'axe Nord-Sud, séparées par une dépression : la vallée de la Békaa. Cette topologie engendre des variantes de l'écosystème méditerranéen : le Méditerranéen sur la côte et le versant ouest du Mont-Liban, le Méditerranéen pré-steppique sur le versant est du Mont-Liban et la Békaa.

Les problèmes que nous avons déjà évoqués (Surpâturage, Déforestation, Politique d'urbanisation, non application de la législation pour l'exploitation des carrières...) touchent aussi le Liban. Particulièrement, entre 1990 et 1995, le taux annuel de déforestation y a atteint 7,8 % (le plus élevé parmi les pays arabes) (FAO, 1997 ; 1999). D'où la nécessité de lutte contre ces facteurs de dégradation des écosystèmes. Là aussi, les légumineuses sont de bonnes candidates pour la réhabilitation de sites dégradés.

Comme d'autres pays de la Méditerranée (Syrie, Tunisie, Maroc, Egypte), les études de l'association symbiotique « BNL-Légumineuse » au Liban se sont limitées à certaines légumineuses cultivées (Luzernes, Haricots, Pois chiches) et ont été menées principalement dans le cadre de l'ICARDA (International Center For Agricultural Research in the Dry Areas). Les efforts ont porté sur la plante davantage que sur le partenaire symbiotique. Ainsi, des banques de graines ont été constituées, des croisements entre diverses espèces de légumineuses cultivées ont été réalisés par l'ICARDA en vue de l'obtention de variétés plus résistantes aux conditions extrêmes.

Au cours du printemps 2001, nous avons entrepris d'explorer la nodulation des légumineuses spontanées dans divers sites du Liban. Nous avons effectué nos recherches principalement sur les bordures des voies de communications, autour de quelques carrières et en montagne (à 900 m d'altitude). Ces prospections préliminaires ont concerné des espèces des genres *Trifolium*, *Trigonella*, *Melilotus*, *Lathyrus* et *Vicia* et nous ont montré que ces plantes sont généralement bien nodulées. Cela a été l'occasion d'établir une collaboration entre notre Laboratoire de

Chapitre IV : Caractérisation de bactéries associées aux nodules de légumineuses spontanées du Liban

Montpellier (LSTM) et le département de production végétale de la Faculté d'agronomie de l'Université Libanaise (ULFA) dans le cadre d'un projet bilatéral CEDRE financé par le Ministère Français des Affaires Etrangères. Au cours de ce projet, nos recherches sur le terrain ont concerné des sites diversifiés, allant du méditerranéen humide (département de Jbeil) au pré-steppique (Békaa). Une attention particulière a été accordée aux légumineuses qui peuvent être utiles dans la réhabilitation des sites dégradés, notamment les carrières abandonnées qui sont nombreuses au Liban et qui constituent un véritable enjeu pour le pays. En général, il est admis que les espèces pérennes sont de meilleures candidates que les annuelles pour la végétalisation mais dans les essais de réhabilitation de terrains dégradés on introduit des associations phytosociologiques plutôt que des individus isolés (J-C. Cleyet-Marel, communication personnelle). Ainsi, il a été remarqué au cours de la végétalisation de carrières dans le sud de la France, qu'un couvert végétal peut être assuré par l'association de plusieurs types de plantes (Domergue *et al.*, 2001) :

- Des légumineuses herbacées comme *Dorycnium pentaphyllum*, *D. hirsutum*, *Astragalus*
- Des légumineuses arbustives comme *Coronilla glauca*, *Medicago arborea*, *Colutea arborescens* et *Spartium junceum*,
- Des plantes Actinorhiziennes (*Alnus*, *Eleagnus*)
- Des plantes non fixatrices d'azote comme *Celtis*, *Laurus*, *Phillyrea*, *Pinus*, *Prunus*, *Pistacia*, *Quercus*

Le travail réalisé au cours du projet CEDRE a permis d'explorer 76 espèces de légumineuses. La nodulation a été trouvée dans 70 des 76 espèces. Les bactéries associées aux nodules ont été isolées en partie à Montpellier et en partie à Beyrouth. Une collection de 180 isolats de nodules racinaires a ainsi été constituée.

Dans ce chapitre, nous étudions la diversité de 60 isolats de cette collection. Ces souches proviennent de nodules de 21 espèces de légumineuses appartenant à 13 genres différents : *Astragalus*, *Biserrula*, *Lathyrus*, *Lotus*, *Lupinus*, *Medicago*, *Melilotus*, *Onobrychis*, *Scorpiurus*, *Spartium*, *Trifolium*, *Trigonella* et *Vicia*. Nous les avons caractérisés par PCR-RFLP de la région de l'ADNr 16S-IGS et par séquençage partiel de l'ADNr 16S. Les résultats ont montré que ces souches appartiennent aux genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Bradyrhizobium*. On y trouve particulièrement *R. galegae*. D'autre part, une souche de *Bradyrhizobium* est trouvée associée avec des plantes du genre *Medicago*, résultat à rapprocher de celui de Yao *et al.* (2002).

PRELIMINARY CHARACTERISATION OF ROOT NODULE ISOLATES FROM WILD LEGUMES IN LEBANON BY 16S-IGS ARDRA AND 16S rDNA SEQUENCING

Frédéric Zakhia¹, Thérèse Atallah², Hélène Rizk², Samih Hajj², Carole El Hachem², Odile Domergue¹, Clémence Chaintreuil¹, Anne Willems³ and Philippe de Lajudie^{1*}.

¹Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR 113 IRD/CIRAD/AGROM/UM II, USC INRA Montpellier, France.

²Département de Production végétale. Université Libanaise, Faculté d'Agronomie. Beirut. Lebanon

³Laboratorium voor Mikrobiologie, Universiteit Gent, K.-L. Ledeganckstraat 35, B-9000. Gent, Belgium.

***Corresponding Author**

LSTM, Campus International de Baillarguet, TA10 / J, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Tél. ++33-467-593851 ; Fax : ++33-467-593802

Email: P-De.Lajudie@mpl.ird.fr

Accession numbers

To be submitted for publication in Systematic and Applied Microbiology

Running title

Legume Nodulating Bacteria from wild Legumes in Lebanon

Summary

We studied nodule bacterial symbionts of 21 legume species from Lebanon, belonging to the genera *Astragalus*, *Biserrula*, *Lathyrus*, *Lotus*, *Lupinus*, *Medicago*, *Melilotus*, *Onobrychis*, *Scorpiurus*, *Spartium*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vicia*. Root nodules were sampled in different pedoclimatic sites from humid to semi-arid regions, littoral, mountains, Bekaa valley, left-over quarries. A collection of 60 bacterial isolates were obtained from these root nodules and characterised by Restriction Analysis of the amplified 16S-IGS rDNA region (3 enzymes: *MspI*, *CfoI* and *HaeIII*) and by 16S rDNA partial sequencing. The results show that their symbionts belong to *Rhizobium*, *Sinorhizobium* and *Bradyrhizobium* lineages. Strains associated to *Lotus*, *Melilotus*, *Scorpiurus* and *Biserrula* were found phylogenetically close to *R. galegae*.

Key words: *Rhizobium* – *Bradyrhizobium* – *Sinorhizobium* – *Rhizobium galegae* - Legume – Mediterranean basin – Lebanon – rDNA.

INTRODUCTION

Globally Mediterranean climate is characterised by a cold / mild and wet winter and a long, hot and dry summer (CHATTERTON and CHATTERTON, 1984 ; LE HOUEROU, 1989), but eventually it may exhibit arid characteristics when extreme conditions take place (Emberger, 1938). Many plant species, well adapted to these conditions, have developed in these ecosystems, and the maintaining of the plant community structure is determined, for a large part, by soil microorganisms which contribute to plant development, some of them via symbiotic and endophytic associations (CLAY, 2001). Legume plants are diverse in the Mediterranean basin and have ecological, forage and human food importance. They form fruitful nitrogen-fixing symbioses with soil bacteria, so-called LNB for Legume Nodulating Bacteria. All LNB described so far belong to the α and β class of the Proteobacteria (ZAKHIA and de LAJUDIE, 2001; MOULIN et al., 2001; CHEN et al., 2001). Several studies have been reported on cultivated Mediterranean legumes, their symbiotic characteristics and symbionts, like *Medicago* spp. (JORDAN, 1984; EARDLY et al., 1990; MATERON, 1991; ROME et al., 1996; VAN BERKUM et al., 1998; JEBARA et al., 2001), *Phaseolus vulgaris* (AOUANI et al., 1997; PRIEFER et al., 2001) and *Cicer arietinum* (NOUR et al., 1994; 1995; AOUANI et al., 2001). Opposite, the nodulation of Mediterranean spontaneous herb legumes is still poorly documented (HELY and OFER, 1972; JHA, 1995; ZAHARAN, 1998; ZAKHIA et al., submitted). In Lebanon, where the present work takes place, some studies concerned some cultivated legumes, i.e. Chickpea (*Cicer arietinum*) (SAXENA, 1990; NOUR et al., 1995) and *Medicago* spp. (MATERON, 1991; ROME et al., 1996), mainly at the International Center For Agricultural Research Of Dry Areas (ICARDA), but none on wild legumes.

Molecular techniques are widely used for LNB characterisation, among which ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) of the 16S rDNA (LAGUERRE et al., 1994; TEREFEWORK ; et al., 1998; NICK, 1999) and of the total 16S-IGS rDNA region in the case of *M. mediterraneum* (NOUR et al., 1995) and of *Bradyrhizobium* sp. isolates from the Mediterranean shrub *Spartium junceum* (QUATRINI et al., 2002). On the other hand, 16S rDNA sequencing is now unavoidable for bacterial classification (WOESE, 1987; ZAKHIA and de LAJUDIE, 2001).

In Lebanon we sampled 21 species of spontaneous legumes belonging to the genera *Astragalus*, *Biserrula*, *Lathyrus*, *Lotus*, *Lupinus*, *Medicago*, *Melilotus*, *Onobrychis*, *Scorpiurus*, *Spartium*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vicia*, in the humid zone (Department of Jbeil), in the dry mediterranean Central BEKAA, in the semi-arid BEKAA valley, and in several left-over quarries (ANTELIAS, KORTADA). Legume plants were generally well nodulated and a collection of 60 root nodule isolates was assembled. These isolates were characterised by restriction analysis of the 16S-IGS rDNA whole region and by 16S rDNA partial

sequencing. The results show that their symbionts belong to *Rhizobium*, *Sinorhizobium* and *Bradyrhizobium* lineages.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture media

The new isolates and their host plants of origin are listed in Table 1. Reference strains are listed in Table 2.

All *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains were maintained on yeast mannitol agar (YMA) (VINCENT, 1970) at 28°C, containing (g L⁻¹): mannitol, 10; sodium glutamate, 0.5; K₂HPO₄, 0.5; MgSO₄.7H₂O, 0.2; NaCl, 0.05; CaCl₂, 0.04; FeCl₃, 0.004; yeast extract (Difco), 1; pH 6.8; agar, 20. All strains were stored at -80 °C on the same medium plus 20 % v/v glycerol.

Bacterial isolation procedure

Naturally occurring root nodules were collected *in natura* and either directly used for bacterial isolation or stored dried in tubes containing SilicaGel (SOMASEGARAN and HOBEN, 1994). Upon utilisation, nodules are rehydrated in sterile water and surface sterilised by immersion in Calcium hypochloride (3 %) for 5 min. The nodules are then aseptically rinsed 8 times with sterile water, crushed in a drop of sterile water and the suspension is streaked on YMA in Petri dishes. Colonies appeared after several day incubation at 28°C in aerobic conditions. They were checked for purity by repeated streaking on YMA and by microscopic examination of living cells. Isolates were stored at - 80°C in YM adjusted to 20 % (v / v) glycerol.

DNA preparation

Cells from 2-3 day old YMA plate cultures were suspended in sterile water and washed twice. The optical density at 620 nm (O. D.) was then measured, and a volume corresponding to 200 µL matching an O. D. (620 nm) = 1 was centrifugated at 12 000 rpm during 2 min. The pellet was suspended in 100 µL of sterile water. 100 µL of Tris-Cl (10 mM, pH 8,3) and 20 µL of proteinase K (1 mg L⁻¹ solution) (Promega, Madison WI USA) were successively added. After 2h incubation at 55°C, proteinase K was denatured 10 min in boiling water. The solution was then centrifugated 14 000 rpm for 10 min. The supernatant containing DNA was stored at - 20°C until use. For some strains, we performed DNA extraction as described by SAMBROOK and RUSSEL (2001).

DNA amplification

16S-IGS ribosomal DNA amplification was performed in a Perkin-Elmer model 2400 thermocycler (Perkin Elmer, Nieuwerkerk a / d Ijssel, The Netherlands) and the 50 μ L (total volume) reaction mixture contained 100 ng of genomic DNA, reaction buffer (Invitrogen, USA), dNTP 2,5 mM each (Sigma-ALDRICH, Germany), primers FGPS6 and 23S-38 (see table 3, 20 μ M each Biotech AG), MgCl₂ 50 mM, 1 unit of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA), and Milli-Q water. A negative control without template was included in every PCR run. The amplification conditions were as follow: initial denaturation (5 min at 94°C), 38 cycles each consisting of denaturation (30 sec at 94°C), annealing (30 sec at 55°C), extension (7 min at 72°C) and final extension for 7 min at 72°C. The PCR products were checked by horizontal electrophoresis in 0,8 % agarose gel in TAE buffer (40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA, pH 8,3) containing 2 drops of 0,5 mg / mL ethidium bromide (15 min at 50V and 1h at 100V). The gel images were scanned and analysed as described below.

16S ribosomal DNA amplification was carried out in a 50 μ L reaction mixture using the same concentrations as described above. Nearly full-length 16S ribosomal DNA was amplified using the universal eubacterial 16S rDNA primers FGPS6 and FGPS1509 (NORMAND et al., 1992). The same PCR program was applied as above but using 35 cycles instead of 38. The PCR products were checked by horizontal electrophoresis in 1 % agarose TAE buffer gels (1h at 100V).

16S-IGS ARDRA

10 μ L aliquots of PCR products were digested with *Msp*I, *Cfo*I, *Hae*III, during 2 hours in a 20 μ L final volume as specified by the manufacturer (Promega) but with an excess of enzyme (5 units per reaction). Restriction fragments were analysed by horizontal gel electrophoresis using 3 % Metaphor agarose (FMC bioproducts USA) in TBE buffer (89 mM Tris-Borate, 2 mM EDTA, pH 8,3) containing 2 drops of 0,5 mg.mL⁻¹ ethidium bromide. The electrophoresis was performed using a 15 x 10 cm tray, 12 wells (Easy Cast, Electrophoresis system Model # B1, OW1, Scientific Inc.) at 50 V during 15 min and at 80 V for 3 hours. The gel images were scanned and analysed as described below.

Gel Analysis

After electrophoresis, the gel images were scanned and digitised then stored in a computer using Perfect Image software (V-5.3, Clara Vision, Germany). Profiles were normalised, combined and clustered using the Gel-Compar II, version 3.0 software package (Applied

Maths) (VAUTERIN & VAUTERIN, 1992). Dice coefficient and UPGMA clustering were used.

16S rDNA sequencing

PCR products of 16S rRNA gene were run on a 1% agarose gel, band was excised and DNA purified using a QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and sequenced by using the primers FGPS6, FGPS1509, 16S-370f, 16S-1080r, 16S-870f and 16S-1924r (Table 3). Sequence reactions were performed with the ABI Prism BigDye Terminator Cycle sequence kit (Applied Biosystem, Foster City, Calif.) and analysed on an Applied Biosystems model 310 DNA sequencer. Sequences were compared to those of Genbank database.

RESULTS

Collection of root nodule isolates from wild legumes in Lebanon

We investigated spontaneous legumes in different sites in Lebanon (Fig. 1), including the humid regions (NAHR IBRAHIM river coasts and KOUKDANE mountain in JBEIL department), in the dry mediterranean Central BEKAA, in the semi-arid BEKAA valley, and in several left-over quarries (KORTADA, ANELIAS). We focused on 18 annual and 3 perennial spontaneous nodulated legume species representing the 13 genera *Astragalus*, *Biserrula*, *Lathyrus*, *Lotus*, *Lupinus*, *Medicago*, *Melilotus*, *Onobrychis*, *Scorpiurus*, *Spartium*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vicia* (table 1). Nodules were collected from these plants, and a collection of 60 LNB isolates was assembled (Table 1). All isolates were fast-growing bacteria, except one slow-growing (STM 1735). As seeds of the plants of isolation were not available, laboratory plant nodulation tests could not be performed.

16S-IGS rDNA PCR amplification

The PCR amplification yield relied strongly on the DNA quality and, in our hands, DNA obtained using the method of SAMBROOK and RUSSEL (2001) gave better results than that obtained via the proteinase K extraction technique. We retained strains exhibiting one single band (60 isolates) by PCR amplification using primers designed for the 16S-IGS DNA region. The approximate sizes of the 16S-IGS rDNA PCR products of the new isolates and reference strains varied between 2400 and 3100 bp (Table 1; Table 2). The 16S-IGS sizes of reference strains were consistent with those reported in literature, except for *Rhizobium etli*, for which

we obtained 3000 bp instead of 2600 bp (QUATRINI et al., 2002) and for *Mesorhizobium mediterraneum*, 3100 bp instead of 2500 bp (NOUR et al., 1995). The strain STM 1735 identified (see Table 1) as *Bradyrhizobium* strain exhibited a 16S-IGS size of 2500 bp, which is consistent with that reported by QUATRINI et al. (2002) who found 2400 bp and some *Bradyrhizobium* strains from tropical legumes which exhibited an IGS size varying between 780 and 1038 bp (DOIGNON-BOURCIER et al., 2000).

16S-IGS ARDRA

16S-IGS rDNA PCR products were analysed by RFLP using three enzymes. In our study, we included *Sinorhizobium meliloti* (ORS 634), *Rhizobium mongolense* (STM 246^T) and *Burkholderia tuberum* (STM 678^T) as reference strains. Profiles obtained with the 3 restriction enzymes were combined and analysed using the GelComparII. The resulting patterns matched 8 to 11 bands (*Cfo*I), 6 to 9 bands (*Hae*III, *Msp*I). Altogether, combined profiles resulted in almost 29 bands for cluster analysis. Results are shown in table 1 and as a dendrogram on Fig. 2. At a level of 50% we delineated 3 clusters: cluster I, the largest one with at least 7 subclusters, contains 41 new isolates among which 5 strains grouping with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* by comparative SDS-PAGE protein profile analysis (unpublished data), Cluster II encompasses *Sinorhizobium meliloti* reference strain, and 8 new isolates one of which (STM 1087) grouping with *Sinorhizobium kostiense* by SDS-PAGE protein analysis (unpublished data). ARDRA cluster III consists of 6 new isolates which share almost similar profiles (at 50 % homology) and no reference strain. Four new isolates (STM 1703, STM 1730, STM 1731 and STM 1735) and *R. mongolense* strain STM 246^T occupied separate positions.

16S rDNA partial sequencing

19 representative strains from the different ARDRA subclusters were selected for partial 16S rDNA sequencing. The blast results showed 3 groups of strains: Group 1 corresponds to *Rhizobium* branch, Group 2 to *Sinorhizobium* branch and Group 3 to *Agrobacterium* – *Rhizobium galegae* branch (table 1).

DISCUSSION

To our knowledge this is the first report on LNB from spontaneous wild legumes in Lebanon. We isolated 60 strains from nodules of almost 21 legume species sampled in different eco-climatic regions. For their characterisation, we used 16S-IGS ARDRA as a grouping method

(NOUR et al., 1995; QUATRINI et al., 2002), followed by 16S rDNA sequencing of representative strains. The variability in the sequence of the 16S-IGS rDNA region allowed strong discrimination among the studied strains, showing their diversity and 16S rDNA sequencing enabled their affiliation at the genus level.

Majority of strains (41) were members of ARDRA cluster I, originating from different plants and sites (KOUKDANE mountain, NAHR IBRAHIM river coast, quarries and BEKAA)(Table 1). The 16S rDNA partial sequences of 6 strains from Cluster I indicate that they belong to the *Rhizobium* lineage. This is consistent with SDS-PAGE protein profile analysis (unpublished data) in which 5 strains of Cluster 1 group with *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Partial 16S rDNA sequence of another member (strain STM 1714) shows homology with *Agrobacterium rhizogenes*. Phylogenetically this species is long recognized to group in *Rhizobium* (WILLEMS and COLLINS, 1993) and total 16S rDNA sequence is required to precise the taxonomic position of strain STM 1714. ARDRA Cluster II contains also strains from diverse plants geographical regions (Quarry, semi-arid or humid regions), including *Sinorhizobium meliloti* reference strain ORS 634 and strain STM 1087 grouping with *Sinorhizobium kostiense* in SDS-PAGE analysis (unpublished results, table 1). The partial 16S rDNA sequencing results on two other strains (STM 1702, STM 1720) confirmed that the strains in ARDRA cluster II belong to the *Sinorhizobium* lineage. ARDRA Cluster III consists of 6 strains originating from different plant species in Jbeil department, and the partial 16S rDNA sequencing of 5 of them indicates homology to *Rhizobium galegae*. Full length 16S rDNA sequencing is necessary to precise their phylogenetic position. *R. galegae* was isolated from *Galega* species in Caucasus (LINDSTRÖM, 1989) and was also recently found in Mediterranean legumes i.e. *Astragalus cruciatus*, *Lotus creticus* and *Anthyllis henoniana* (ZAKHIA et al., submitted). The strains STM 1703, STM 1730 occupied separate positions in ARDRA analysis and they are close to *Agrobacterium tumefaciens* according to 16S rDNA partial sequencing. Strain STM 1735, isolated from *Medicago orbicularis*, separate position in ARDRA, is close to *Bradyrhizobium* by DNA sequencing, which is unique for lucerne. The strains STM 1731 and STM 1700, also having separate positions in ARDRA, are close to *Sinorhizobium* species according to 16S rDNA sequencing.

The associated symbionts of these legumes are presented in Table 4.

Plants of the genus *Astragalus* have been reported to be nodulated either by *Rhizobium* (LAGUERRE et al., 1997; ZAKHIA et al., submitted) or *Mesorhizobium* species (CHEN et al., 1991; LAGUERRE et al., 1997). Here we found that *Astragalus hamosus* nodule isolate (STM 1880, ARDRA cluster I) is likely to belong to *Rhizobium*.

Biserrula Pelecinus is the only species of the genus *Biserrula* (ALLEN and ALLEN, 1981). This legume was studied for nodulation (LOI et al., 1999) but no taxonomical characterisation of its LNB was reported so far. Here we found this plant associated to *Rhizobium* sp. strains.

Lathyrus species were found here associated with *Rhizobium* sp. strains, which is consistent with previous reports (ZAKHIA et al., submitted; DROUIN et al., 1996).

In literature *Lotus* species were reported to be nodulated by *Mesorhizobium loti* (JARVIS et al., 1982), *R. galegae* and *Sinorhizobium* sp. (ZAKHIA et al., submitted), *Bradyrhizobium* sp. (JORDAN, 1982; 1984). *Lotus ornithopodioides* and *Lotus* sp. were found here associated to *Rhizobium* sp. and *Sinorhizobium* sp. (table 1). In addition, *R. galegae* - like strains were found here associated to *Lotus ornithopodioides*.

Lupinus species are generally nodulated by bradyrhizobia species (BARRERA et al., 1997, BRAND et al., 2000). Here we studied *Lupinus pilosus*, a wild legume proposed as an alternative crop in calcareous soils since cultivated species of lupines are poorly adapted to such soils (BRAND et al., 1999). Strain STM 1727 isolated from *L. pilosus* was identified as *Rhizobium* sp. (table 1).

Medicago species are known to be nodulated by *Sinorhizobium medicae*, *S. meliloti* (ROME et al., 1996; de LAJUDIE, 1994) or *Rhizobium mongolense* (VAN BERKUM et al., 1998). Recently, *Medicago sativa* has been shown to be also nodulated by *Bradyrhizobium yuanmingense* (YAO et al., 2002). Here new isolates from *Medicago* spp. belong to ARDRA cluster V corresponding to *Sinorhizobium*. and the strain STM 1885, originating from *M. sativa* belongs to *Rhizobium*. Here we report also a *Bradyrhizobium* species associated to *Medicago orbicularis* and the nodulation of *M. coronata* is reported for the first time.

The *Melilotus* isolate STM 176 belongs to *Sinorhizobium* as deduced from ARDRA, which is in agreement with literature (BROMFIELD et al., 1995; YAN et al., 2000; BROMFIELD et al., 2001).

The LNB isolated from some *Onobrychis* species have been characterised as *Rhizobium* sp. (LAGUERRE et al., 1997), different from *R. galegae* and *A. tumefaciens*, on the basis of total cell protein profiles (GIGOVA et al., 1997). Here strain STM 1730 showed some 16S rDNA sequence homology with *Agrobacterium*.

Scorpiurus plants, already reported to be nodulated (HELY and OFER, 1972) was found here associated with *Rhizobium* sp.

Spartium junceum has been reported to be nodulated by *Bradyrhizobium* species (QUATRINI et al. (2002). Here we found this plant nodulated by *Rhizobium* sp.

Clover LNB are among the first root-nodule bacteria to have been studied. *Trifolium* and *Vicia* species are generally nodulated by *Rhizobium leguminosarum* (ALLEN and ALLEN, 1981; JORDAN, 1984). Here, LNB from *Trifolium* all belong to *Rhizobium*, except strain STM 1731 which belongs to *Sinorhizobium*. Strains originating from *Vicia* species belong also to the *Rhizobium* branch.

Trigonella LNB have been shown to belong to *Sinorhizobium* (ALLEN and ALLEN, 1981; VELÁZQUEZ et al., 1998). Here LNB associated to *Trigonella* were identified either as

Sinorhizobium sp. (STM 1087, STM 1098, STM 1760) or *Rhizobium* sp. (STM 1360 and STM 1368).

Our genotypic approach allowed us to determine the identity of associated nodule forming bacteria (LNB) at the genus level. This is the first report on the characterisation of LNB in Lebanon recovered from wild legumes. The 16S-IGS PCR-RFLP is a powerful technique for taxonomical determination (QUATRINI et al., 2002) but here the groups weren't separated at the species level because of the variability of the IGS and of the choice of three enzymes. On the other hand, main difficulties were encountered during PCR amplification to obtain sufficient and good quality DNA. The majority of the studied strains belonged to the *Rhizobium* genus and a part of them belonged to the *Sinorhizobium* genus. One isolate belongs to *Bradyrhizobium* genus. Further characterisation is required for species affiliation, i.e. mainly full length 16S rDNA sequencing and DNA/DNA hybridisation.

Acknowledgments : The authors are grateful to GUY and ANTOINE ZAKHIA for help in sampling expeditions, to GUSTAVE GINTZBURGER for plant determination and helpful discussions and to MAGALI ROUSSEL, EMMANUEL PROTIERE and ASHRAF ZAKY for technical assistance, FZ is indebted to IRD France for a PhD fellowship, and AW to the Fund for Scientific Research - Flanders for a postdoctoral research fellow and research grants.

Table 1. New isolates and main results.

Strain	Other strain designation	Host plant	Geographical origin	IGS size*	16S-IGS ARDRA Group	Partial 16S rDNA sequencing**
STM 1092 ^a		<i>Trifolium nigrescens</i>	Koukdane – Jbeil	2650	I	
STM 1123		<i>Vicia hybrida</i>	Koukdane – Jbeil	2650	I	
STM 1358		<i>Trifolium repens</i>	Nahr Ibrahim	2600	I	
STM 1714	ULFA 31	<i>Vicia hybrida</i>	Halate – Jbeil	3000	I	<i>A. rhizogenes</i> (96%, 660 bp)
STM 1088 ^a		<i>Trifolium sp</i>	Koukdane - Jbeil	2800	I	
STM 1091 ^a		<i>Trifolium nigrescens</i>	Koukdane – Jbeil	2800	I	
STM 1094 ^a		<i>Lathyrus sp</i>	Koukdane – Jbeil	2700	I	
STM 1095 ^a		<i>Lathyrus sp</i>	Koukdane – Jbeil	2750	I	
STM 1124		<i>Vicia hybrida</i>	Koukdane – Jbeil	2750	I	
STM 1125		<i>Vicia hybrida</i>	Koukdane – Jbeil	2650	I	
STM 1357		<i>Trifolium angustifolium</i>	Koukdane – Jbeil	2800	I	
STM 1360		<i>Trigonella sp</i>	Nahr Ibrahim	2800	I	
STM 1362		<i>Trifolium sp</i>	Nahr Ibrahim	2700	I	
STM 1363		<i>Trifolium sp</i>	Nahr Ibrahim	2800	I	
STM 1368		<i>Trigonella sp</i>	Nahr Ibrahim	2700	I	
STM 1370		<i>Lathyrus aphaca</i>	Nahr Ibrahim	2900	I	
STM 1401		<i>Trifolium nigrescens</i>	Nahr Ibrahim	2800	I	
STM 1402		<i>Lathyrus aphaca</i>	Nahr Ibrahim	2800	I	

Chapitre IV : Caractérisation de bactéries associées aux nodules de légumineuses spontanées du Liban

Table 1 continued

STM 1427		<i>Trifolium nigrescens</i>	Nahr Ibrahim	2750	I	
STM 1428		<i>Trifolium nigrescens</i>	Nahr Ibrahim	2700	I	
STM 1711	ULFA 28	<i>Lotus ornithopodioides</i>	Antelias quarry - Metn	3000	I	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (98%, 595 bp)
STM 1127		<i>Vicia hybrida</i>	Koukdane – Jbeil	2800	I	
STM 1218		<i>Vicia hybrida</i>	Koukdane – Jbeil	2700	I	
STM 1367		<i>Lathyrus sp</i>	Nahr Ibrahim	2850	I	
STM 1369		<i>Trifolium repens</i>	Nahr Ibrahim	2900	I	
STM 1706	ULFA 17	<i>Trifolium clypeatum</i>	El Oweynate - Jbeil	3000	I	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (96%, 591 bp)
STM 1709	ULFA 24	<i>Lathyrus aphaca</i>	El Machnaqua - Jbeil	3000	I	<i>Rhizobium etli</i> (97%, 711 bp)
STM 1725	ULFA 46	<i>Vicia amphicarpa</i>	Chlifa – Northern Bekaa	3000	I	
STM 1120		<i>Lathyrus aphaca</i>	Koukdane – Jbeil	2800	I	
STM 1129		<i>Lathyrus sp</i>	Koukdane – Jbeil	2800	I	
STM 1130		<i>Lathyrus sp</i>	Koukdane – Jbeil	2800	I	
STM 1220		<i>Lathyrus sp</i>	Koukdane – Jbeil	2900	I	
STM 1355		<i>Lathyrus sp</i>	Koukdane – Jbeil	2800	I	
STM 1364		<i>Lathyrus aphaca</i>	Nahr Ibrahim	2800	I	
STM 1440		<i>Lotus sp</i>	Nahr Ibrahim	2650	I	
STM 1716	ULFA 33	<i>Trifolium clypeatum</i>	El Machnaqua - Jbeil	3000	I	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (98%, 565 bp)
STM 1727	ULFA 49	<i>Lupinus pilosus</i>	Dhour Adonis - Jbeil	3000	I	<i>R. etli</i> (98%, 469 bp)
STM 1789	ULFA 56b	<i>Trifolium subterraneum</i>	Terbol – Central Bekaa	3000	I	
STM 1879	ULFA106	<i>Spartium junceum</i>	Kortada quarry - Metn	3000	I	<i>R. mongolense</i> (96%, 569 bp)

Chapitre IV : Caractérisation de bactéries associées aux nodules de légumineuses spontanées du Liban

Table 1 continued

STM 1880	ULFA 107	<i>Astragalus hamosus</i>	Terbol – Central Bekaa	3000	I	
STM 1885	ULFA 123	<i>Medicago sativa</i>	El Machnaqua - Jbeil	3000	I	
STM 1087 ^b		<i>Trigonella foenum graecum</i>	Koukdane - Jbeil	2800	II	
STM 1098		<i>Trigonella foenum graecum</i>	Koukdane – Jbeil	2800	II	
STM 1128		<i>Medicago rugosa</i>	Koukdane – Jbeil	2800	II	
STM 1702	ULFA 8a	<i>Medicago minima</i>	Antelias quarry - Metn	3000	II	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (97%, 560 bp)
STM 1720	ULFA 37	<i>Lotus sp</i>	Halate - Jbeil	3000	II	<i>Sinorhizobium sp</i> (98%, 573 bp)
STM 1760	ULFA 93	<i>Trigonella monspeliaca</i>	Chlifa – Northern Bekaa	2500	II	
STM 1761	ULFA 94	<i>Melilotus sp</i>	Halate - Jbeil	3000	II	
STM 1876	ULFA 1	<i>Medicago coronata</i>	Es Sare – Jbeil	3000	II	
STM 1731	ULFA 56a	<i>Trifolium subterraneum</i>	Terbol – Central Bekaa	2500	sep	<i>S. morelense</i> (94%, 463 bp)
STM 1700	ULFA 5	<i>Medicago minima</i>	Antelias quarry - Metn	Nt	Nt	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (97%, 339 bp)
STM 1708	ULFA 22	<i>Lotus ornithopodioides</i>	Antelias quarry – Metn	3000	III	<i>Rhizobium galegae</i> (97%, 724 bp)
STM 1713	ULFA 90	<i>Lotus ornithopodioides</i>	Es Sare - Jbeil	2500	III	<i>R. galegae</i> (97%, 596 bp)
STM 1736	ULFA 61	<i>Scorpiurus sulcatus</i>	Dhour Adonis – Jbeil	3000	III	<i>R. galegae</i> (97%, 572 bp)
STM 1748	ULFA 79	<i>Biserrula pelecinus</i>	Shware Meshane - Jbeil	3000	III	<i>R. galegae</i> (98%, 574 bp)
STM 1749	ULFA 80	<i>Scorpiurus subvillosus</i>	Maayane – Jbeil	3000	III	
STM 1756	ULFA 89	<i>Lotus ornithopodioides</i>	Ed Dabshe – Jbeil	3000	III	<i>R. galegae</i> (98%, 606 bp)
STM 1703	ULFA 10	<i>Trifolium clypeatum</i>	Antelias quarry – Metn	2000	sep	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (97%, 539 bp)
STM 1730	ULFA 55	<i>Onobrychis cristagalli</i>	Halate – Jbeil	2500	sep	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (98%, 510 bp)
STM 1735	ULFA 60	<i>Medicago orbicularis</i>	Halate – Jbeil	2500	sep	<i>B. japonicum</i> (97%, 799 bp)

* Approximate 16S-23S IGS rDNA PCR product length (bp) as estimated by Gelcompar

** The BLAST closest match in NCBI is shown. Between brackets are given the percentages of sequence homology with 16S rDNA from Genbank and the number of base pairs considered in analysis.

^a Strains grouping in total cell protein analysis with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (data not shown)

^b Strain grouping in total cell protein analysis with *Sinorhizobium kostense*. (data not shown)

Table 2. Reference Strains used in this study and their corresponding IGS size (PCR)

Strain	Other strain designation	Host plant or origin	Geographical origin	Reference or source	IGS size*
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> ORS 1352 ^T	LMG 150 ^T	-	-		2700
<i>Agrobacterium rubi</i> ORS 1353	LMG 159	<i>Rubus sp.</i>	USA, 1942	KERSTERS et al., 1973	3000
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ORS 1351 ^T	LMG 140 ^T	-	-	de LAJUDIE et al, 1999	2600
<i>Agrobacterium vitis</i> ORS 2643	LMG 257	<i>Vitis vinifera</i>	Greece	LMG	2800
<i>Allorhizobium undicola</i> ORS 992 ^T	LMG 11875 ^T	<i>Neptunia natans</i>	Senegal	de LAJUDIE et al., 1998a	3100
ORS 995	LMG 11876	<i>Neptunia natans</i>	Senegal	de LAJUDIE et al., 1998a	3100
<i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS 571 ^T	LMG 6465 ^T	<i>Sesbania rostrata</i>	Senegal	DREYFUS et al., 1988	2700
<i>Burkholderia tuberum</i> STM 678 ^T	LMG 21444 ^T	<i>Aspalathus carnosa</i>	South Africa	MOULIN et al., 2001	2500
<i>Mesorhizobium amorphae</i> STM 238	LMG 18932 or 18960	<i>Amorpha fruticosa</i>	Belgique		2600
<i>Mesorhizobium huakuii</i> ORS 1752 ^T	LMG 14107 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	China	CHEN et al., 1991	2550
<i>Mesorhizobium loti</i> ORS 664 ^T	LMG 6125 ^T	<i>Lotus tenuis</i>	New Zealand	JARVIS et al., 1986	2450
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i> Ca-36 ^T , ORS 2739 ^T	LMG 17148 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	Spain	NOUR et al., 1995	3100
<i>Mesorhizobium plurifarium</i> ORS 1001	LMG 7836	<i>Acacia senegal</i>	Senegal	de LAJUDIE et al., 1998b	2400
<i>Mesorhizobium tianshanense</i> ORS 2640 ^T	LMG 15767 ^T	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	China	CHEN et al., 1995	2600

Chapitre IV : Caractérisation de bactéries associées aux nodules de légumineuses spontanées du Liban

Table 2 continued

<i>Methylobacterium nodulans</i>					
ORS 2060 ^T		<i>Crotalaria podocarpa</i>	Senegal	SY et al., 2001	2400
<i>Rhizobium etli</i>					
ORS 645 ^T	LMG 11937 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Mexico	SEGOVIA et al., 1993	3000
<i>Rhizobium galegae</i>					
HAMBI 540 ^T	LMG 6214 ^T , ORS 668 ^T	<i>Galega orientalis</i>	Finland	LINDSTRÖM, 1989	2900
<i>R. huautlense</i>					
STM 279 ^T	LMG 18254	<i>Sesbania herbacea</i>	Mexico	WANG et al., 1998	2800
<i>R. leguminosarum</i> bv phaseoli					
ORS 662	LMG 8819T2				2800
<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii					
ORS 663	LMG 8820				2800
<i>R. leguminosarum</i> bv viciae					
ORS 639	LMG VF39SM				3000
<i>Rhizobim mongolense</i>					
USDA 1844 ^T , STM 246 ^T	LMG 19141 ^T	<i>Medicago ruthenica</i>	Mongolia, China	VAN BERKUM et al., 1998	3000
<i>Rhizobium tropici</i> IIa					
ORS 651	LMG 9517	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Brazil	MARTINEZ-ROMERO et al., 1991	3100
<i>Rhizobium tropici</i> IIb					
ORS 625 ^T		<i>Phaseolus vulgaris</i>		MARTINEZ-ROMERO et al., 1991	2800
<i>Sinorhizobium arboris</i>					
ORS 1755 ^T	LMG 14919 ^T	<i>Prosopis chilensis</i>	Sudan	NICK et al., 1999	2800
<i>Sinorhizobium fredii</i>					
ORS 669 ^T	LMG 6217 ^T	<i>Glycine max</i>	China	JARVIS et al., 1986	2900
<i>Sinorhizobium kostiense</i>					
ORS 513	LMG 15613	<i>Prosopis chilensis</i>	Soudan	NICK et al., 1999	2800
<i>Sinorhizobium medicae</i>					
M 102, ORS 504	LMG 16580, HAMBI 1809	<i>Medicago truncatula</i>	ICARDA, Syria	EARDLY et al., 1990	2750
<i>Sinorhizobium meliloti</i>					
NZP 4027 ^T , ORS 665 ^T	LMG 6133 ^T	<i>Medicago sativa</i>	Virginia, USA	-	2900
NZP 4009, ORS 634	LMG 6130	<i>Medicago sativa</i>	Australia	-	2800

Chapitre IV : Caractérisation de bactéries associées aux nodules de légumineuses spontanées du Liban

Table 2 continued

<i>Sinorhizobium saheli</i>					
ORS 609 ^T	LMG 7837 ^T	<i>Sesbania cannabina</i>	Senegal	de LAJUDIE et al, 1994	2900
ORS 611	LMG 8310	<i>Sesbania grandiflora</i>	Senegal	de LAJUDIE et al, 1994	2800
<i>Sinorhizobium teranga</i>					
ORS 51	LMG 6464	<i>Sesbania rostrata</i>	Senegal	de LAJUDIE et al., 1994	2800
ORS 1009 ^T	LMG 7834 ^T	<i>Acacia laeta</i>	Senegal	de LAJUDIE et al, 1994	2800

Sep, separate position

* Approximate 16S-23S IGS rDNA PCR product length (bp) as estimated by Gelcompar

Table 3. Primers used in this study

Primer name	Primer sequence	Target gene	Reference
FGPS 6	5' GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA G 3'	16S rDNA	NORMAND et al., 1992
FGPS 1509	5'AAG GAG GGG ATC CAG CCG CA 3'	16S rDNA	NORMAND et al., 1992
16S-870f	5' CCT GGG GAG TAC GGT CGC AAG 3'	16S rDNA	SY et al., 2001
16S-1080r	5' GGG ACT TAA CCC AAC ATC T 3'	16S rDNA	SY et al., 2001
16S-370f	5' GGC AGC AGT GGG GAA TAT TG 3'	16S rDNA	SY et al., 2001
16S-1924 rev	5' GGC ACG AAG TTA GCC GGG GC 3'	16S rDNA	SY et al., 2001
23S-38	5' CCG GGT TTC CCC ATT CGG 3'	23S rDNA	PONSONNET and NESME, 1994

Table 4. Recapitulative results of root nodules symbionts from diverse sites in Lebanon

LEGUME (Papilionoideae)				SYMBIONT
Tribe	Genus	species	Biology	
Galegeae	<i>Astragalus</i>	<i>A. hamosus</i>	Annual	<i>Rhizobium</i> sp
	<i>Biserrula</i>	<i>B. pelecinus</i>	Annual	<i>Rhizobium</i> sp (<i>R. galegae</i>)*
Genisteae	<i>Lupinus</i>	<i>L. pilosus</i>	Annual	<i>Rhizobium</i> sp (<i>R. etli</i>)*
	<i>Spartium</i>	<i>S. junceum</i>	Perennial	<i>Rhizobium</i> sp (<i>R. mongolense</i>)*
Hedysareae	<i>Onobrychis</i>	<i>O. cristagalli</i>	Perennial	<i>Rhizobium</i> sp
Loteae	<i>Lotus</i>	<i>L. ornithopodioides</i>	Annual	<i>Rhizobium</i> sp (<i>R. leguminosarum</i>)*
		<i>L. ornithopodioides</i>	Annual	<i>Rhizobium</i> sp (<i>R. galegae</i>)*
		<i>Lotus</i> sp	-	<i>Rhizobium</i> sp, <i>Sinorhizobium</i> sp
	<i>Scorpiurus</i>	<i>S. subvillosus</i>	Annual	<i>Rhizobium</i> sp (<i>R. galegae</i>)*
		<i>S. sulcatus</i>	Annual	<i>Rhizobium</i> sp (<i>R. galegae</i>)*
	Trifolieae	<i>Medicago</i>	<i>M. coronata</i>	Annual
<i>M. minima</i>			Annual	<i>Sinorhizobium</i> sp (<i>S. meliloti</i>)*
<i>M. orbicularis</i>			Annual	<i>Bradyrhizobium</i> sp (<i>B. japonicum</i>)*
<i>M. rugosa</i>			Annual	<i>Sinorhizobium</i> sp
<i>M. sativa</i>			Perennial	<i>Rhizobium</i> sp
<i>Melilotus</i>		<i>Melilotus</i> sp	-	<i>Sinorhizobium</i> sp
<i>Trifolium</i>		<i>T. angustifolium</i>	Annual	<i>Rhizobium</i> sp
		<i>T. clypeatum</i>	Annual	<i>Rhizobium</i> sp (<i>R. leguminosarum</i>)*
		<i>T. nigrescens</i>	Annual	<i>Rhizobium</i> sp
		<i>T. repens</i>	Perennial	<i>Rhizobium</i> sp
		<i>Trifolium</i> sp	-	<i>Rhizobium</i> sp
		<i>T. subterraneum</i>	Annual	<i>Rhizobium</i> sp
		<i>T. subterraneum</i>	Annual	<i>Sinorhizobium</i> sp (<i>S. morelense</i>)*
Trifolieae	<i>Trigonella</i>	<i>T. foenum graecum</i>	Annual	<i>Sinorhizobium</i> sp
		<i>T. monspeliaca</i>	Annual	<i>Sinorhizobium</i> sp
		<i>Trigonella</i> sp	-	<i>Rhizobium</i> sp
Vicieae	<i>Lathyrus</i>	<i>L. aphaca</i>	Annual	<i>Rhizobium</i> sp (<i>R. etli</i>)*
		<i>Lathyrus</i> sp	-	<i>Rhizobium</i> sp
	<i>Vicia</i>	<i>V. amphicarpa</i>	Annual	<i>Rhizobium</i> sp
		<i>V. hybrida</i>	Annual	<i>Rhizobium</i> sp

* Closest species by blast



Fig. 1 Map of Lebanon. Legumes were sampled in Jbeil, Qartaba and Bekaa.

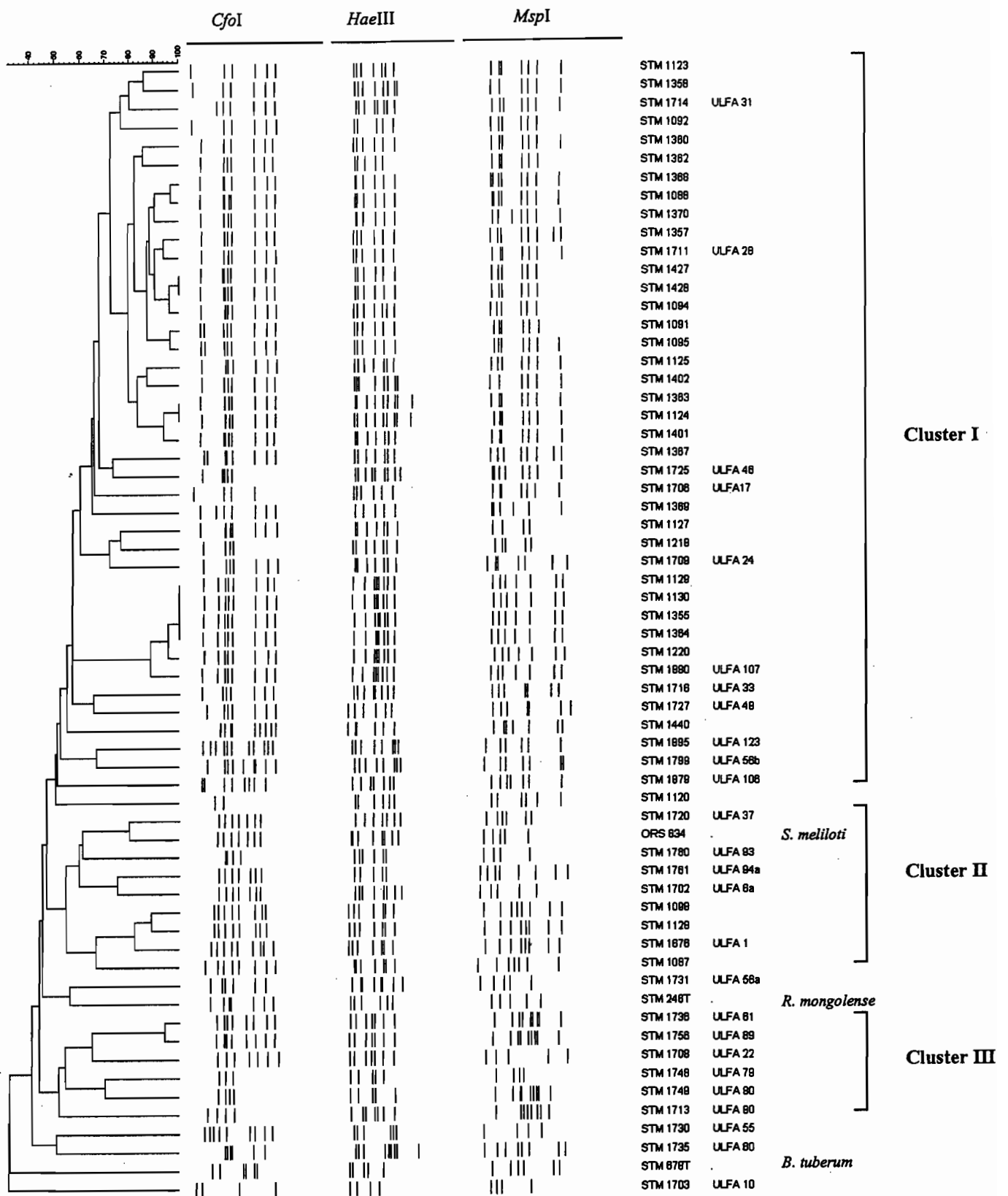


Fig. 2 Dendrogram based on the unweighted pair method using average linkage (UPGMA) clustering of Dice correlation values (S_D) of normalised and combined 16S-IGS ARDRA patterns (*CfoI*, *HaeIII*, *MspI*) of isolates from Lebanon including 3 reference strains

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans la région méditerranéenne, très peu d'études étaient connues sur les BNL des légumineuses spontanées. Nous contribuons à travers ce travail, à l'élargissement de l'étude vers les BNL associées à ces légumineuses.

Dans les chapitres III (Tunisie) et IV (Liban), 154 isolats bactériens hôtes de légumineuses méditerranéennes ont été caractérisés

60 des 94 isolats de Tunisie et les 60 isolats du Liban appartiennent à des genres déjà connus comme symbiotes des légumineuses (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*). De plus, quelques isolats de Tunisie appartiennent au genre *Mesorhizobium*. Certaines souches ont particulièrement attiré notre attention. C'est le cas de 7 souches de Tunisie (Cluster II, Fig.2, Article N°2) et de 6 souches du Liban (Cluster III, Fig. 2, Article N°4), identifiées comme *R. galegae*. Il s'agit des souches isolées des genres *Anthyllis*, *Argyrolobium*, *Astragalus*, *Lotus* et *Medicago* (Tunisie) et des genres *Lotus*, *Scorpiurus*, *Biserrula*. *R. galegae* a été à l'origine décrite pour les symbiotes de *G. orientalis* et *G. officinalis* (Lindström, 1989). A l'intérieur de *R. galegae*, deux biovars ont été distingués sur la base de leur efficacité à fixer l'azote sur ces deux plantes : biovar *orientalis* et *officinalis* (Radeva *et al.*, 2001). Parmi les souches méditerranéennes de *R. galegae*, seule ORS 1463 (isolée de *Anthyllis henoniana*) a été trouvée capable de noduler une plante du genre *Galega* (*G. officinalis*), mais les nodules étaient inefficaces. De plus, les essais d'amplification par PCR de régions correspondant à des *nodbox* spécifiques aux deux biovars connus n'ont pas réussi (Voir résultats complémentaires au chapitre III). Cela suggère que ces isolats méditerranéens constituent vraisemblablement d'autres biovars.

D'autre part, le « Cluster III » de l'article N°2 contient les 4 souches STM 383, ORS 1459, ORS 1464 et ORS 1465 présentant des profils ARDRA identiques à 100 %. L'une d'elles, ORS 1465, présente une séquence d'ADNr 16S homologue à 97% de celle de *R. galegae*. Il serait intéressant d'étudier en détail les souches de ce groupe pour préciser leur position taxonomique en utilisant les hybridations ADN/ADN et une caractérisation phénotypique (Galeries API).

Ainsi, nos résultats montrent que *R. galegae* n'est pas restreinte au Caucase et se trouve associée à d'autres genres de légumineuses en région méditerranéenne.

D'autre part, les plantes du genre *Medicago* sont connues d'être associées aux espèces suivantes : *S. meliloti* (Jordan, 1984), *S. medicae* (Rome *et al.*, 1996), *R. mongolense* (Van Berkum *et al.*, 1998) ou plus récemment au genre *Bradyrhizobium* (Yao *et al.*, 2002). En Tunisie, nous les avons trouvées associées à des souches du genre *Sinorhizobium* (Cluster V, Article N°2). Certaines souches (ORS 1434 et STM 382 isolées de *M. sativa* et *M. marina*

respectivement) ont les séquences de l'ADNr 16S homologues à 99 % de celle de *S. meliloti*, ce qui suggère qu'elles représentent une ou deux espèces séparées. Les hybridations ADN/ADN entre ces souches et l'espèce *S. meliloti* sont à prévoir.

Dans l'article N°2, les clusters V, VI et VII regroupent au total 28 souches appartenant au genre *Sinorhizobium*. Nous avons déterminé la séquence de l'ADNr 16S de certaines souches de ces clusters. Ainsi, la souche ORS 1400 est proche de *S. teranga* à 98% et présente des profils ARDRA 16S identiques de ceux de *S. medicae* et non pas de *S. teranga* (Article N°2). Les souches ORS 1407 et ORS 1444 sont proches de *S. meliloti* à 99 %. Ces trois isolats induisent des nodules efficaces sur *A. uniflorum* et il serait intéressant de les étudier aussi en hybridations ADN/ADN. D'autre part, on pourrait séquencer les gènes codant pour l'ARNr 16S des autres souches du genre *Sinorhizobium* dans ces clusters et compléter cette étude par des hybridations ADN/ADN et phénotypie.

Au Liban, la souche STM 1735 isolée de *M. orbicularis*, a été identifiée comme *Bradyrhizobium* sp sur la base de sa séquence partielle de l'ADNr 16S. Ce résultat est à rapprocher de celui de Yao *et al.* (2002).

Le genre *Bradyrhizobium* est très représenté dans les régions tropicales (Lorquin *et al.*, 1993 ; Moreira *et al.*, 1993 ; Vinuesa *et al.*, 1998 ; Doignon-Bourcier *et al.*, 1999 ; 2000 ; Molouba *et al.*, 1999). En Méditerranée, la légumineuse arbustive *Spartium junceum* a été trouvée associée à des souches de ce genre (Quatrini *et al.*, 2002). Ici, on trouve *Bradyrhizobium* pour la première fois associé à des légumineuses herbacées en Méditerranée : *Lotus* et *Medicago*.

Ces associations BNL-légumineuses que nous avons trouvées viennent étayer l'hypothèse que la réputation de la spécificité de certaines associations pourrait être trompeuse.

Au cours de notre travail, nous avons mis en évidence 34 souches de Tunisie appartenant à des genres différents de ceux des BNL classiques. Ces souches appartiennent à 3 phyla différents : Protéobactéries, Actinobactéries et Firmicutes. Ainsi, nous avons identifié des bactéries appartenant ou proches des genres *Bosea*, *Starkeya*, *Phyllobacterium*, *Sphingomonas*, *Inquilinus*, *Ochrobactrum*, *Rhodopseudomonas* (α Protéobactéries), du genre *Pseudomonas* (γ Protéobactéries) ou des genres *Microbacterium*, *Agromyces*, *Mycobacterium*, *Ornithinococcus* (Phylum des Actinobactéries, ordre des Actinomycétales) ou bien des genres *Bacillus* et *Paenibacillus* (Firmicutes). Ces résultats ont attiré notre attention du fait que certaines souches de ces genres (*Phyllobacterium*, *Bacillus*) ont été trouvés dans des nodules (Knösel, 1984 ; Bai *et al.*, 2002), d'autres (*Paenibacillus*) peuvent coloniser la surface des racines (Bent *et al.*, 2002) et certains sont connus comme endophytes (*Sphingomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, cf. Article N°3).

Etant convaincus du mode de l'isolement de ces isolats, nous voulions donc tester leur capacité à induire des nodules. Faute de graines de plantes hôtes, nous les avons testés sur la

légumineuse à large spectre d'hôte *M. atropurpureum*. Ces souches n'ont pas induit de nodules dans nos conditions d'étude.

Parmi ces isolats, nous nous sommes intéressés à certaines souches qui appartiennent au genre *Phyllobacterium* et d'autres qui lui sont phylogénétiquement proches. Ainsi, ORS 1420, STM 370 et STM 391 présentent des séquences d'ADNr homologues à 98 % avec celle de *Phyllobacterium myrsinacearum*. Des hybridations ADN/ADN et une étude phénotypique sont en cours dans le cadre d'une collaboration de notre laboratoire (LSTM) et le laboratoire de l'INRA d'Angers. Les résultats préliminaires laissent penser que ces souches constitueraient plusieurs espèces nouvelles.

D'autres souches ORS 1402, ORS 1403 et ORS 1419 (Ayant des séquences de l'ADNr 16S homologues à 96 % avec la séquence ADNr 16S de *P. myrsinacearum*) forment le « Cluster II » ARDRA (Article N° 3) et constitueraient un nouveau genre. Des hybridations ADN/ADN et une étude phénotypique sont aussi prévues (INRA Angers)

D'autre part, nous avons pu mettre en évidence chez *Microbacterium*, *Starkeya*, *Agromyces*-like et *Phyllobacterium*-like des séquences d'ADN homologues aux séquences *nifH* de *S. meliloti* ou *S. xinjiangense* (voir Tableau 4 de l'article N°3). Ces résultats suggèrent deux choses :

- i) Une activité de fixation d'azote chez les microorganismes étudiés. Effectivement, une activité réductrice de l'acétylène a été mise en évidence chez *Microbacterium* en culture pure (Ruppel, 1989). Aucune activité de fixation d'azote chez les genres *Starkeya*, *Agromyces*-like, *Phyllobacterium*-like n'a jusqu'à présent été mentionnée dans la littérature.
- ii) Le fait que ces séquences de *nifH* soient proches de celles de *S. meliloti* peut suggérer que ces souches ont pu récupérer tout ou partie du plasmide symbiotique de cette BNL. D'autres résultats de PCR et de séquençage (non publiés) que nous avons obtenus en essayant d'amplifier le gène *nodA* chez une souche de *Microbacterium* (ORS 1472) ont révélé une séquence analogue à une séquence *nodA*, proche de celle de *B. japonicum*. Ayant un doute sur la pureté de cette souche, nous avons procédé à des observations microscopiques minutieuses et à une coloration Gram. Tous ces résultats ont montré que la souche en question est pure. Cependant, les essais de ré-amplification de ce gène, même après avoir défini des amorces homologues à la séquence amplifiée, n'ont pas donné de résultats. L'ADN qui nous a servi de matrice provenait d'une digestion d'une suspension bactérienne à la protéinase K. Nous avons remarqué que dans quelques cas (amplification de la région de l'ADNr 16S-IGS), le résultat de la PCR dépendait de la technique d'extraction (Article N°4). Il serait donc judicieux d'essayer de l'ADN de meilleure qualité (méthode de Pitcher, 1989 par exemple) pour refaire des essais d'amplification de *nodA* chez *Microbacterium*.

En conclusion, la technique ARDRA de l'ADNr 16S avec les enzymes choisies nous a permis une bonne séparation des différents genres de BNL. Nous avons mis en évidence une grande

diversité de BNL dans deux pays méditerranéens. Cependant, les hybridations ADN/ADN sont nécessaires pour élucider la diversité spécifique. D'autres investigations sur le terrain enrichiront certainement nos découvertes, mais une collection de graines des plantes étudiées doit être constituée pour effectuer des tests de nodulation.

REFERENCES

- ABAHUSSAIN, A. A., ABDU, A.S., AL ZUBARI, W.K., EL DEEN, N.A. and ABDULRAHEEM, M. 2002. Desertification in the Arab Region: analysis of current status and trends. *J Arid Environ.* **51**(4): 521-545.
- ACHOUAK, W., NORMAND, P. and HEULIN, T. 1999. Comparative phylogeny of *rrs* and *nifH* genes in the Bacillaceae. *Int J Syst Bact.* **49**: 961-967.
- ACOSTA-DURÁN, C. et MARTINEZ-ROMERO, E. 2002. Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. *Arch Microbiol.* **178**(2): 161-164.
- AGIUS, F., SANGUINETTI, C. and MONZA, J. 1997. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium loti* generated by PCR with arbitrary and repetitive sequences. *FEMS Microbiol Ecol.* **24**(1): 87-92.
- AKERROYED, J. 1999. Conserving the Mediterranean flora: a way forward. *Plant Talk.* **18**: 23-28.
- ALAZARD, D. 1985. Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. *Applied and Environmental Microbiology.* **50**(3): 732-734.
- ALAZARD, D. 1989. Nitrogen fixation in pure culture by rhizobia isolated from stem nodules of tropical *Aeschynomene* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **68** (1990): 177 - 182.
- ALLEN, O. N. and ALLEN, E.K. (1981). The leguminosae : a source book of characteristics, uses, and nodulation., The University of Wisconsin Press, Madison, WI.
- ALTSCHUL, S., GISH W., MILLER W., MYERS E. and LIPMAN D. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular Biology.* **215**: 403-410.
- AMANN, R., LUDWIG, W. and SCHLEIFER, K.H. 1988. b-subunit of ATP-synthase : a useful marker for studying the phylogenetic relationship of bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2815-2821.
- AMARGER, N., MACHERET, V. and LAGUERRE, G. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int J Syst Bact.* **47**(4): 996-1006.
- ANDERSON, A. J. and GUERRA, D. (1985). "Responses of bean to root colonization with *Pseudomonas putida* in a hydroponic system." *Phytopathology* **75**(9): 992-995.
- ANDRONOV, E. E., TEREFWORK, Z., ROUMIANTSEVA, M.L., DZUBENKO, N.I., DRESLER-NURMI, A., YOUNG, J.P.W., Simarov, B.V. and Lindström, K. 2003. Symbiotic and Genetic Diversity of *Rhizobium galegae* Isolates Collected from the *Galegae orientalis* Gene Center in the Caucasus. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1067 - 1074.
- ANZAI, Y., KIM, H., PARK, J.Y., WAKABAYASHI, H. and OYAIZU, H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol.* **50**: 1563-1589.
- AOUANI, M. E., MHAMDI, R., JEBARA, M. and AMARGER, N. 2001. Characterization of rhizobia nodulating chickpea in Tunisia. *Agronomie.* **21**(6-7): 577-581.
- AOUANI, M. E., MHAMDI, R., MARS, M., ELAYEB, M. and GHRIR, R. 1997. Potential for inoculation of common bean by effective rhizobia in Tunisian soils. *Agronomie.* **17**(9-10): 445-454.

- AOUANI, M. E., MHAMDI, R., MARS, M., ELAYEB, M. AND GHRIR, R.** 1997. Potential for inoculation of common bean by effective rhizobia in Tunisian soils. *Agronomie*. **17**(9-10): 445-454.
- ASH, C., PRIEST, F.G. and COLLINS, M.D.** 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, farrow, Wallbanks, and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. **64**: 253 - 260.
- BÂ, S., WILLEMS, A., de LAJUDIE, P., ROCHE, P., JEDER, H., QUATRINI, P., NEYRA, M., FERRO, M., PROME, J.C., GILLIS, M., BOIVINMASSON, C. and LORQUIN, J.** 2002. Symbiotic and taxonomic diversity of rhizobia isolated from *Acacia tortilis* subsp *raddiana* in Africa. *Syst Appl Microbiol*. **25**(1): 130-145.
- BAI, Y. M., DAOUST, F., SMITH, D.L. and DRISCOLL, B.T.** 2002. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Can J Microbiol*. **48**(3): 230-238.
- BARANOVA, N. A. and GOGOTOV, I. N.** 1974. Fixation of molecular nitrogen by propionic bacteria (in Russian). *Mikrobiologiya*. **43**: 791 - 794.
- BARRAQUIO, W. L., DUMONT, A. and KNOWLES, R.** (1988). A method for counting free-living aerobic N₂-fixing H₂-oxidizing bacteria. In: Nitrogen Fixation: Hundred Years After. Stuttgart: Gustav Fischer, (H. BOTHE, F. J. DEBRUJN, and W. E. NEWTON, eds.): 790.
- BARRERA, L. L., TRUJILLO, M.E., GOODFELLOW, M., GARCIA, F.J., HERNANDEZLUCAS, I., DAVILA, G., VAN BERKUM, P. and MARTINEZ-ROMERO, E.** 1997. Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. *Int J Syst Bact*. **47**(4): 1086-1091.
- Bartholomew, J. W.** (1981). Stains For Microorganisms in Smears. Section A : The differentiation of microorganisms in smears by the gram stain procedure. Staining procedures. Clark G. Baltimore, MD 21202, U.S.A., Williams and Wilkins: 375.
- BARTL, S. and WEISSMAN, I.L.** 1994. PCR primers containing an inosine triplet to complement a variable codon within a conserved protein-coding region. *BioTechniques*. **16**: 246 - 250.
- BEIJERINCK, M.** 1888. Die Bacterien der papilionaceenknöllchen. *Botanische Zeitung*. **46**: 797-804.
- BENSON, D. R., Silvester, W.B.** 1993. Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiological Reviews*. **57**(2): 293-319.
- BENT, E., BREUIL, C., ENEBAK, S. and CHANWAY, C.P.** 2002. Surface colonization of lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia* [Dougl. Engelm.]) roots by *Pseudomonas fluorescens* and *Paenibacillus polymyxa* under gnotobiotic conditions. *Plant Soil*. **241**(2): 187-196.
- BERINGER, J. E.** 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol*. **84**: 188-198.

- BERTRAND, H. (1997). Stimulation de l'absorption minérale et de la croissance du Colza inoculé avec des bactéries isolées de son rhizoplan. Lyon, Université Claude Bernard Lyon I: 99.
- BERTRAND, H., NALIN, R., BALLY, R. and CLEYET-MAREL, J-C. 2000. Isolation and identification of the most efficient plant growth-promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). *Biol. Fertil. Soils*. **33**: 152 - 156.
- BERTRAND, H., PLASSARD, C., PINOCHET, X., TOURAINE, B., NORMAND, P. and CLEYET-MAREL, J.C. 2000. Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Can. J. Microbiol.* **46**: 229-236.
- BEYER, W., GLOCKNER, P., OTTO, J. and BOEHM, R. 1995. A nested PCR method for the detection of *Bacillus anthracis* in environmental samples collected from former tannery sites. *Microbiological research*. **150**: 179-186.
- BISWAS, J. C., LADHA, J.K., DAZZO, F.B., YANNI, Y.G. and ROLFE, B.G. 2000. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. *Agron J.* **92**(5): 880-886.
- BODDEY, R. M., DE OLIVIERA, O.C., URQUIAGA, S., REIS, V.M., DE OLIVARES, F.L., BALDANI, V.L.D. and DOEBEREINER, J. (1995). "Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement." *Plant and Soil* **174**: 195 - 209.
- BOIVIN, C. and GIRAUD, E. (1999). Molecular symbiotic characterization of rhizobia - Toward a polyphasic approach using Nod factors and nod genes? Highlights of nitrogen fixation research. Martinez and Hernandez, Kluwer: 295-299.
- BOIVIN, C., BARRAN, L.R., MALPICA, C.A. and ROSENBERG, C. 1991. Genetic analysis of a region of the *Rhizobium meliloti* pSym plasmid specifying catabolism of trigonelline, a secondary metabolite presente in legumes. *Journal of Bacteriology*. **173**(9): 2809-2817.
- BOIVIN, C., NDOYE, I., MOLOUBA, F., DE LAJUDIE, P., DUPUY, N. and DREYFUS, B. 1997. Stem nodulation in legumes: diversity, mechanisms, and unusual characteristics. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **16**(1): 1-30.
- BOUKEF, M. K. 1986. Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne. *ACCT Paris, Médecine traditionnelle et Pharmacopée*. 350 p.
- BOULOS, L. (1983). Medicinal plants of North Africa., Ref. Publ. Inc. Michigan "Medicinal Plants of the worlds". **3**. 286 p.
- BRAND, J. D., TANG, C.T. and GRAHAM, R.D. 2000. The effects of nutrient supply, predominantly addition of iron, and rhizobial inoculation on the tolerance of *Lupinus pilosus* genotypes to a calcareous soil. *Plant Soil*. **224**(2): 207-215.
- BRAND, J. D., TANG, C.T. and RATHJEN, A.J. 1999. Adaptation of *Lupinus angustifolius* L. and *L. pilosus* Murr. to calcareous soils. *Aust. J. Agr. Res.* **50**: 1027 - 1034.
- BRENNER, D. J., FANNING, G.R., RAKE, A.V. and JOHNSON, K.E. 1969. Batch procedure for thermal elution of DNA from hydrocyapatite. *Analytical Biochemistry*. **28**: 447-459.

- BROMFIELD, E. S. P., BARRAN, L.R. and WHEATCROFT, R.** 1995. Relative genetic structure of a population of *Rhizobium meliloti* isolated directly from soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) and sweet clover (*Melilotus alba*). *Molecular ecology*. **4**: 183-188.
- BROMFIELD, E. S. P., BUTLER, G. and BARRAN, L.R.** 2001. Temporal effects on the composition of a population of *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus alba*. *Can J Microbiol*. **47**(6): 567-573.
- BROUGHTON, W. J.** (1983). Legumes. Nitrogen fixation, Oxford University Press. **3**: 339.
- BROUGHTON, W. J., Wong, C.H., Lewin, A., Samrey, U., Myint, H., Dowling, D.N. and Simon, R.** 1986. Identification of *Rhizobium* plasmid sequences involved in recognition of *Phosphocarpus*, *Vigna* and other legumes. *J. Cell. Biol.* **102**: 1173 - 1182.
- BUTLER, J. H. A.** 1988. Growth and N₂ fixation by field grown *Medicago littoralis* in response to added nitrate and competition from *Lolium multiflorum*. *Soil Biol Biochem.* **20**: 863 - 868.
- CABALLERO-MELLADO, J., LOPEZREYES, L. and Bustilloscristales, R.** 1999. Presence of 16 S rRNA genes in multiple replicons in *Azospirillum brasilense*. *Fems Microbiol Lett.* **178** (2): 283-288.
- CACCIARI, I., GIOVANNOZI-SERMANNI, G., GRAPELLI, A. and LIPPI, D.** 1971. Nitrogen fixation by Arthrobacter species. *Ann. Microbiol. Enzimol.* **21**: 97 - 105.
- CAETANO-ANOLLES, G., BASSAM, B.J. and GRESSHOFF, P.M.** 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology.* **9**: 553-557.
- CANDRIAN, U., FURRER, B., HOFELEIN, C. and LUTHY, J.** 1991. Use of inosine-containing oligonucleotide primers for enzymatic amplification of different alleles of the gene coding for heat-stable toxin type I of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 955 - 961.
- CARLOTTI, A. and FUNKE, G.** 1994. Rapid distinction of *Brevibacterium* species by restriction analysis of rDNA generated by polymerase chain reaction. *Syst Appl Microbiol.* **17**: 380 - 386.
- CARLSON, R. W., SANJUAN, J., BHAT, U.R., GLUSHKA, J., SPAINK, H.P., WIJFJES, A.H.M., VANBRUSSEL, A.A.N., STOKKERMANS, T.J.W., PETERS, N.K. and STACEY, G.** 1993. The structures and biological activities of the lipo-oligosaccharide nodulation signals produced by type I and II strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *The Journal of biological Chemistry.* **268**(24): 18372-18381.
- CASIDA, L. E., Jr.** (1982). "*Ensifer adhaerens*" gen. nov., sp. nov. : a bacterial predator of bacteria in soil." *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**: 339 - 345.
- CATO, E. P., HASH, D. E. HOLDEMAN, L. V. and MOORE, W. E. C.** 1982. Electrophoretic study of *Costridium* species. *J. Clin. Microbiol.* **15**: 688 - 702.
- CHARENTREUIL, C., GIRAUD, E., PRIN, Y., LORQUIN, J., BA, A., GILLIS, M., de LAJUDIE, P. and DREYFUS, B.** 2000. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the african wild rice *Oryza breviligulata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(12): 5437-5447.

- CHATTERTON, B. and CHATTERTON, L. 1984. Alleviating land degradation and increasing cereal and livestock production in North Africa and the Middle East using annual *Medicago* pasture. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. **11**: 117 - 129.
- CHEN, W. X., LI, G.S., QI, Y.L., WANG, E.T., YUAN, H.L. and LI, J.L. 1991. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int J Syst Bact*. **41**(2): 275-280.
- CHEN, W. X., LI, G.S., QI, Y.L., WANG, E.T., YUAN, H.L. and LI, J.L. 1991. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int J Syst Bact*. **41**(2): 275-280.
- CHEN, W. X., TAN, Z.Y., GAO, J.L., LI, Y. and WANG, E.T. 1997. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. *Int J Syst Bact*. **47**(3): 870-873.
- CHEN, W. X., YAN, G.H. and LI, J.L. 1988. Numerical taxonomic study of fast growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Internationla Journal of Systematic Bacteriology*. **38**(4): 392-397.
- CHEN, W., WANG, E., WANG, S., LI, Y., CHEN, X. and LI, Y. 1995. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov. a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, people's republic of china. *Int J Syst Bact*. **45**(1): 153-159.
- CHEN, W.M., LAEVENS S., LEE T.M., COENYE T., DE VOS P., MERGEAY M., and VANDAMME P., 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int J Syst Evol Microbiol*. **51**:1729-35.
- CLAY, K. 2001. Symbiosis and the regulation of communities. *Amer Zool*. **41**(4): 810-824.
- CLAYTON, R. A., SUTTON, G., HINKLE JR., P.S., BULT, C. and FIELDS, C. 1995. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in Genbank : why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol*. **45**: 595-599.
- COENYE, T. and VANDAMME, P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol*. **5**(9): 719-29.
- COENYE, T., GORIS, J., SPILKER, T., VANDAMME, P. and LIPUMA, J. J. 2002. Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. *J Clin Microbiol*. **40**(6): 2062-9.
- COLWELL, R. R. 1970. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J. Bacteriol*. **104**: 410-433.
- COOPER, J. E., Wood, M. and Bjourson, A.J. 1985. Nodulation of *Lotus pedunculatus* in acid rooting solution by fast-and slow-growing rhizobia. *Soil Biol Biochem*. **17**: 487-492.
- CORICH, V., GIACOMINI, A., CARLOT, M., SIMON, R., TICHY, H.V., SQUARTINI, A. and NUTI, M.P. 2001. Comparative strain typing of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae natural populations. *Can J Microbiol*. **47**(6): 580-584.

- CORICH, V., GIACOMINI, A., OLLERO, F. J., SQUARTINI, A. and NUTI, M.P. 1991. Pulse-Field electrophoresis in contour-clamped homogenous electric fields (CHEF) for the fingerprinting of *Rhizobium* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* **83**: 193 - 198.
- COUSINEAU, B., CERPA, C., LEFEBVRE, J. and CEDERGREN, R. 1992. The sequence of the gene encoding elongation factor Tu from *Chlamydia trachomatis* compared with those of other organisms. *Gene.* **120**: 33-41.
- CROSA, J. H., BRENNER, D. J. and FALKOW, S. 1973. Use of a single-strand specific nuclease for analysis of bacterial and plasmid deoxyribonucleic acid homo- and heteroduplexes. *J. Bacteriol.* **115**: 904-911.
- CROW, V. L., JARVIS, B.D.W. and GREENWOOD, R.M. 1981. Deoxyribonucleic acid homologies among acid producing strains of *Rhizobium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**(2): 152-172.
- CRUZ-SANCHEZ, J. M., VELAZQUEZ, E., MATEOS, P. F. and MARTINEZ-MOLINA, E. 1997. Enhancement of resolution of low molecular weight RNA profiles by staircase electrophoresis. *Electrophoresis.* **18**: 1909 - 1911.
- DAS, S. K., MISHRA, A. K., TINDALL, B. J., RAINEY, F. A. and STACKEBRANDT, E. 1996. Oxidation of thiosulfate by a new bacterium, *Bosea thiooxidans* (strain BI-42) gen. nov., sp. nov.: analysis of phylogeny based on chemotaxonomy and 16S ribosomal DNA sequencing. *Int J Syst Bacteriol.* **46**(4): 981-7.
- DATE, R. A. (1982). Collection, Isolation, characterization and conservation of *Rhizobium*, In : Nitrogen fixation in legumes (J. M. Vincent, ed.), Academic Press Publishers: pp. 95 - 109.
- DAVIS, P. H. 1970. The Flora of Turkey and East Aegean Islands, Volume 3. (ed. P.H. Davis). Edinburgh University Press: Edinburgh.
- DAVIS, S., Heywood, V.H. and Hamilton, A.C. 1995. Centres of plant diversity: a guide and strategy for their conservation. Volume 1. Europe, Africa, South West Asia and the Middle East. WWF and IUCN, Gland.
- DAZZO, F. B., JOSEPH, A.R., GOMAA, A.B., YANNI, Y.G. and ROBERTSON, G.P. 2003. Quantitative indices for the autecological biogeography of a *Rhizobium* endophyte of rice at macro and micro spatial scales. *Symbiosis.* **35**(1-3): 147-158.
- DE BRUIJN, F. J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology.* **58**(7): 2180-2187.
- DE FARIA, S. M., Lewis, G.P., Sprent, J.I. and Sutherland, J.M. 1989. Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytol.* **111**: 607-619.
- de Lajudie, P., Bâ, S., N'diay, A., Lorquin., J., Neyra, M., Willems, A, Detrez, C, Jeder, H., Prome, J.-C., Dreyfus, B., Gillis, M. and BOIVIN, C. Diversité taxonomique et propriétés symbiotiques de rhizobia nodulant *A tortilis subsp raddiana* au Nord et au Sud du Sahara. In *Acacia tortilis subsp raddiana*. Edited by M. Grouzis and E. Le Floch. IRD Publ. In press.

- de LAJUDIE, P., LAURENTFULELE, E., WILLEMS, A., TORCK, U., COOPMAN, R., COLLINS, M.D., KERSTERS, K., DREYFUS, B. and GILLIS, M. 1998b. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int J Syst Bact.* **48**: 1277-1290.
- de LAJUDIE, P., WILLEMS, A., NICK, G., MOHAMED, S.H., TORCK, U., COOPMAN, R., FILALI-MATLOUF, A., KERSTERS, K., DREYFUS, B., LINDSTROM, K. and GILLIS, M. 1999. *Agrobacterium* bv. 1 strains isolated from nodules of tropical legumes. *System. Appl. Microbiol.* **22**: 119-132.
- de LAJUDIE, P., WILLEMS, A., NICK, G., MOHAMED, S.H., TORCK, U., COOPMAN, R., FILALI-MATLOUF, A., KERSTERS, K., DREYFUS, B., LINDSTRÖM, K. and GILLIS, M. 1999. *Agrobacterium* bv. 1 strains isolated from nodules of tropical legumes. *System. Appl. Microbiol.* **22**: 119-132.
- de LAJUDIE, P., WILLEMS, A., NICK, G., MOREIRA, F., MOLOUBA, F., HOSTE, B., TORCK, U., NEYRA, M., COLLINS, M.T., K. LINDSTROM, DREYFUS, B. and GILLIS, M. 1998a. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int J Syst Bact.* **48**: 369-382.
- de LAJUDIE, P., WILLEMS, A., NICK, G., MOREIRA, F., MOLOUBA, F., HOSTE, B., TORCK, U., NEYRA, M., COLLINS, M.T., K. LINDSTRÖM, DREYFUS, B. and GILLIS, M. 1998b. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int J Syst Bact.* **48**: 369-382.
- de LAJUDIE, P., WILLEMS, A., POT, B., DEWETTINCK, D., MAESTROJUAN, G., NEYRA, M., COLLINS, M.T., B. DREYFUS, KERSTERS, K. and GILLIS, M. 1994. Polyphasic taxonomy of Rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov. *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int J Syst Bact.* **44**(4): 715-733.
- DE LEY, J., CATTOIR, H. and REYNAERTS, A. 1970. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* **12**: 133-142.
- DEL POZO, A., OVALLE, C., ARONSON, J. and AVENDANO, J. 2002. Ecotypic differentiation in *Medicago polymorpha* L. along an environmental gradient in central Chile. II. Winter growth as related to phenology and temperature regime. *Plant Ecol.* **160**(1): 53-59.
- DEMEZAS, D. H., REARDON, T.B., STRAIN, S.R., WATSON, J.M. and GIBSON, A.H. 1995. Diversity and genetic structure of a natural population of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii isolated from *Trifolium subterraneum* L. *Molecular Ecology.* **4**: 209-220.
- DEREIX, C., OHANNESSIAN-CHARPIN, A., KHOUZAMI, M., SAFI, S., ZREIK, R., EL-HANNA, C., HANNA, K., ASSAF, N., EL-RIACHY, R., HABR, A. et MUNZER, M-H. 1999. Le Vade-Mecum. Du gestionnaire de forêts et d'espaces naturels au Liban. Comment établir un Plan de Gestion Durable. Ministère de l'Agriculture du Liban
- DESPOIS, J. (1955). La Tunisie orientale - Sahel et basse Steppe. PUF. Paris.: 554 p.
- DING, J., SUN, H., SU, F., XU, Q., HUANG, Y. and LING, P. 1981. Studies on nitrogen fixation by actinomycetes. *Acta Microbiol. Sin.* **21**: 424 - 427.

- DOIGNON-BOURCIER, F., SY, A., WILLEMS, A., TORCK, U., DREYFUS, B., GILLIS, M. and de LAJUDIE, P. 1999. Diversity of bradyrhizobia from 27 tropical Leguminosae species native of senegal. *System. Appl. Microbiol.* **22**: 647-661.
- DOIGNON-BOURCIER, F., WILLEMS, A., COOPMAN, R., LAGUERRE, G., GILLIS, M., and de LAJUDIE, P. 2000. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating small senegales legumes by 16S-23S rRNA intergenic gene spacers and amplified fragment length polymorphism fingerprint analyses. *Appl Environ Microbiol.* **66**(9): 3987-3997.
- DOMERGUE, O., MAURE, L. and CLEYET-MAREL, J-C. 2001. Symbioses fixatrices d'azote et réhabilitation de milieux dégradés en zone méditerranéenne française. 3^{ème} colloque *Rhizosphère - Dijon, 26, 27 et 28 novembre 2001*.
- DOMMERGUES, Y. R., and BOSCO, M. (1998). The contribution of N₂ fixing trees to soil productivity and rehabilitation in tropical, subtropical and mediterranean regions. Microbial interactions in agriculture and forestry. SubbaRao N. S. and Dommergues Y. R., Oxford & IBH Publishing: 65-96.
- DOMMERGUES, Y., DUHOUX, E., and DIEM, H.G. (1999). Les arbres fixateurs d'azote : caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Editions espaces 34 (CIRAD, FAO, IRD). 499 p.
- DOMMERGUES, Y., DUHOUX, E., and DIEM, H.G. 1988. * Les arbres fixateurs d'azote en foresterie et agroforesterie tropicales. *Bull. Soc. Bot. Fr.* **135**(3): 49-64.
- DON, R. H., COX, P.T., WAINWRIGHT, B.J., BAKER, K. and MATTICK, J.S. 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research.* **19**(14): 4008.
- DREYFUS, B., GARCIA, J.L. and GILLIS, M. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int J Syst Bact.* **38**(1): 89-98.
- DROUIN, P., PREVOST, D. and ANTOUN, H. 1996. Clasification of bacteria nodulating *Lathyrus japonicus* and *Lathyrus pratensis* in northern Quebec as strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. *Int J Syst Bact.* **46**(4): 1016-1024.
- DUPUY, N., WILLEMS, A., POT, B., DEWETTINCK, D., VANDENBRUAENE, I., MAESTROJUAN, G., DREYFUS, B., KERSTERS, K., COLLINS, M.D and GILLIS, M. 1994. Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**(3): 461-473.
- EAGLESHAM, A. R. J., ELLIS, J. M., EVANS, W. R., FLEISCHMAN, D. E., HUNGRIA, M. and HARDY, R. W. F. (1990). The first photosynthetic N₂-fixing *Rhizobium* : characteristics. Nitrogen Fixation Achievements and Objectives. Gresshof P. M., Roth, L. E., Stacey, G. and Newton, W. L. eds. New York, Chapman and Hall.
- EARDLY, B. D., MATERON, L.A., SMITH, N.H., JOHNSON, D.A., RUMBAUGH, M.D. and SELANDER, R.K. 1990. Genetic structure of natural populations of the nitrogen fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol.* **56**(1): 187-194.

- EL FANTROUSSI, S., MAHILLON, J., NAVEAU, H. and AGATHOS, S. N. 1997. Introduction of anaerobic dechlorinating bacteria into soil slurry microcosms and nested PCR monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 806 - 811.
- ELBELTAGY, A., NISHIOKA, K., SUZUKI, H., SATO, T., SATO, Y.I., MORISAKI, H., MITSUI, H. and MINAMISAWA, K. 2000. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Sci Plant Nutr.* **46**(3): 617-629.
- ELMERICH, C. 1993. Fixation biologique de l'azote. *Annales de l'Institut Pasteur.* **4**(2): 133-153.
- ELVIRA-RECUENCO M. and VAN VUURDE, J.W.L. 2000. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Can J Microbiol.* **46**(11): 1036-1041.
- EMBERGER, L. 1938. LA DEFINITION PHYTOGEOGRAPHIQUE DU CLIMAT DESERTIQUE. *MEM. SOC. BIOGEOGR.* **6**: 9 - 14.
- EMBERGER, L. 1939. APERÇU GENERAL SUR LA VEGETATION DU MAROC. *VERÖFF. GEOBOT. INST. RÜBEL IN ZURICH.* **14**(40 - 157).
- ESTRADA DE LOSSANTOS, P., BUSTILLOCRISTALES, R. and Caballero-mellado, J. 2001. Burkholderia, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl Environ Microbiol.* **67**(6): 2790-2798.
- ESTRADA, P., MAVINGUI, P., COURNOYER, B., FONTAINE, F., BALANDREAU, J. and CABALLERO-MELLADO, J. 2002. A N-2-fixing endophytic *Burkholderia* sp associated with maize plants cultivated in Mexico. *Can J Microbiol.* **48**(4): 285-294.
- EZAKI, T., HASHIMOTO, Y. and YABUUCHI, E. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 224-229.
- FAO 1997. The States of the World's Forests. **97**. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/docrep/W4345E/W4345E00.htm>.
- FAO 1999. The States of the World's Forests. **99**. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FLORES, M., GONZALEZ, V., BROM, S., MARTINEZ, E., PINERO, D., ROMERO, D., DAVILA, G. and PALACIOS, R. 1987. Reiterated DNA sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. *J Bacteriol.* **169**(12): 5782-8.
- FLORET, C. and PONTANIER, R. (1982). L'aridité en Tunisie présaharienne. Climat, sol, végétation et aménagement. Paris, Editions de l'office de la recherche scientifique et technique outre - mer (ORSTOM)
- FOX, G. E., PECHMAN, K.J. and WOESE, C.R 1977. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid : molecular approach to prokaryotic systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27**: 44-57.

- FOX, G. E., WISOTZKEY, J.D. and JURTSCHUK, P. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**(1): 166-170.
- FRANCK, B. 1889. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. Deut. Bot. Ges.* **7**: 332-346.
- FRANCO, A. A. and S. M. DE FARIA 1997. The contribution of N₂ fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biol. Biochem.* **29**: 897-903.
- FRED, E. B., BALDWIN, I. L. and MCCOY, E. (1932). Root nodule bacteria and leguminous plants., Univ. Wisconsin, Madison, WI, USA.
- GALIBERT, F., FINAN, T.M., LONG, S.R., PUHLER, A., ABOLA, P., AMPE, F., BARLOYHUBLER, 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., HERNANDEZLUCAS, I., HONG, A., HUIZAR, L., HYMAN, R.W., JONES, T., KAHN, D., KAHN, M.L., KALMAN, S., KEATING, D.H., KISS, E., KOMP, C., LALAURE, V., MASUY, D., PALM, C., PECK, M.C. AND T. M. POHL, PORTETELLE, D., PURNELLE, B., RAMSPERGER, U., SURZYCKI, R., THEBAULT, P. *et al.* 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*. **293**(5530): 668-672.
- GAO, J. L., SUN, J.G., LI, Y., WANG, E.T. and CHEN, W.X. 1994. Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from hainan province, china. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**(1): 151-158.
- GAUNT, M. W., TURNER, S.L., RIGOTTIERGOIS, L., LLOYDMACGILP, S.A. and YOUNG, J.P.W. 2001. Phylogenies of atpD and recA support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**: 2037-2048.
- GIGOVA, L., PETROVA, N., MIHAYLOVA, O. and DREVON, J.J. 1997. Characterization of rhizobia isolated from sainfoin (*Onobrychis sativa*). *Microbios.* **90**(364-65): 137-150.
- GILLIS, M., KERSTERS, K., HOSTE B., JANSSENS D., KROPPESTEDT R.M., STEPHAN M.P., TEIXEIRA K.R.S., DÖBEREINER J. and DE LEY, J. 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov. a nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 361-364.
- GILLIS, M., VAN, T.V., BARDIN, R., GOOR, M., HEBBAR, P., WILLEMS, A., SEGERS, P., KERSTERS, K., HEULIN, T. and FERNANDEZ M.P. 1995. Polyphasic taxonomy in the genus Burkholderia leading to an emended description of the genus and proposition of Burkholderia vietnamiensis sp. nov. for N₂ fixing isolates from rice in vietnam. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**(2): 274-289.
- GILSON, E., CLEMENT J.M., BRUTLAG, D. and HOFNUNG, D. 1984. A family of interspersed extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. *EMBO J.* **3**: 1417 - 1421.
- GLEDHILL, W. E. and CASIDA, L. E., Jr 1969. Predominant catalase-negative soil bacteria. III. *Agromyces*, gen. n, microorganisms intermediary to *Actinomyces* and *Nocardia*. *Appl. Microbiol.* **18**: 340 - 349.

- GOLDMAN, A., BOIVIN, C., FLEURY, V., MESSAGE, B., LECOEUR, L., MAILLE, M. and TEPFER, D.** 1991. Betaïne use by rhizosphere bacteria : Genes essential for trigonelline, stachydrine, and carnitine metabolism in *Rhizobium meliloti* are located on pSym in the symbiotic region. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**: 571-578.
- GOOSSENS, H., GIESENDORF, B.A.J., VANDAMME, P., VLAES, L., VAN DEN BOOR, C., KOEKEN, A., QUINT, W.G.V., BLOMME, W., HANICQ, P., KOSTER, D.S., HOFSTRA, H., BUTZLER, J.-P. and VAN DER PLAS, J.** 1995. Investigation of an outbreak of *campylobacter upsaliensis* in day care centers in Brussels: analysis of relationships among isolates by phenotypic and genotypic typing methods . *J. Infect. Dis.* **172**: 1298-1305.
- GORDILLO, M. E., SINGH, K.V., BAKER, C.J. and MURRAY, B.E.** 1993. Typing of group B streptococci : comparison of pulsed-field gel electrophoresis and conventional electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1430-1434.
- GORIS, J., SUZUKI, K.I., DE VOS, P., NAKASE, T. and KERSTERS, K.** 1998. Evaluation of a microplate DNA - DNA hybridization method compared with the initial renaturation method. *Can. J. Microbiol.* **44**: 1148-1153.
- GRAHAM, P. H., SADOWSKY, M.J., KEYSER, H.H., BARNET, Y.M., BRADLEY, R.S., COOPER, J.E, DELEY, D.J., JARVIS, B.D.W., ROSLYCKY, E.B., STRIJDOM, B.W. and YOUNG, J.P.W.** 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root and stem nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**(4): 582-587.
- GRAHAM, P. H., SADOWSKY, M.J., TIGHE, S.W., THOMPSON, J.A., DATE, R.A., HOWIESON, J.G. and THOMAS, R.** 1995. Differences among strains of *Bradyrhizobium* in fatty acid methyl ester analysis. *Can. J. Microbiol.* **41**: 1038-1042.
- GRIMONT, F. and GRIMONT, P.A.D.** 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Insti. Pasteur.* **137**: 165-175.
- GRIMONT, P. A. D., POPOFF, M.Y., GRIMONT, F., COYNAULT, C. and LEMELIN, M.** 1980. Reproducibility and correlation study of three deoxyribonucleic acid hybridization procedures. *Current Microbiology.* **4**: 325-330.
- GROTH, I., SCHUMANN, P., MARTIN, K., SCHUETZE, B., AUGSTEN, K., KRAMER, I. and STACKEBRANDT, E.** 1999. *Ornithinococcus hortensis* gen. nov., sp. nov., a soil actinomycete which contains L-ornithine. *Int J Syst Bacteriol.* **49 Pt 4**: 1717-24.
- GRUNDMANN, H., SCHNEIDER, C., HARTUNG, D., DASCHNER, F. D. and PITT, T. L.** 1995. Discriminatory power of three DNA - based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 528 - 534.
- GURTLER, V., WILSON, V.A. and MAYALL, B.C.** 1991. Classification of medically important clostridia using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rDNA. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2673-3679.
- GUTIERREZ-ZAMORA, M. L. and MARTINEZ-ROMERO, E.** 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *J Biotechnol.* **91**(2-3): 117-126.
- GYANESHWAR, P., JAMES, E.K., MATHAN, N., REDDY, P.M., REINHOLDHUREK, B. and LADHA, J.K.** 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol.* **183**(8): 2634-2645.

- HALSE, N. J. (1993). Australian attempts to introduce the Ley Farming System to West Asia and North Africa. *In* : Introducing Ley Farming to the Mediterranean basin. Proceedings of an International Workshop. Christiansen S., Materon L., Falcinelli, M., Cocks, P. (Eds). Perugia, Italy: 1 - 14.
- HALVERSON, L. J. and HANDELSMAN, J. 1991. Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW 85 in the field and in a growth chamber. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(9): 2767-2770.
- HAMILL, R. J., HOUSTON, E. D., GEORGHIOU, P. R., WRIGHT, C. E., KOZA, M. A., CADLE, R. M., GOEPFERT, P. A., LEWIS, D. A., ZENON, G. J. and CLARRIDGE, J. E. 1995. An outbreak of *Burkholderia* (formerly *Pseudomonas*) cepacia respiratory tract colonization and infection associated with nebulized albuterol therapy. *Ann. Intern. Med.* **122**: 762 - 766.
- HAMZE, M., ABI ANTOUN, M., EL-HAJJ, S. et HAMADEH, S. 2003. Les habitats de l'agriculture et des animaux domestiques. Site du ministère de l'Agriculture Libanaise.
- HAUKKA, K., LINDSTRÖM, K. and YOUNG, P.W. 1996. Diversity of partial 16S rRNA sequences among and within strains of African rhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis*. *System. Appl. Microbiol.* **19**: 352-359.
- HELY, F. W. and OFER, I. 1972. Nodulation and frequencies of wild leguminous species in the northern Negev region of Israel. *Aust. J. Agr. Res.* **23**: 267 - 284.
- HERNANDEZ-LUCAS, I., SEGOVIA, L., MARTINEZ-ROMERO, E. and PUEPPKE, S.G. 1995. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Applied and Environmental Microbiology.* **61**(7): 2775-2779.
- HEYNDRICKX, M., VAUTERIN, L., VANDAMME, P., KERSTERS, K. and DEVOS, P. 1996. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *Journal of Microbiological Methods.* **26**: 247-259.
- HIRSCH, P. 1991. The Genus *Blastobacter*. *In* : *The Prokaryotes*. second edition. Edited by A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K-H., Schleifer. Vol. III: 2171 - 2175.
- HIRSCH, P. and MÜLLER, M. 1985. *Blastobacter aggregatus* sp. nov., *Blastobacter capsulatus* sp. nov., and *Blastobacter denitrificans* sp. nov., new budding bacteria from fresh water habitats. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**: 281-286.
- HÖFLE, M. G. 1988. Identification of bacteria by low molecular weight RNA profiles : a new chemotaxonomic approach. *J. Microbiol. Methods.* **8**: 235 - 248.
- HOLLIS, A. B., KLOOS, W.E. and ELKAN, G.H. 1981. DNA:DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related rhizobiaceae. *Journal of General Microbiology.* **123**: 215-222.
- HOLMES, B., POPOFF, M., KIREDJIAN, M. and KERSTERS, K. 1988. *Ochrobactrum anthropi* gen. nov. sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. *Int J Syst Bact.* **38**(4): 406-416.
- HOOD, D. W., DOW, C.S. and GREEN, P.N. 1987. DNA:DNA hybridization studies on the pink pigmented facultative methylotrophs. *J.Gen. Microbiol.* **133**: 709 - 720.

- HUGENHOLTZ, P., STACKEBRANDT, E., and FUERST, J.A. 1994. A phylogenetic analysis of the genus *Blastobacter* with a view to its future reclassification. *System. Appl. Microbiol.* **17**: 51-57.
- HULTON, C. S. J., HIGGINS, C. F. and SHARP, M. 1991. ERIC sequences : a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* **5**: 825 - 834.
- HYNES, M. F. and O'CONNELL, M.P. 1990. Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Can. J. Microbiol.* **36**: 864-869.
- JAFFRE, T., MC COY, S., RIGAULT, F. and DAGOSTINI, G. (1995). Quelle méthode de végétalisation pour la réhabilitation des anciens sites miniers de Nouvelle Calédonie. *Ecologie des milieux sur roches ultramafiques et sur sols métallifères*, Nouméa.
- JAFTHA, J. B., STRIJDOM, B.W. and STEYN, P.L. 2002. Characterization of pigmented methylotrophic bacteria which nodulate *Lotononis bainesii*. *Syst Appl Microbiol.* **25**(3): 440-449.
- JAHNKE, K. D.,. 1994. A modified method of quantitative colorometric DNA-DNA hybridization on membrane filters for bacterial identification. *J. Microbiol. Methods.* **20**: 273-7288.
- JARABO-LORENZO, A., VELAZQUEZ, E., PEREZGALDONA, R., VEGAHERNANDEZ, M.C., MARTINEZMOLINA, E., MATEOS, P.F., VINUESA, P., MARTINEZROMERO, E. and Leonbarrios, M. 2000. Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA and low molecular weight RNA profiling of rhizobial isolates from shrubby legumes endemic to the Canary islands. *Syst Appl Microbiol.* **23**(3): 418-425.
- JARVIS, B. D. and TIGHE, S.W. 1994. Rapid identification of *Rhizobium* species based on cellular fatty acid analysis. *Plant and Soil.* **161**: 31-41.
- JARVIS, B. D. W., DOWNER, H.L. and YOUNG, J.P.W. 1992. Phylogeny of fast growing soybean nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment of *Rhizobium fredii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**(1): 93-96.
- JARVIS, B. D. W., GILLIS, M. and 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 Bact.* **36**(2): 129-138.
- JARVIS, B. D. W., MACLEAN, T.S., ROBINSON, I.G.C. and FANNING, G.R. 1977. phenic similarity and DNA base sequence homology of root nodule bacteria from New Zealand native legumes and *Rhizobium* strains from agricultural plants. *N.Z.J. Agric. Res.* **20**: 235-248.
- JARVIS, B. D. W., PANKHURST, C.E. and PATEL, J.J. 1982. *Rhizobium loti* a new species of legume root nodule bacteria. *Int J Syst Bact.* **32**(3): 378-380
- JARVIS, B. D. W., SIVAKUMARAN, S., TIGHE, S.W. and GILLIS, M. 1996. Identification of *Agrobacterium* and *Rhizobium* species based on cellular fatty acid composition. *Plant and Soil.* **184**: 143-158.

- JARVIS, B. D. W., VANBERKUM, P., CHEN, W.X., NOUR, S.M., FERNANDEZ, M.P., CLEYET-MAREL, J.C. and GILLIS, M. 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**(3): 895-898.
- JAYARO, B. M., DORE, J.J.E., BAUMBACH, JR, G.A., MATTHEWS, K.R. and OLIVE, S.P. 1991. Differentiation of streptococcus uberis from streptococcus parauberis by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2774-2778.
- JEBARA, M., MHAMDI, R., AOUANI, M.E., GHRIR, R. AND MARS, M. 2001. Genetic diversity of *Sinorhizobium* populations recovered from different *Medicago* varieties cultivated in Tunisian soils. *Can J Microbiol.* **47**(2): 139-147.
- JEDER, H., DELAJUDIE, P., DREYFUS, B., LEFLOCH'S, E., BEHAEGHE, T., ZAAFOURI, M.S. and AKRIMI, N. 1996. Nodulation des légumineuses pastorales. Etude de la nodulation des légumineuses pastorales autochtones des régions arides de Tunisie. **9** (1196): 3 - 10.
- JHA, P. K., NAIR, S., GOPINATHAN, M. C. AND BABU, C. R. 1995. Suitability of rhizobia-inoculated wild legumes *Argyrolobium flaccidum*, *Astragalus graveolens*, *Indigofera gangetica* and *Lespedeza stenocarpa* in providing a vegetational cover in an unreclaimed lime stone quarry. *Plant and Soil.* **177**: 139 - 149.
- JOHNSON, J. L. (1984). Bacterial classification III. Nucleic acids in Bacterial Classification. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg N. R., Holt, J.G. **1**.
- JONES, D. and KRIEG, N.R. (1984). Serology and chemotaxonomy. Bergey's manual of systematic bacteriology. Krieg N. R. a. H., J. G (ed). Baltimore, The Williams and wilkins Co. **1**: 15-18.
- JORDAN, D. C. (1984). Family III. Rhizobiaceae Conn. 1938, 321^{AL}. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg N. R. a. H., J.C. Baltimore, Williams and Wilkins Co. **1**: 234-236.
- JORDAN, D. C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* b Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov. a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants. *Int J Syst Bact.* **32**(1): 136-139.
- JOURAND, P., GIRAUD, E., BENA, G., SY, A., WILLEMS, A., GILLIS, M., DREYFUS, B. and de LAJUDIE, P. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule forming and nitrogen fixing bacteria.
- JUDD, A. K., SCHNEIDER, M., SADOWSKY, M.J. and DE BRUIJN, F.J. 1993. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. *Applied and Environmental Microbiology.* **59**(6): 1702-1708.
- KELLY, D. P., MCDONALD, I. R. and WOOD, A. P. 2000. Proposal for the reclassification of *Thiobacillus novellus* as *Starkeya novella* gen. nov., comb. nov., in the alpha-subclass of the Proteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol.* **50 Pt 5**: 1797-802.

- KERSTERS, K.** (1985). Numerical methods in the classification of bacteria by electrophoresis of their proteins, Computer-assisted bacterial systematic. London, Academic press.
- KERSTERS, K., DELEY, J., SNEATH, P.H.A., and SACKIN, M.** 1973. Numerical taxonomic analysis of *Agrobacterium*. *J gen Microbiol.* **78**: 227 - 239.
- KERSTERS, K., LUDWIG, W., VANCANNEYT, M., DEVOS, P., GILLIS, M. and SCHLEIFER, K.H.** 1996. Recent changes in the classification of the pseudomonads: an overview. *Syst Appl Microbiol.* **19**: 465 - 477.
- KHBAYA, B., NEYRA, M., NORMAND, P., ZERHARI, K. and FILALI-MALTOUF, A.** 1998. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia that nodulate *Acacia* spp. in Marocco assessed by analysis of rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(12): 4912-4917.
- KLUGBAUER, N., LUDWIG, W., BAUERLEIN, E. and SCHLEIFER, K.H** 1992. Subunit b of adenosine triphosphate synthase of *Pectinatus frisingensis* and *Lactobacillus casei*. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**: 323-330.
- KNAPP, R. and JURTSCHUK, P.** 1988. Characterization of free-living nitrogen-fixing *Streptomyces* species and factors which affect their rates of acetylene reduction. *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.* **88**(219).
- KNÖSEL, D.** (1984). The genus *Phyllobacterium*. In: N. R. Krieg and J. G. Holt(ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 1. Williams & Wilkins, Baltimore.: 254 - 256.
- KOBAYASHI, D. Y. and PALUMBO, J.D.** (2000). Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In : C. W. Bacon and J. F. White (ed.), Microbial endophytes. Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y.: p. 199 - 223.
- KOSTMAN, J. R., EDLIND, T.D., LIPUMA, J.L. and STULL, T.L.** 1992. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2084-2087.
- KRIEG, N. R. and HOLT, J. G., Ed.** (1984). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore, Williams and Wilkins.
- KÜNDIG, C., BECK, C., HENNECKE, H. and GÖTTTFERT** 1995. A single rRNA gene region in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **177**: 5151-5154.
- KUYKENDALL, L. D., SAXENA, B., DEVINE, T.E. and 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.
- LA SCOLA, B., MALLET, M.-N., GRIMONT, P.A.D. and RAOULT, D.** 2003. *Bosea eneeae* sp. nov., *Bosea massiliensis* sp. nov. and *Bosea vestrisii* sp. nov., isolated from hospital water supplies, and emendation of the genus *Bosea* (Das et al. 1996). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**(1): 15-20.
- LADHA, J. K. and SO, R.B.** 1994. Numerical taxonomy of photosynthetic Rhizobia nodulating *Aeschynomene* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 62-73.

- LADHA, J.K and REDDY, P.M., 2000. Steps toward nitrogen fixation in rice. In : Ladha, J.K., Reddy, P.M. (Eds.), *The Quest for Nitrogen Fixation in Rice*. International Rice Research Institute, Manila, pp. 33 – 46.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- LAGUERRE, G., ALLARD, M.R., REVOY, F. AND AMARGER, N. 1994. Rapid identification of Rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR amplified 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol.* **60**(1): 56-63.
- LAGUERRE, G., BARDIN, M. and AMARGER, N. 1993. Isolation from soil of symbiotic and nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum* by DNA hybridization. *Canadian Journal of Microbiology*. **39**(12): 1142-1149.
- LAGUERRE, G., NOUR, S.M., MACHERET, V., SANJUAN, J., DROUIN, P. and AMARGER, N. 2001. Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among Phaseolus vulgaris symbionts. *Microbiology Uk*. **147**: 981-993.
- LAGUERRE, G., VAN BERKUM, P., AMARGER, N. and PREVOST, D. 1997. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. *Appl Environ Microbiol.* **63**(12): 4748-4758.
- LAMBERT, B., JOOS, H., DIERICKX, S., VANTOMME, R., SWINGS, J., KERSTERS, K. and VANMONTAGU, M. 1990. Identification and plant interaction of a *Phyllobacterium* sp., a predominant rhizobacterium of young sugar beet plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(4): 1093-1102.
- LARCHER, M., MULLER, B., MANTELIN, S., RAPIOR, S. and CLEYET-MAREL, J.-C. 2003. Early modifications of Brassica napus root system architecture induced by a plant growth-promoting Phyllobacterium strain. *New Phytol.* **160**: 119 - 125.
- LAWRENCE, J. G., DYKHUIZEN, D.E., DUBOSE, R.F. and HARTL, D.L. 1989. Phylogenetic analysis using insertion sequence fingerprinting in Escherichia coli. *Molecular Biology and Evolution*. **6**: 1 - 14.
- LE FLOC'H, E. 1983. Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. *Publications Scientifiques Tunisiennes. Programme Flore et Végétation Tunisiennes. Imprimerie officielle de la République Tunisienne.*: 402 p.
- LE FLOC'H, E. and GROSSMANN, A. 1998. Les légumineuses spontanées de la flore tunisienne. Répartition, intérêts et rôles. *Revue de l'INAT. Numéro spécial 1998. Centenaire de l'INAT (Séminaire "ressources naturelles")*: 359 - 385.
- LE HOUEROU, H. N. (1959). Recherches écologiques et floristiques sur la végétation de la Tunisie Méridionale. *Inst. de Rech. Sah. Alger. Mémoire. h. s.*: 510 p.
- LE HOUEROU, H. N. (1969). La végétation de la Tunisie steppique (avec référence aux végétations analogues d'Algérie, de Lybie et du Maroc). *Ann. Inst. Nat. Rech. Agron. Tunisie.* **42**: 624 p. et une carte couleur 1 / 500 000.
- LE HOUEROU, H. N. 1959. Ecologie, phytosociologie et productivité de l'olivier en Tunisie méridionale. *Bull. du serv. carte phytogéo. Tome IV (fasc. I)*: 7 - 71.

- LE HOUEROU, H. N. 1989. Classification écoclimatique des zones arides (s. l.) de l'Afrique du Nord. *Ecologia Mediterranea*. **15**(3/4): 95 - 144.
- LEMORDANT, D., BOUKEF, M. K. and BEN SALEM, M. 1977. Plantes utiles et toxiques de Tunisie. *Fitoterapia*. **48** (5): 191 - 214.
- LEWIN, A., ROSENBERG, C., MEYER, Z. A. H., WONG, C. H., NELSON, L., MANEN, J.F., STANLEY, J., DOWNING, D. N., DENARIE, J. and BROUGHTON, W. J. 1987. Multiple host-specificity loci of the broad host-range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. *Plant. Mol. Biol.* **8**: 447 - 459.
- LIEBECQ, C. (ed). (1992). International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry and Molecular Biology biochemical nomenclature and related documents. 2nd ed. Portland Press, London, United kingdom.
- LINDSTRÖM, K. 1989. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int J Syst Bact.* **39**(3): 365-367.
- LODEWYCKX, C., VANGRONVELD, J., PORTEOUS, F., MOORE, E.R.B., TAGHAVI, S., MEZGEAY, M. and VANDERLELIE, D. 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit Rev Plant Sci.* **21**(6): 583-606.
- LOI, A., HOWIESON, J.G., COCKS, P.S. and CARR, S.J. 1999. Genetic variation in populations of two Mediterranean annual pasture legumes (*Biserrula pelecinus* L. and *Ornithopus compressus* L.) and associated rhizobia. *Aust J Agr Res.* **50**(3): 303-313.
- LORQUIN, J., MOLOUBA, F. and DREYFUS B.L. 1997. Identification of the carotenoid pigment canthaxanthin from photosynthetic *Bradyrhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology.* **63**(3): 1151-1154.
- LORQUIN, J., MOLOUBA, F., DUPUY, N., NDIAYE, S., ALAZARD, D., GILLIS, M. and DREYFUS, B. (1993). Diversity of photosynthetic *Bradyrhizobium* strains from stem nodules of *Aeschynomene* species. New horizons in nitrogen fixation. Palacios R. e. a., Kluwer: 683-689.
- LORTET, G., MEAR, N., LORQUIN, J., DREYFUS, B., DE LAJUDIE, P., ROSENBERG, C. and BOIVIN, C. 1996. 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*. *Mol Plant Microbe Interaction.* **9**(8): 736-747.
- LUDWIG, W., WEIZENEGGER, M., BETZL, D., LEIDEL, E., LENZ, T., LUDVIGSEN, A., MÖLLENHOFF, D., WENZIG, P., and SCHLEIFER, K. H. 1990. Complete nucleotide sequences of seven eubacterial genes coding for the elongation factor TU : fonctional, structural and phylogenetic evaluations. *Arch. Microbiol.* **153**: 241-247.
- LUNGE, V. R., IKUTA, N., FONSECA A.S.K., HIRIGOYEN, D., STOLL, M., BONATTO, S. AND OZAKI, L.S. 1994. Identification and inter-relationship analysis of *Bradyrhizobium japonicum* strains by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD). *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* **10**: 678-652.
- LUPSKI, J. R., WEINSTOCK, G.E. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. bacteriol.* **174**: 4525-4529.

- MAÂTALLAH, J., BERRAHO, E., SANJUAN, J. and LLUCH, C. 2002. Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie*. 22(3): 321-329.
- MAHILLON, J. and CHANDLER, M. 1998. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62(3): 725-74.
- MARMUR, J. 1961. A procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms. *Journal of Molecular Biology*. 3: 208-218.
- MARTIN, B., HUMBERT, O., CAMARA, M., GUENZI, E., WALKER, J., MITCHELL, T., ANDREW, P., PRUDHOMME, M., ALLOING, G. and HAKENBECK, R. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res*. 20: 3479 - 3483.
- MARTINEZ - ROMERO, E. 1994. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant and Soil*. 161: 11 - 20.
- MARTINEZ-ROMERO, E. and ROSENBLUETH, M. 1990. Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(8): 2384-2388.
- MARTINEZ-ROMERO, E., and CABALLEROMELLADO, J. 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit Rev Plant Sci*. 15(2): 113-140.
- MARTINEZ-ROMERO, E., CABALLERO-MELLADO, J., GANDARA, B., ROGEL, M.A., LOPEZ MERINO, A., WANG, E. T., FUENTES-RAMIREZ, L.E., MARTINEZ, L., HERNANDEZ-LUCAS, I. and MARTINEZ-ROMERO, J. (1999). Ecological, phylogenetic and taxonomic remarks on diazotrophs and related genera. Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity., Parana, Brazil, Kluwer Academic.
- MARTINEZ-ROMERO, E., SEGOVIA, L., MARTINS MERCANTE, F., FRANCO, A.A., GRAHAM, P. and PARDO, M.A. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 41: 417-426.
- MASLOW, J. N., MULLIGAN, M.E. and ARBEIT, R.D. 1993. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin. Infect. Dis*. 17: 153-164.
- MATERON, L. A. 1991. Symbiotic characteristics of *Rhizobium meliloti* in west asian soils. *Soil Biol. Biochem*. 23(5): 429-434.
- MAXTED, N. and BENNETT, S.J. (2001a). Conservation, diversity and use of Mediterranean legumes. *Plant Genetic Resources Of Legumes in the Mediterranean*. Maxted N. and Bennett S. J. PO Box 17, 3300 AA Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publ. 39: 1-32.
- MAXTED, N. and BENNETT, S.J. (2001b). Legume diversity in the Mediterranean region. *Plant Genetic Resources Of Legumes in the Mediterranean*. Maxted N. and Bennett S. J. PO Box 17, 3300 AA Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publ. 39: 51-75.
- MC CLELLAND, M., PETERSEN, C. and WELSH, J. 1992. Length polymorphism in tRNA intergenis spacers detected by using the polymerase chain reaction can distinguish streptococcal strains and species. *J. Clin. Microbiol*. 30: 1499-1504.

- MERGAERT, J., CNOCKAERT, M. C. and SWINGS, J. 2002. *Phyllobacterium myrsinacearum* (subjective synonym *Phyllobacterium rubiacearum*) emend. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**(Pt 5): 1821-3.
- MHAMDI, R., LAGUERRE, G., AOUANI, M.E., MARS, M. and AMARGER, N. 2002. Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. *Fems Microbiol Ecol.* **41**(1): 77-84.
- MINAMISAWA, K. 1989. Comparison of extracellular polysaccharide composition, ribotoxine production, and hydrogenase phenotype of strains of *Bradyrhizonium japonicum*. *Plant cell Physiol.* **30**: 877-884.
- MOHAMED, S. H., SMOUNI, A., NEYRA, M., KHARCHAF, D. and FILALI-MALTOUF, A. 2000. Phenotypic characteristics of root-nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. grown in Libya. *Plant and Soil.* **224**: 171 - 183.
- MOLOUBA, F., LORQUIN, J., WILLEMS, A., HOSTE, B., GIRAUD, E., DREYFUS, B., GILLIS, M., DELAJUDIE, P. and MASSON-BOIVIN, C. 1999. Photosynthetic bradyrhizobia from *Aeschynomene* spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. *Applied and Environmental Microbiology.* **65**(7): 3084-3094.
- MOREIRA, F. M. S., GILLIS, M., POT, B., KERSTERS, K. and FRANCO, A.A. 1993. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *System. Appl. Microbiol.* **16**: 135-146.
- MOULIN L., 2002. Etude moléculaire de la diversité symbiotique des rhizobia : de l'analyse du gène *nod A* à l'identification de rhizobia au sein des bêta-protéobactéries. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard-LyonI.289p.
- MOULIN L., MUNIVE A., DREYFUS B. and BOIVIN-MASSON C., 2001. Nodulation of legumes by members of the β subclass of Proteobacteria. *Nature* **411** : 948-950
- MOUTERDE, S. J. 1970. Nouvelle Flore du Liban et de la Syrie. *Ed. Dar El Machreq.* Beyrouth. Tome 2.
- MOZO, T., CABRERA, E. and RUIZ-ARGUESO, T. 1988. Diversity of plasmid profiles and conservation of symbiotic nitrogen fixation genes in newly isolated *Rhizobium* strains nodulating sulla (*Hedysarum coronarium* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(5): 1262-1267.
- MURPHY, P. M. and MASTERSON, C.L. 1970. Determination of multiple forms of esterases in *Rhizobium* by paper electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* **61**: 121-129.
- MURRAY, R. G. E., BRENNER, D.J., COLWELL, R.R., DE VOS, P., GOODFELLOW, M., GRIMONT, P.A.D., PFENNIG, N., STACKEBRANDT, E. and ZAVARZIN, G.A. 1990. Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the *Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**: 213-215.
- NAKAGAWA, Y., SAKANI, T. and YOKOTA, A. 1996. Transfer of "*Pseudomonas riboflavina*" (Foster 1944), a gram negative, motile rod with long-chain 3-hydroxy fatty acids, to *Devosia riboflavina* gen. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 16-22.

- NDIAYE, A. A. (1996). Diversité et fixation d'azote des *rhizobiums* d'Acacia. Dakar, Diplôme d'Etudes Approfondies. Université Cheikh Anta Diop.: 43.
- NEWTON, W. E. 1998. Nitrogénases : fonction et évolution. Bull. Soc. Fr. Microbiol. 13(3): 238-241.
- NICK, G. 1998. Polyphasic taxonomy of Rhizobia isolated from Tropical Tree Legumes. Thesis. University of Helsinki. Finland.
- NICK, G. and LINDSTROM, K. 1994. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomic DNA of *Rhizobium galegae* strains and to identify the DNA obtained by sonicating the liquid cultures and root nodules. *System. Appl. Microbiol.* 17: 265-273.
- NICK, G., de LAJUDIE, P., EARDLY, B.D., SUOMALAINEN, S., PAULIN, L., ZHANG, X., GILLIS, M. and K. LINDSTRÖM 1999. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov. isolated from leguminous trees in sudan and kenya. *Int J Syst Bact.* 49: 1359-1368.
- NIEMANN, S., DAMMANN-KALINOWSKI, T., NAGEL, A., PUHLER, A. and SELBITSCHKA, W. 1999. Genetic basis of enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR fingerprint pattern in *Sinorhizobium meliloti* and identification of *S. meliloti* employing PCR primers derived from an ERIC-PCR fragment. *Arch. Microbiol.* 172: 22-30.
- NIEMANN, S., PUHLER, A., TICHY, H.V., SIMON, R. and SELBITSCHKA, W. 1997. Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. *J Appl Microbiol.* 82(4): 477-484.
- NISHI, C. Y. M., BODDEY, L.H., VARGAS, M.A.T. and HUNGRIA, M. 1996. Morphological, physiological and genetic characterization of two new *Bradyrhizobium* strains recently recommended as Brazilian commercial inoculants for soybean. *Symbiosis.* 20: 147-162.
- NORMAND, P., COURNOYER, B., SIMONET, P. and NAZARET, S. 1992. Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*. *Gene.* 111: 119-124.
- NOUR, S. M., CLEYET-MAREL, J.C., NORMAND, P. and FERNANDEZ, M.P. 1995. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *Int J Syst Bact.* 45 (4): 640-648.
- NOUR, S. M., FERNANDEZ, M.P., NORMAND, P. AND CLEYET-MAREL, J.C. 1994. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Int J Syst Bact.* 44 (3): 511-522.
- NUNTAGIJ, A., ABE, M., UCHIUMI, T., SEKI, Y., BOONKERD, N. and HIGASHI, S. 1997. Characterization of *Bradyrhizobium* strains isolated from soybean cultivation in Thailand. *J Gen Appl Microbiol Tokyo.* 43(3): 183-187.
- OLSEN, G. J., WOESE, C.R. and OVERBEEK, R. 1994. The winds of (evolutionary) changes: Breathing new life into Microbiology. *J. Bacteriol.* 176: 1-6.

- Osteras, M., Stanley, J. and Finan, T. M. 1995. Identification of *Rhizobium*-specific intergenic mosaic elements within an essential two-component regulatory system of *Rhizobium* species. *J Bacteriol.* **177**(19): 5485-94.
- OUATTARA, A. S., ESSOKAZI, A.A., THIERRY, S., CAYOL, J-L., LABAT, M., MONROY, O. and MACARIE, H. 2003. *Bosea minatitlanensis* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from anaerobic digester sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**(Pt 5): 1247-51.
- PALLERONI, N. J. (1984). Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, N.R. Krieg and J.G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins. I: 141 - 199.
- PANKHURST, C. E. and D. R. BIGGS 1980. Sensitivity of *Rhizobium* to selected isoflavonoids. *Can. J. Microbiol.* **26**: 542-545.
- PATRIARCA, E. J., TATE, R. and IACCARINO, M. 2002. Key Role of Bacterial NH₄(+)-Metabolism in *Rhizobium*-Plant Symbiosis. *Microbiol Mol Biol Rev.* **66**(2): 203-22.
- Patt, T. E., Cole, G. E. and Hanson, R. S. 1976. *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**: 226-229.
- PEOPLES, M. B. and CRASWELL, E.T. 1992. Biological nitrogen fixation: investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant and Soil.* **141**: 13-39.
- PEOPLES, M. B., LADHA, J.K. and HERRIDGE, D.F. 1995. Enhancing legume N₂ fixation through plant and soil management. *Plant and Soil.* **174**: 83 - 101.
- PERRET, X., PARSONS, J., VIPREY, V., REICHWALD, K. and BROUGHTON, W.J. 2001. Repeated sequences of *Rhizobium* sp NGR234 and *Sinorhizobium meliloti* genomes - A comparative analysis using random sequencing. *Can J Microbiol.* **47**(6): 548-558.
- PETERSON, P. L., GREENWOOD, R.M., BELLING, G.B. and BATHHURST, N.O. 1971. The electrophoretic movement of soluble proteins and the production of unusual amino acids in *Rhizobium* isolates as taxonomic criteria. *Plant Soil.* **1971 (Spec. Vol.)**: 111-114.
- PINERO, D., MARTINEZ, E. and SELANDER, R.K. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Applied and Environmental Microbiology.* **54**(11): 2825-2832.
- PITCHER, D. G., N. A. SAUNDERS and R. J. OWEN 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology.* **8**: 151-156.
- POLHILL, R. M. and RAVEN P., P.H. 1981. Advances in legume systematics. *Royal Botanical Gardens, Kew.*
- POLHILL, R. M., RAVEN, P.H. and STIRTON, C.H. (1981). Evolution and Systematic of Leguminosae. In: Advances in Legume Systematics (Eds. R.M. Polhill and P.P Royal Botanic Gardens: Kew.
- PONSONNET, C. and X. NESME 1994. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. *Arch. Microbiol.* **161**: 300-309.
- POT, B., GILLIS, M., HOSTE, B., VAN DE VELDE, A., BEKAERT, F., KERSTERS, K. AND DE LEY, J. 1989. Intra- and intergeneric relationships of the genus *Oceanospirillum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 23 - 34.

- POT, B., VANDAMME, P. and KERSTERS, K. (1994). Analysis of electrophoretic whole organism protein fingerprints, In : Modern Microbial Methods. Chemical Methods in Prokaryotic Systematics (M. GOODFELLOW, A. G. O'DONNELL, eds), Chichester, England, John Wiley & Sons: pp.493 - 521.
- PRIEFER, U. B., AURAG, J., BOESTEN, B., BOUHMOUCH, I., DEFEZ, R., FILALIMALTOUF, A., MIKLIS, M., MOAWAD, H., MOUHSINE, B., PRELL, J., SCHLUTER, A. AND SENATORE, B. 2001. Characterisation of *Phaseolus* symbionts isolated from Mediterranean soils and analysis of genetic factors related to pH tolerance. *J Biotechnol.* **91**(2-3): 223-236.
- Provorov, N. A. 1998. Coevolution of rhizobia with legumes: Facts and hypotheses. *Symbiosis.* **24** (3): 337-368.
- QUATRINI P., SCAGLIONE G., CARDINALE M., CARADONNA F. and PUGLIA A.M., 2002. *Bradyrhizobium* sp. Nodulating the Mediterranean shrub Spanish broom (*Spartium junceum* L.). *Journal of Applied Microbiology.* **92** :13-21
- RACHIE, O. K. (1979). Tropical legumes : ressources for the future., National Academy of Sciences. Washington, D.C.
- RADEVA, G., JURGENS, G., NIEMI, M., NICK, G., SUOMINEN, L. and LINDSTROM, K. 2001. Description of two biovars in the *Rhizobium galegae* species: biovar orientalis and biovar officinalis. *Syst Appl Microbiol.* **24**(2): 192-205.
- RAINEY, F. A. and WIEGEL, J. 1996. 16S ribosomal DNA sequence analysis confirms the close relationship between the genera *Xanthobacter*, *Azorhizobium*, and *Aquabacter* and reveals a lack of phylogenetic coherence among *Xanthobacter* species. *Int J Syst Bact.* **46**(2): 607-610.
- RALPH, D., MCCLELLAND, M., WELSH, J., BARANTON, G. and PEROLAT, P. 1993. *Leptospira* species categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and by mapped restriction polymorphisms in PCR amplified rRNA genes. *Journal of Bacteriology.* **175**(4): 973-981.
- RANJARD, L., BROTHIER, E. and NAZARET, S. 2000. Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints for characterization and microscale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(12): 5334-5339.
- RAO, V. R. (1973). "Non-symbiotic nitrogen fixation in paddy fields." Doctoral thesis, Academy of Sciences U.S.S.R. Moscow (in : Soil microorganisms and plant growth. Subba Rao.1977. Published by Mohan Pramlani, Oxford & IBH Publishing Co. New delhi).
- REINHOLD-HUREK, B., HUREK, T., GILLIS, M., HOSTE, B., VANCANNEYT, M., KERSTERS, K. and DELEY, J. 1993. *Azoarcus*, gen. nov., nitrogen-fixing Proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* **43**: 574 - 584.
- REQUENA, N., JIMENEZ, I., TORO, M. and BAREA, J.M. 1997. Interactions between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium*

- spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in mediterranean semi-arid ecosystems. *New Phytol.* 136(4): 667-677.
- REQUENA, N., PEREZSOLIS, E., AZCONAGUILAR, C., JEFFRIES, P. and BAREA, J.M. 2001. Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Appl Environ Microbiol.* 67(2): 495-498.
- RIGGS, P. J., CHELIUS, M.K., INIGUEZ, A.L., KAEPLER, S.M. and TRIPLETT, E.W. 2001. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Aust J Plant Physiol.* 28(9): 829-836.
- RINAUDO, G., ORENGA, S., FERNANDEZ, M.P., MEUGNIER, H. and BARDIN, R. 1991. DNA homologies among members of the genus *Azorhizobium* and other stem and root nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41(1): 114-120.
- RIVAS, R., VELAZQUEZ, E., WILLEMS, A., VIZCAINO, N., SUBBARAO, N.S., MATEOS, P.F., GILLIS, M., DAZZO, F.B. and MARTINEZMOLINA, E. 2002. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. *Appl Environ Microbiol.* 68(11): 5217-5222.
- RIVAS, R., WILLEMS, A., SUBBA-RAO, N.S., MATEOS, P.F., DAZZO, F.B., KROPPESTEDT, R.M., MARTINEZ-MOLINA, E., GILLIS, M. and VELÁZQUEZ E. 2003. Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes Nitrogen in Symbiosis with *Neptunia natans*, an Aquatic Legume from India. *Syst Appl Microbiol.* 26: 47 - 53.
- ROBERTS, G. P., LEPS, W.T., SILVER, L.E. and BRILL, W.J. 1980. Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 414-422.
- ROBLES, A. B., ALLEGRETTI, L.I. and PASSERA, C.B. 2002. *Coronilla juncea* is both a nutritive fodder shrub and useful in the rehabilitation of abandoned Mediterranean marginal farmland. *J Arid Environ.* 50(3): 381-392.
- ROME, S., FERNANDEZ, M.P., BRUNEL, B., NORMAND, P. AND CLEYETMAREL, J.C. 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int J of Syst Bact.* 46(4): 972-980.
- ROSSELLO'-MORA, R. and AMANN, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *Fems Microbiol Rev.* 25(1): 39-67.
- RUPPEL, S. (1989). Interrelationships between Microorganisms and Plants in Soil. Proceedings of an International Symposium, Liblice, Czechoslovakia, Prague.
- SAEKI, Y., AKAGI, I., TAKAKI, H. and NAGATOMO, Y. 2000. Diversity of indigenous *Bradyrhizobium* strains isolated from three different Rj-soybean cultivars in terms of randomly amplified polymorphic DNA and intrinsic antibiotic resistance. *Soil Sci Plant Nutr.* 46(4): 917-926.
- SAITOH, S., SUZUKI, T. and NISHIMURA, Y. 1998. Proposal of *Craurococcus roseus* gen. nov., sp. nov. and *Paracraurococcus ruber* gen. nov., sp. nov., novel aerobic bacteriochlorophyll a-containing bacteria from soil. *Int J Syst Bacteriol.* 48 Pt 3: 1043-7.

- SAITOU, N. and NEI, M. 1987. The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**(4): 406-425.
- SALEENA, L. M., LOGANATHAN, P., RANGARAJAN, S. and NAIR, S. 2001. Genetic diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from *Arachis hypogaea*. *Can J Microbiol.* **47**(2): 118-122.
- SAMBROOK, J. and D. W. RUSSEL (2001). Molecular cloning, a laboratory manual, 3rd ed. New York, Cold Spring Harbor.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. and MANIATIS, T. (1989). Molecular Cloning. A laboratory manual . 2nd edition. Gold Spring Harbor Laboratory Press. Appendix E3.
- SANCHEZ-DIAZ, M. 2001. Adaptation of Legumes to multiple stresses in the Mediterranean-type environments *In* : Quality in lucerne and medics for animal production CIHEAM-IAMZ. Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens ; n. 45. Delgado I. (ed.), Lloveras, J. (ed.) Zaragoza and Lleida (Spain), 275 p.
- SANJUAN, J., CARLSON, R.W., SPAINK, H.P., BHAT, U.R., BARBOUR, W.M., GLUSHKA, J. and STACEY, G. 1992. A 2-O-methylfucose moiety is present in the lipooligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 8789-8793.
- SAWADA, H., IEKI, H., OYAIZU, H. and 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**(4): 694-702.
- SAXENA, M. C. (1990). Status of chickpea in the Mediterranean basin. Options Méditerranéennes - Séries Séminaires. N°9: 17 - 24.
- SCHLEIFER, K. H. and KANDLER, O 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacterio. Rev.* **36**: 407-477.
- SCHLEIFER, K. H. and W. LUDWIG (1989). Phylogenetic relationships of bacteria . The hierarchy of life. Fernholm B., Bremar, K., and Jörnvall, H. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V: 103-117.
- SCHNEIDER, M. and DEBRUIJN, F.J. 1996. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. *World J Microbiol Biotechnol.* **12**(2): 163-174.
- SCHOLLA, M. H. and Elkan, G.H. 1984. *Rhizobium fredii* sp. nov. a fast growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**: 484-486.
- SEGOVIA, L., PINERO, D., PALACIOS, R. and MARTINEZ - ROMERO, E. 1991. Genetic structure of soil population of nonsymbiotic *Rhizobium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 426 - 433.
- SEGOVIA, L., YOUNG, P.W. and MARTINEZ-ROMERO, E. 1993. Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int J Syst Bact.* **43**(2): 374-377.
- SELANDER, R. K., CAUGANT, D.A., OCHMAN, H., MUSSER, J.M., GILMOUR, M.N. and WHITTAM, T.S. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial

- population genetics and systematics. *Applied and Environmental Microbiology*. **51**(5): 873-884.
- SELENSKA-POBELL, S.** 1995. Strain specific fingerprints of *Rhizobium galegae* generated by PCR with arbitrary and repetitive primers. *Journal of Applied bacteriology*. **79**: 425-431.
- SHARPLES, G. J., Lloyd.** 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6503 - 6508.
- SIKORA, S., REDZEPOVIC, S. and BRADIC, M.** 2002. Genomic fingerprinting of *Bradyrhizobium japonicum* isolates by RAPD and rep-PCR. *Microbiol Res.* **157**(3): 213-219.
- SIKORA, S., REDZEPOVIC, S., PEJIC, I. and KOZUMPLIK, V.** 1997. Genetic diversity of *Bradyrhizobium japonicum* field population revealed by RAPD fingerprinting. *J Appl Microbiol.* **82**(4): 527-531.
- Site du ministère de l'Agriculture Libanaise** <http://www.agriculture.gov.lb/bernaintro.html>
- Site internet de Genbank** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>
- Site internet de la base de données des Légumineuses :** <http://www.ildis.org/LegumeWeb>
- SKERMAN, V. B. D., MCGOWAN, V. and SNEATH, P.H.A.** (1989). Approved Lists of Bacterial names. *American Society for Microbiology*. Washington, D C.
- SNEATH, P.** (1984). Numerical taxonomy. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. (ed.) N. R. K. a. J. G. H., The Williams & Wilkins Co., Baltimore. **1**: 111 - 118.
- SNEATH, P. H. A., ed** (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore.
- SO, R. B., LADHA, J.K. and YOUNG, J.P.W.** 1994. Photosynthetic symbionts of *Aeschynomene* spp. form a cluster with bradyrhizobia on the basis of fatty acid and rRNA analyses. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**(3): 392-403.
- SOMASEGARAN, P. and HOBEN, H.J.** 1994. Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-*Rhizobium* Technology. Springer Laboratory. Paia, Hawaii, USA. 450 p.
- SPAINK, H. P., AARTS, A., STACEY, G., BLOEMBERG, G.V., LUGTENBERG, B.J.J. and KENNEDY, E.P.** 1992. Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* nod metabolites using thin layer chromatography. *MPMI.* **5**(1): 72-80.
- SPRENT, J.** (1993). Evolution since Knoxville: were nitrogen-fixing organisms wise to inhabit land plants? New horizons in nitrogen fixation. Palacios R., Mora J. and Newton W. E. Dordrecht, Kluwer.
- SPRENT, J. and RAVEN, P.H.** (1992). Evolution of nitrogen-fixing symbiosis. Biological nitrogen fixation, London, Chapman and Hall.
- SQUARTINI, A., STRUFFI, P., DORING, H., SELENSKAPOBEL, S., TOLA, E., GIACOMINI, A., VENDRAMIN, E., VELÁZQUEZ, E., MATEOS, P.F., MARTINEZ-MOLINA, E., DAZZO, F.B., CASELLA, S. and NUTI, M.P.** 2002. *Rhizobium sullae* sp nov (Formerly '*Rhizobium hedysari*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**: 1267-1276.
- SRINIVASAN, M., PETERSEN, D.J. and HOLL, F.B.** 1997. Nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* is enhanced by the presence of *Bacillus*. *Can J Microbiol.* **43**(1): 1-8.

- STACKEBRANDT, E. and GOEBEL, B.M. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **44**(4): 846-849.
- STACKEBRANDT, E. and LIESACK, W. (1993). Nucleic acids and classification. Handbook of new bacterial systematics. O'Donnell M. G. a. A. G. London, Academic Press Ltd: 151-194.
- STACKEBRANDT, E., MURRAY, R.G.E. and TRÜPER, H.G. 1988. *Porteobacteria* classis Nov., a name for the phylogenetic taxon that includes "the purple bacteria and their relatives". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 321-325.
- STARKEY, R. L. 1935. Isolation of some bacteria which oxidize thiosulfate. *Soil Science*. **39**: 197 - 219.
- STERN, M. J., AMES, G. F. L., SMITH, N. H., ROBINSON, E. C. and HIGGINS, C. F. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences : a major component of the bacterial genome. *Cell*. **37**: 1015 - 1026.
- STOLTZFUS, J. R., SO, R., MALARVITHI, P.P., LADHA, J.K. and DEBRUIJN, F.J. 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant Soil*. **194**(1-2): 25-36.
- SULLIVAN, J. T., EARDLY, B.D., VAN BERKUM, P. and RONSON, C.W. 1996. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl Environ Microbiol.* **62**(8): 2818-2825.
- SUZUKI, K., GOODFELLOW, M. and O'Donnell, A.G. (1993). Cell Envelopes and Classification. London, 195-250, Goodfellow M., and O'Donnell A.G. (eds.).
- SY, A., GIRAUD, E., JOURAND, P., GARCIA, N., WILLEMS, A., de LAJUDIE, P., PRIN, Y., NEYRA, M., GILLIS, M., BOIVIN-MASSON, C. and DREYFUS, B., 2001. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *Journal of bacteriology*. **183** : 214-220.
- TAGHAVI, M., HAYWARD, C., SLY, L. I. and FEGAN, M. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol.* **46**(1): 10-5.
- TAKEUCHI, M. and HATANO, K. 1998. Union of the genera *Microbacterium* Orla-Jensen and *Aureobacterium* Collins et al., in a redefined genus *Microbacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 739 - 747.
- TAN, Z. Y., KAN, F.L., PENG, G.X., WANG, E.T., REINHOLD-HUREK, B. and CHEN, W.X. 2001. *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in china. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **51**: 909-914.
- TATUM, H. W., EWING, W. H. and WEAVER, R. E. (1974). Miscellaneous Gram-negative bacteria. In: E.H. Lennette, E.H. Spaulding and J.P. Truant (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 2nd ed. American society for Microbiology, Washington, D. C.: 270 - 294.
- TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., MICKELSEN, P. A., MURRAY, B. E., PERSING, D. H. and SWAMINATHAN, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA

restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis : criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2233 - 2239.

TEREFEWOR, Z., KAIJALAINEN, S. and LINDSTROM, K. 2001. AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*. *J Biotechnol.* **91**(2-3): 169-180.

TEREFEWOR, Z., NICK, G., SUOMALAINEN, S., PAULIN, L. and LINDSTRÖM, K. 1998. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. *Int J Syst Bact.* **48**: 349-356.

TIMMUSK, S. and WAGNER, E.G.H. 1999. The plant growth promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *MPMI.* **12**(11): 951-959.

TOLEDO, I., LLORET, L. and MARTINEZ-ROMERO 2003. *Sinorhizobium americanum* sp. nov., a New *Sinorhizobium* species Nodulating Native *Acacia* spp. in Mexico. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**: 54 - 64.

TORSVIK, V., GOKSOYR, J. and DAAE, F.L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(3): 782-787.

TRÜPER, H. G. and DECLARI, L. 1997. Taxonomic note : necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) in "apposition". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 908 - 909.

TSIEN, H. C., DREYFUS, B. L. and SCHMIDT, E. L. 1983. Initial stages in the morphogenesis of nitrogen-fixing stem nodules of *Sesbania rostrata*. *J Bacteriol.* **156**(2): 888-97.

UEDA, T., SUGA, Y., YAHIRO, N. and MATSUGUCHI, T. 1995. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *J. Bacteriol.* **177**: 1414 - 1417.

ULLMANN, J. S. and MCCARTHY, B.J 1973. The relationship between mismatched base pairs and the thermal stability of the DNA duplexes. *Biochim. Biophys. Acta.* **294**: 416-424.

VAN BERKUM, P. and EARDLY, B.D. 2002. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl Environ Microbiol.* **68**(3): 1132-1136.

VAN BERKUM, P., BEYENE, D., BAO, G.P., CAMPBELL, T.A. and EARDLY, B.D. 1998. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *Int J Syst Bact.* **48**(1): 13-22.

VAN BERKUM, P., FUHRMANN, J. J. and EARDLY, B. D. (2000). A critical examination of 16S rRNA gene sequence divergence for the reconstruction of bacterial evolutionary histories : the Rhizobiaceae. 17th North American Conference on symbiotic nitrogen Fixation, Université Laval, Quebec, Canada.

VAN BERKUM, P., TEREFEWOR, Z., PAULIN, L., SUOMALAINEN, S., LINDSTRÖM, K. and EARDLY, B. 2003. Discordant Pylogenies within the *rrn* Loci of Rhizobia. *J. Bacteriol.* **185**(10): 2988-2998.

- VANBERKUM, P. and EARDLY, B.D. (1998). Molecular evolutionary systematics of the *Rhizobiaceae*. The *Rhizobiaceae*. Spaink H. P., Kondorosi A. and Hooykaas P. J. J. Dordrecht, Kluwer academics.
- VANBERKUM, P. and EARDLY, B.D. 2002. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl Environ Microbiol.* **68**(3): 1132-1136.
- VANDAMME, P., GORIS, J., CHEN, W. M., DE VOS, P. and WILLEMS, A. 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst Appl Microbiol.* **25**(4): 507-12.
- VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DEVOS, P., KERSTERS, K. and SWINGS, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* **60**(2): 407-438.
- VANEECHOUTTE, M., ROSSAU, M., DE VOS, P., GILLIS, M., JANSSENS, D., PAEPA, M., DE ROUCK, A., FIERIS, T., CLAYES, G. and KERSTERS, K. 1992. rapid identification of bacteria of the comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* **93**: 227-234.
- VANRHLJN, P. and Vanderleyden, J. 1995. The *Rhizobium* plant symbiosis. *Microbiological Reviews.* **59**(1): 124-142.
- VANROSSUM, D., SCHUURMANS, F.P., GILLIS, M., MUYOTCHA, A., VANVERSEVELD, H.W., STOUTHAMER, A.H. and BOOGERD, F.C. 1995. Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. *Applied and Environmental Microbiology.* **61**(4): 1599-1609.
- VAUTERIN L. and VAUTERIN P., 1992. Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *Eur. Microbiol.* **33** : 633-641.
- VELÁZQUEZ, E., CRUZSANCHEZ, J.M., MATEOS, P.F. and MARTINEZ-MOLINA, E. 1998. Analysis of stable low-molecular-weight RNA profiles of members of the family *Rhizobiaceae*. *Appl Environ Microbiol.* **64**(4): 1555-1559.
- VELÁZQUEZ, E., IGUAL, J.M., WILLEMS, A., FERNADEZ, M.P., MUNOZ, E., MATEOS, P.F., ABRIL, A., TORO, N., NORMAND, P., CERVANTES, E., GILLIS, M. and MARTINEZMOLINA, E. 2001. *Mesorhizobium chacoense* sp nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**: 1011-1021.
- VELÁZQUEZ, E., LUISPALOMO, J., LASTRA, B., MATEOS, P.F., GARCIABENAVIDES, P. and MARTINEZ-MOLINA, E. 2001. Rapid identification of *Agrobacterium* species by staircase electrophoresis of low molecular weight RNA profiles. *Eur J Plant Pathology.* **107**(9): 931-938.
- VELÁZQUEZ, E., MARTINEZ-ROMERO, E., RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N., TRUJILLO, M.E., DAZA, A., MATEOS, P.F., MARTINEZ-MOLINA, E. and VAN BERKUM, P. 2001. Characterization of rhizobial isolates of *Phaseolus vulgaris* by staircase

- electrophoresis of low molecular weight RNA. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**(2): 1008-1010.
- VERSALOVIC, J., KOEUTH, T. and LUPSKI, J. R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**: 6823-6831.
- VIALARD, V., POIRIER, I., COURNOYER, B., HAURAT, J., WIEBKIN, S., OPHEL-KELLER, K. and BALANDREAU, J. 1998. *Burkholderia graminis* sp. nov, a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*] phenazinium, [*Pseudomonas*] pyrrocinia and [*Pseudomonas*] glathei as *Burkholderia*. *Int J Syst Bacteriol.* **48 Pt 2**: 549-63.
- VILLEGAS, M.C. 2002. Spécificité symbiotique de *Sinorhizobium meliloti* associé à *Medicago laciniata* : Biodiversité et déterminisme génétique. Thèse. Université CLAUDE-BERNARD – LYON 1. 174 pages.
- VINCENT, J. M. (1970). A manual for the practical study of root-nodule bacteria, In: International Biological Programme Handbook no. 15. Oxford, Blackwell Scientific Publications Ltd.: pp. 73 - 97.
- VINUESA, P., RADEMAKER, J.L.W., DEBRUIJN, F.J. and WERNER, D. 1998. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Appl Environ Microbiol.* **64**(6): 2096-2104.
- WANG, E. T., MARTINEZ-ROMERO, J. and MARTINEZ-ROMERO, E. 1999. Genetic diversity of rhizobia from *Leucaena leucocephala* nodules in Mexican soils. *Mol Ecol.* **8**(5): 711-724.
- WANG, E. T., ROGEL, M.A., GARCIAS DE LOSSANTOS, A., MARTINEZ-ROMERO, J., CEVALLOS, M.A. and Martinez-Romero, E. 1999. *Rhizobium etli* bv. mimosae, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Int J Syst Bact.* **49**: 1479-1491.
- WANG, E. T., TAN, Z.Y., WILLEMS, A., FERNANDEZLOPEZ, M., REINHOLDHUREK, B. and MARTINEZ-ROMERO, E. 2002. *Sinorhizobium morelense* sp nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**: 1687-1693.
- WANG, E. T., VAN BERKUM, P., BEYENE, D., SUI, X.H., DORADO, O., CHEN, W.X. and MARTINEZ-ROMERO, E. 1998. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *Int J Syst Bact.* **48**: 687-699.
- WAYNE, L. G., BRENNER, D.J., COLWELL, R.R., GRIMONT, P.A.D., KANDLER, O., KRICHEVSKY, M.I., MOORE, L.H., MOORE, W.E.C., MURRAY, R.G.E., STACKEBRANDT, E., STARR, M.P. and TRUPER, H.G. 1987. Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**(4): 463-464.

- WEI, G. H., WANG, E.T., TAN, Z.Y., ZHU, M.E. and CHEN, W.X. 2002. *Rhizobium indigoferae* sp nov and *Sinorhizobium kummerowiae* sp nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**: 2231-2239.
- Wei, G.H., Tan, Z.Y., Zhu, M.E., Wang, E.T., Han, S.Z. and Chen, W.X. 2003. Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **53**: 1575 - 1583.
- WELSH, J. and MCCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research.* **18**(24): 7213-7218.
- WICKENS, G. E., SEIF EL DIN, A. G., SITA, G. and NAHAL, I. 1996. Rôle des acacias dans l'économie rurale des régions sèches d'Afrique et du Proche Orient. *Cahier FAO Conservation.* **27**.152p.
- WIDMER, D., SHAFFER, B., PORTEOUS, L. and SEIDLER, R. 1999. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a douglas fir forest site in the Oregon cascade mountain range. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 374-380.
- WILLEMS, A. and COLLINS, M.D. 1993. Phylogenetic analysis of Rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bact.* **43**(2): 305-313.
- Willems, A., Coopman, R. and Gillis, M. 2001. Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**: 111-117.
- WILLEMS, A., COOPMAN, R. and GILLIS, M. 2001b. Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridizations in *Bradyrhizobium*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**: 623-632.
- WILLEMS, A., DOIGNON-BOURCIER, F., COOPMAN, R., HOSTE, B., de LAJUDIE, P. and GILLIS, M. 2000. AFLP fingerprint analysis of *Bradyrhizobium* strains isolated from *Faidherbia albida* and *Aeschynomene* species. *System. Appl. Microbiol.* **23**: 137-147.
- Willems, A., Doignon-Bourcier, F., Gillis, M. and deLajudie, P. 2001. Evaluation of AFLP for the grouping of *Bradyrhizobium* strains. *Genet. Sel. Evol.* **33**: 365-377.
- Willems, A., Doignon-Bourcier, F., Goris, J., Coopman, R., deLajudie, P., DeVos, P. and Gillis, M. 2001. DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**: 1315-1322.
- WILLEMS, A., FERNANDEZ-LOPEZ, M., MUNOZ-ADELANTADO, E., GORIS, J., DE VOS, P., MARTINEZ-ROMERO, E., TORO, N. and GILLIS, M. 2003a. Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an opinion. *Int J Syst Evol Microbiol.* **53**(Pt 4): 1207-17.
- WILLEMS, A., MUNIVE, A., de LAJUDIE, P. and GILLIS, M. 2003b. In most *bradyrhizobium* groups sequence comparison of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions corroborates DNA-DNA hybridizations. *System. Appl. Microbiol.* **26**: 203-210.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. and TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research.* **18**(22): 6531-6535.

- WILLIAMS, S. T. ed. (1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 4. Baltimore: Williams & Wilkins.
- WOESE, C. R. (1991). Prokaryote systematics: the evolution of a science. *The Prokaryotes*. Balows A., Trüpe, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.H. New York, Springer. 1: 3-18.
- WOESE, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*. 51(2): 221-271.
- WOESE, C. R. and FOX, G.E 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74: 5088-5090.
- WOLTERS, J. and ERDMANN, A. 1988. compilation of 5S rRNA and 5S rRNA gene sequences. *Nucleic Acids Res.* 16 (Suppl.): r1-r85.
- XU, L. M., GE, C., CUI, Z., LI, J. and FAN, H. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45(4): 706-711.
- YABUUCHI, E., KOSAKO, Y., YANO, I., HOTTA, H. and NISHIUCHI, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov. : Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Pelleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1986) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 39: 897-904.
- YABUUCHI, E., KOSAKO, Y., OYAIZU, H., YANO, I., HOTTA, H., HASHIMOTO, Y., EZAKI, T. and ARAKAWA, M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981). *com. nov. Microbiol. immunol.* 36: 1251-1275.
- YABUUCHI, E., YANO, I., OYAIZU, H., HASHIMOTO, Y., ESAKI, T. and YAMAMOTO, H. 1990. Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiol. Immunol.* 34: 99 - 119.
- YAN, A. M., WANG, E.T., KAN, F.L., TAN, Z.Y., SUI, X.H., REINHOLDHUREK, B. and CHEN, W.X. 2000. *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus* spp. in arid saline soils in Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50: 1887-1891.
- YANAGI, M. and YAMASATO, K. 1993. Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiology Letters.* 107: 115-120.
- YANNI, Y. G., RIZK, R.Y., ABDELFAH, F.K., SQUARTINI, A., CORICH, V., GIACOMINI, A., DEBRUIJN, F., RADEMAKER, J., MAYAFLORES, J., OSTROM, P., VEGAHERNANDEZ, M., HOLLINGSWORTH, R.I., MARTINEZMOLINA, E., MATEOS, P., VELAZQUEZ, E., WOPEREIS, J., TRIPLETT, E., UMALIGARCIA, M., ANARNA, J.A., ROLFE, B.G., LADHA, J.K., HILL, J., MUJOO, R., NG, P.K. and DAZZO, F.B. 2001. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. *Aust J Plant Physiol.* 28(9): 845-870.
- YANNI, Y. G., RIZK, R.Y., CORICH, V., SQUARTINI, A., NINKE, K., PHILIPHOLLINGSWORTH, S., ORGAMBIDE, G., DE BRUIJN, F., STOLTZFUS, J.,

- BUCKLEY, D., SCHMIDT, T.M., MATEOS, P.F., LADHA, J.K. and DAZZO, F.B. 1997. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil*. **194**(1-2): 99-114.
- YAO, Z. Y., KAN, F.L., WANG, E.T., WEI, G.H. and CHEN, W.X. 2002. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. **52**: 2219-2230.
- YOUNG, J. M., KUYKENDALL, L.D., MARTINEZ-ROMERO, E., KERR, A. and SAWADA, H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R-rhizogenes*, *R-rubi*, *R-undicola* and *R-vitis*. *Int. J. Syst Evol Microbiol*. **51**: 89-103.
- Young, J. P. W. (1991). Phylogenetic classification of nitrogen fixing organisms. Biological nitrogen fixation. Stacey G., Burris R. H. and Evans H. J., Chapman & Hall: 43-86.
- YOUNG, J. P. W. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen fixing organisms. Biological nitrogen fixation. Stacey G., Burris R. H. and Evans H. J., Chapman & Hall: 43-86.
- YOUNG, J. P. W. (2000). Taxonomy and evolution of diazotrophs. Nitrogen fixation: From molecules to crop productivity., Brazil, Kluwer Academic Publishers.
- YOUNG, J. P. W. and HAUKKA, K.E. 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytologist*. **133** : 87-94
- YOUNG, J. P. W., and JOHNSTON, A.W.B. 1989. The evolution of specificity in the legume *Rhizobium* symbiosis. *Tree*. **4**(11): 341-349.
- YOUNG, J. P. W., DOWNER, H.L. and EARDLY, B.D. 1991. Phylogeny of the phototrophic *rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *Journal of Bacteriology*. **173**(7): 2271-2277.
- ZABEAU, M. and VOS, P. 1993. Selective restriction fragment amplification : a general method for DNA fingerprinting. *European patent Application. Number* : **9240269.7**(Publication number : 0 534 858 A1).
- ZAHHRAN, H. H. 2001. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *J Biotechnol*. **91**(2-3): 143-153.
- ZAHHRAN, H. H., 1998. Structure of root nodules and nitrogen fixation in Egyptian wild herb legumes. *Biol Plant*. **41**(4): 575-585.
- ZAKHIA F. and de LAJUDIE P., 2001. Taxonomy of *Rhizobia*, mini-review. *Agronomie* **21** : 569-576.
- ZAKHIA F., DUCOUSSO M., MONDOLOT-COSSON L., CLEYET-MAREL J.C. and ANDARY C. 2003. Spot inoculation of *Medicago laciniata* root system by *Sinorhizobium meliloti* induces local accumulation of Flavonoïds. *Acta Botanica Gallica*. **150** (3) : 275 - 283.
- ZAKHIA, F., 2000. Etude du système racinaire de *Medicago laciniata* infecté par *Sinorhizobium sp.* ou par *Glomus sp.* Mémoire de D.E.A. Université d'Aix-Marseille III. Faculté des Sciences et Techniques de Saint-Jérôme, 32 pages.

- ZAKHIA, F., BEKKI A., JEDER H., DOMERGUE O., GILLIS M., CLEYET-MAREL J-C. and de LAJUDIE P. 2001. Diversity of Rhizobia in the Mediterranean Basin. 13th International Conference on Nitrogen Fixation. Hamilton (Canada).
- ZAKHIA, F., JEDER, H., DOMERGUE, O., WILLEMS, A., CLEYET-MAREL, J-C., GILLIS, M., DREYFUS, B. and de LAJUDIE, P. 2004. Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. Submitted
- ZAVARZIN, G. A. 1961. Budding bacteria. *Microbiologiya*. **30**: 952-975.
- ZERHARI, K., AURAG, J. and FILALI-MALTOUF. (1998). Biodiversity of *Rhizobium sp.* strains isolated from *Acacia spp.* in south of Morocco., *In* : Elmerich et al. (ed), Biological nitrogen fixation for the 21st century. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- ZERHARI, K., AURAG, J., KHBAYA, B., KHARCHAF, D. and FILALI-MALTOUF, A. 2000. Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating *Acacia* species in the arid and Saharan regions of Morocco. *Lett Appl Microbiol.* **30**(5): 351-357.
- ZHANG, H., HANADA, S., SHIGEMATSU, T., SHIBUYA, K., KAMAGATA, Y., KANAGAWA, T. and KURANE, R. 2000. *Burkholderia kururiensis sp. nov.*, a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **50**: 743-749.
- ZHANG, X., NICK, G., KAIJALAINEN, S., TEREFEWORK, Z., PAULIN, L., TIGHE, S.W., GRAHAM, P.H. and LINDSTROM, K. 1999. Phylogeny and diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from the root nodules of peanut (*Arachis hypogaea*) in sichuan. *System. Appl. Microbiol.* **22**: 378-386.
- ZINNIEL, D. K., LAMBRECHT, P., HARRIS, N.B., FENG, Z., KUCZMARSKI, D., HIGLEY, P., ISHIMARU, C.A., ARUNAKUMARI, A., BARLETTA, R.G. and VIDAVER, A.K. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl Environ Microbiol.* **68**(5): 2198-2208.
- ZOGLAMI, A., HASSEN, H., SEKLANI, H., ROBERTSON, L. and SALKINI, A.K. 1996. Distribution des luzernes annuelles en Tunisie centrale en fonction des facteurs édaphiques climatiques. *Fourrages*. **145**: 5 - 16.



TITRE : Diversité des Bactéries Hôtes de Légumineuses Méditerranéennes en Tunisie et au Liban

RESUME : Les bactéries associées aux nodules racinaires de 24 espèces de légumineuses spontanées des zones arides de Tunisie (*Anthyllis*, *Argyrolobium*, *Astragalus*, *Calycotome*, *Coronilla*, *Ebenus*, *Genista*, *Hedysarum*, *Hippocrepis*, *Lathyrus*, *Lotus*, *Medicago*, *Ononis*, *Retama*) et de 21 espèces du Liban (*Astragalus*, *Biserrula*, *Lathyrus*, *Lotus*, *Lupinus*, *Medicago*, *Melilotus*, *Onobrychis*, *Scorpiurus*, *Spartium*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vicia*) ont été étudiées. Elles ont été caractérisées : ARDRA de l'ADNr 16S et SDS-PAGE des protéines totales (94 isolats de la Tunisie), ARDRA de la région ADNr16S-IGS (60 isolats du Liban) et séquençage de l'ADNr 16S ou de l'intergène séparant l'ADNr 16S du 23S (IGS). Les résultats montrent que la majorité de ces isolats appartiennent aux genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Bradyrhizobium* (Tunisie et Liban) ou *Mesorhizobium* (Tunisie), connus déjà comme Bactéries Nodulantes des Légumineuses (BNL). Des souches de *R. galegae* ont été trouvées pour la première fois en Méditerranée. Une souche de *Bradyrhizobium* sp. est associée à *Medicago orbicularis*. D'autres isolats appartiennent aux genres *Inquilineus*, *Bosea*, *Rhodopseudomonas*, *Paracraurococcus*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Starkeya*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Agromyces*, *Microbacterium*, *Ornithinococcus*, *Bacillus* et *Paenibacillus*, dont certains représentants ont déjà été décrits comme endophytes. Certains groupes pourraient représenter de nouvelles espèces des genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Phyllobacterium*. Des séquences d'ADN analogues à la séquence *nifH* de *Sinorhizobium meliloti* ont été mises en évidence pour la première fois chez les genres *Microbacterium*, *Agromyces*-like, *Starkeya* et *Phyllobacterium*-like.

Mots-clefs : Légumineuses méditerranéennes – BNL – *Rhizobium* – Fixation d'azote – ARDRA – Tunisie – Liban.

Title: Diversity of Mediterranean Legume Bacterial Hosts in Tunisia and Lebanon.

Abstract. The bacteria associated to root nodules of spontaneous legumes in 2 Mediterranean countries were characterized using a polyphasic approach. 24 legume species from arid regions in Tunisia (*Anthyllis*, *Argyrolobium*, *Astragalus*, *Calycotome*, *Coronilla*, *Ebenus*, *Genista*, *Hedysarum*, *Hippocrepis*, *Lathyrus*, *Lotus*, *Medicago*, *Ononis*, *Retama*) and 21 legume species in Lebanon (*Astragalus*, *Biserrula*, *Lathyrus*, *Lotus*, *Lupinus*, *Medicago*, *Melilotus*, *Onobrychis*, *Scorpiurus*, *Spartium*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vicia*) were investigated. 16S ARDRA and SDS-PAGE of whole cell protein (94 strains from Tunisia) and 16S-IGS ARDRA (60 Strains from Lebanon) and DNA partial or total sequencing (16S rDNA and 16S-23S rDNA IGS) were performed. Some isolates belong to genera already known as Legume Nodulating Bacteria (LNB) *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* (Tunisia and Lebanon) and to *Mesorhizobium* (Tunisia). Strains of *R. galegae* were identified for the first time in the Mediterranean region and a *Bradyrhizobium* sp. strain was found to be associated to *Medicago orbicularis*. Several genera found in Tunisia may constitute new species (*Rhizobium*, *Sinorhizobium* and *Phyllobacterium*). Other nodule associated bacteria were characterized as members of *Inquilineus*, *Bosea*, *Rhodopseudomonas*, *Paracraurococcus*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Starkeya*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Agromyces*, *Microbacterium*, *Ornithinococcus*, *Bacillus* and *Paenibacillus*, some of which are reported as endophytes in literature. *nifH*-like sequences close to *Sinorhizobium meliloti nifH* gene are reported here for the first time within the genera *Microbacterium*, *Starkeya*, *Agromyces*-like and *Phyllobacterium*-like.

Key words: Mediterranean Legumes – LNB – *Rhizobium* – Nitrogen fixation – ARDRA – Tunisia – Lebanon.

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE DE RATTACHEMENT

Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM) - UMR 113, Campus International de Baillarguet, TA 10/J - 34398 Montpellier cedex 05, France
