

Fonds Documentaire IRD

Cote : B\* 23975 Ex:1

# LES RHIZOBIUMS D'ACACIA

## Biodiversité et taxonomie

Yves PRIN, Antoine GALIANA, Marc DUCOUSSO, Nicolas DUPUY, Philippe de LAJUDIE et Marc NEYRA



Amas de nodules apparus spontanément sous un *Acacia mangium* à Oumé (Côte-d'Ivoire). Les techniques moléculaires et sérologiques permettent d'évaluer la diversité des souches présentes dans ces nodules.

*Nodules harvested under a spontaneously nodulated Acacia mangium in Oumé (Côte-d'Ivoire). Serological and molecular biology methods allow to evaluate the diversity of rhizobial strains infecting these nodules.*

Y. PRIN, A. GALIANA  
B.S.F.T-CIRAD-Forêt/ORSTOM  
45 bis, avenue de la Belle-Gabrielle  
94736 NOGENT-SUR-MARNE CEDEX  
(France)

M. DUCOUSSO  
CIRAD-Forêt/ISRA  
B.P. 1716  
DAKAR (Sénégal)

B. DUPUY, P. de LAJUDIE, M. NEYRA  
ORSTOM/ISRA  
B.P. 1386  
DAKAR (Sénégal)

Fonds Documentaire IRD



010023975

5

## RÉSUMÉ

### LES RHIZOBIUMS D'ACACIA Biodiversité et taxonomie

Les bactéries disposent d'un éventail de mécanismes de réarrangements cellulaires très diversifiés. C'est un des points majeurs qui les distinguent des organismes supérieurs. Les conséquences au niveau des études de biodiversité et de taxonomie sont développées, dans une première partie, sous forme de rappels (notions de taxonomie, genre, espèce, isolat, biotype, souche, notions de biodiversité bactérienne, techniques d'étude), de même que l'état des connaissances sur la taxonomie des rhizobiums. Une seconde partie explique en quoi la caractérisation des rhizobiums est une étape importante pour une meilleure utilisation des souches et une gestion améliorée des essais d'inoculation sur le terrain. La diversité des rhizobiums capables de noduler le genre *Acacia* est étudiée au niveau de deux laboratoires : le laboratoire ORSTOM/ISRA de Dakar s'intéresse plus particulièrement à la diversité des rhizobiums des acacias de zones sèches et le laboratoire ORSTOM/CIRAD de Nogent à celle des acacias de zone humide.

**Mots-clés :** MICRO-ORGANISME ; SOL ; BACTÉRIE ; CLASSIFICATION ; FIXATION DE L'AZOTE ; MICROBIOLOGIE ; INOCULATION ; RHIZOBIUM ; MIMOSACEAE.

## ABSTRACT

### RHIZOBIA NODULATING ACACIAS Biodiversity and taxonomy

Bacteria have a wide diversity of mechanisms of cellular rearrangement. This is one of the main respects in which they differ from higher organisms. In the first part of this article, the authors develop the consequences of this where studies of biodiversity and taxonomy are concerned, and review the concepts of taxonomy, genus, species, isolate, biotype, strain, and bacterial diversity. Reference is made to techniques of study and to present knowledge of the taxonomy of rhizobia. The second part explains why the characterization of rhizobia is an important stage in achieving a better use of strains and a better management of field inoculation trials. The diversity of rhizobia able to nodulate the genus *Acacia* is being studied in two laboratories : the ORSTOM/ISRA laboratory in Dakar, Senegal, is more particularly concerned with the diversity of rhizobia in dry-zone acacias, while the ORSTOM/CIRAD Laboratory in Nogent investigates in humid-zone acacias.

**Key words :** MICRO-ORGANISMS ; SOIL ; BACTERIA ; CLASSIFICATION ; NITROGEN FIXATION ; MICROBIOLOGY ; INOCULATION METHODS ; RHIZOBIUM ; MIMOSACEAE.

## RESUMEN

### LOS RIZOBIOS QUE NODULAN LAS ACACIAS Biodiversidad y taxonomía

Las bacterias tienen una variedad de mecanismos de reordenamiento molecular. Esta característica las distingue de los organismos superiores. Las consecuencias de tal característica, a nivel de los estudios de biodiversidad y taxonomía, se analizan en primer lugar bajo la forma de actualización (nociones de taxonomía, género, especie, aislado, biotipo, cepa, nociones de biodiversidad bacteriana, técnicas de estudio), asimismo que el estado actual del conocimiento acerca de la taxonomía de los rizobios. En segundo lugar, se explica porqué la caracterización de rizobios de acacia es una etapa importante para la mejor utilización de cepas y para el mejoramiento de los ensayos de inoculación en el terreno. La diversidad de rizobios capaces de nodular árboles del género *Acacia* se estudia en dos laboratorios : el laboratorio ORSTOM/ISRA de Dakar se interesa en particular a la biodiversidad de rizobios de las acacias de zonas secas y el laboratorio ORSTOM/CIRAD de Nogent a aquella de las acacias de zonas húmedas.

**Palabras clave :** MICRO-ORGANISMOS ; SUELO ; BACTERIA ; CLASIFICACION ; FIJACION DEL NITROGENO ; MICROBIOLOGIA ; INOCULACION ; RHIZOBIUM ; MIMOSACEAE.

**C**et article expose les principaux moyens dont disposent maintenant les chercheurs pour identifier une souche bactérienne, tout en montrant les problèmes posés par l'estimation de la diversité génétique dans le monde bactérien ; il précise en quoi la taxonomie et l'étude de la biodiversité sont deux approches bien différentes et insiste sur l'intérêt d'étudier la biodiversité chez les rhizobiums d'acacia.

Dans le numéro 223 de BOIS ET FORETS DES TROPIQUES, Brunck *et al.* (1990) faisaient une analyse de différents essais d'inoculation d'essences forestières réalisés au champ avec des micro-organismes symbiotiques. Parmi les conditions de succès des inoculations, ces auteurs mettaient en avant l'importance de la qualité de l'inoculum, tant au niveau de la compétitivité de la souche bactérienne utilisée vis-à-vis des souches locales que de la spécificité entre les deux partenaires du couple symbiotique. Pour mieux contrôler les essais d'inoculation, il est donc extrêmement important d'être en mesure d'identifier, de manière rapide et fiable, une souche bactérienne donnée afin de repérer une souche locale à fort potentiel symbiotique, d'en estimer la compétitivité dans les conditions de l'essai (type de sol, couvert végétal...) et d'en suivre le devenir dans le sol (dispersion de la souche, maintien au cours du temps, impact de l'apport d'une souche exogène sur la population locale).

La distinction entre le monde bactérien (procaryote) et les organismes supérieurs (eucaryotes) est basée sur la présence d'une membrane nucléaire. Cette membrane définit un noyau vrai (eucaryote) ; elle est absente chez les bactéries. Cette distinction s'accompagne d'un ensemble de caractères qui différencient toutes les bactéries étudiées à ce jour des organismes eucaryotes : taille réduite (classiquement 1µm), nombre réduit d'organites intracellulaires (pas de mitochondries, pas de chloroplastes), haploïdie (une bactérie possède typi-

quement un seul chromosome circulaire, possédant un nombre réduit de protéines structurales), reproduction clonale, populations de très grande taille et temps de génération courts. Un des caractères les plus importants pour l'étude des populations bactériennes est la très grande diversité des mécanismes possibles de réarrangement ou d'échange de matériel génétique, comme la conjugaison, la transduction et la transformation, les plasmides, les phages et les éléments transposables.

#### LISTE DES SIGLES UTILISÉS DANS CET ARTICLE

B.S.F.T. : Biotechnologie des Symbioses Forestières Tropicales.  
 ORSTOM : Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération.  
 ISRA : Institut Sénégalais de Recherche Agronomique.  
 NIFTAL : Nitrogen Fixation in Tropical Agricultural Legumes.  
 U.S.D.A. : United State Department of Agriculture.  
 CAB : Commonwealth Agricultural Bureau.  
 ACIAR : Australian Centre for International Agricultural Research.  
 CSIRO : Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization.  
 CIFOR : Centre de Recherche Forestière Internationale.

## TAXONOMIE ET BIODIVERSITÉ BACTÉRIENNE

### NOTIONS DE GENRE, ESPÈCE, ISOLAT BIOTYPE ET SOUCHE EN BACTÉRIOLOGIE

La taxonomie ou systématique a deux fonctions : la première est d'identifier et de décrire aussi complètement que possible les unités taxonomiques de base ou espèces ; la seconde de trouver le moyen d'arranger et de cataloguer ces unités entre elles. Ainsi, plusieurs espèces bactériennes seront-elles regroupées dans un genre, lui-même classé dans une famille, puis dans un ordre, une classe et une division ou phylum.

#### □ La notion de genre et d'espèce

Les bactéries étant haploïdes et se reproduisant essentiellement sans sexualité, la notion d'espèce utilisée avec les plantes et animaux n'est plus valable. Les taxonomistes bactériens ont montré que l'analyse soignée d'un nombre élevé de souches appartenant à un groupe bactérien donné permet de regrouper ces souches en un

### DÉFINITIONS

#### D'après CHARTIER, 1991

**Conjugaison** : Transfert naturel d'ADN plasmidique ou chromosomique d'une cellule bactérienne à une autre par l'intermédiaire d'un pont cytoplasmique.

**Phage** (ou bactériophage) : Tout espèce de virus dont l'hôte est une bactérie.

**Plasmide** : Molécule d'ADN extrachromosomique capable de se répliquer indépendamment et portant des caractères génétiques non essentiels à la cellule-hôte.

**Transduction** : Transfert d'information génétique d'une bactérie à une autre par l'intermédiaire d'un phage.

**Transformation** (ou transformation génétique) : Modification du patrimoine génétique d'une cellule par l'introduction d'une information génétique étrangère.

**Transposon** (ou élément transposable) : Fragment d'ADN susceptible de se déplacer d'un endroit du génome dans un autre.

certain nombre de sous-groupes qui vont constituer ainsi des espèces. La notion « officielle » d'espèce bactérienne repose sur le pourcentage d'homologie observé après hybridation ADN/ADN : deux souches bactériennes présentant plus de 70 % d'homologie entre leurs ADN sont reconnues appartenant à la même espèce (WAYNE *et al.* 1987 ; TRÜPER, 1992). Lors de la description d'une nouvelle espèce, une souche particulière, dite souche-type, est désignée de façon à être utilisée comme référence de cette espèce.

Si le concept d'espèce semble correspondre à une entité réelle, la validité biologique des catégories de classement supérieures comme le genre, la famille, l'ordre, la classe et la division (ou phylum) est beaucoup plus contestable. Les outils de comparaison nouveaux nous permettent de remettre sérieusement en question les classifications hiérarchiques établies à ce jour. Les taxonomistes bactériens reconnaissent la nécessité de ne plus baser le système de classification sur des similarités de fonctions (phototrophes, diazotrophes,...) et d'adopter une approche dite « polyphasique » (c'est-à-dire combinant plusieurs techniques) pour déterminer un groupe taxonomique (« taxon ») bactérien, en tenant compte des caractéristiques phylogéniques (c'est-à-dire des relations évolutives). Ainsi le terme *Rhizobiaceae*, utilisé pour désigner les rhizobiums au sens large, regroupe-t-il des espèces très éloignées du point de vue phylogénétique et semble de plus en plus discutable dans la taxonomie bactérienne moderne (YOUNG, 1992).

#### □ La notion d'isolat, de biotype, de souche

Dans le monde bactérien, le terme isolat désigne la première culture pure d'un micro-organisme issu du sol, d'un tissu, etc. Par culture pure on désigne généralement une culture issue d'une seule cellule. Il est à noter qu'il n'est pas toujours facile, ou même possible, d'obtenir une culture issue d'une seule bactérie avec certaines bactéries filamenteuses (PRIN *et al.*, 1991).

Un biotype est un groupe d'isolats bactériens partageant certains caractères biochimiques ou physiologiques (YOUNG, 1989).

Le mot souche désigne une population d'individus génétiquement identiques mais différenciables des autres individus de la même espèce par un certain nombre de caractères (LAWRENCE, 1990). Dans le cas de bactéries non cultivables, ces notions ne sont que partiellement applicables.

### SYSTÉMATIQUE DES RHIZOBIUMS

En partant du concept que les rhizobiums peuvent être classés en fonction de la plante-hôte avec laquelle ils entrent en symbiose, FRED *et al.* (1932) ont défini les groupes d'inoculation croisée comme étant « des groupes de plantes entre lesquelles les organismes présents dans les nodules sont mutuellement interchangeables » (ELKAN, 1992). Cependant, les limites de cette classification sont rapidement apparues (WILSON, 1944).

Parallèlement, LÖHNIS et HANSEN (1921) proposèrent les notions de rhizobium « à croissance lente » et rhizobium « à croissance rapide », basées sur les vitesses de croissance sur milieu synthétique au laboratoire. Le terme « à croissance rapide » se réfère généralement à des rhizobiums associés à la luzerne, au trèfle, au haricot et au pois. Ils présentent des temps de génération deux fois inférieurs à ceux des rhizobiums « à croissance lente », comme les rhizobiums du soja et du vigna (cowpea). Cette séparation des rhizobiums en deux groupes, en fonction des vitesses de croissance, s'est trouvée confirmée par de nombreuses études utilisant la sérologie, la composition en polysaccharides extracellulaires, les besoins nutritionnels, le métabolisme, les pourcentages en nucléotides, l'hybridation ADN/ADN, l'analyse des ARN. Faisant suite aux travaux de GRAHAM (1964), HENNECKE *et al.* (1985) ont montré combien ces deux groupes étaient éloignés l'un de l'autre du point de vue évolutif et appartenaient même à des phylums différents, en comparant les séquences d'ARN 16S.

La classification proposée par le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (JORDAN, 1984) reconnaissait deux genres regroupés dans la famille des *Rhizobiaceae* : *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*. Le genre *Rhizobium* comprenait trois espèces *R. loti*, *R. meliloti* et *R. leguminosarum*, cette dernière espèce étant divisée en trois biovars : *trifolii*, *phaseoli* et *viceae*. Le genre *Bradyrhizobium* ne comprenait que l'espèce *japonicum*.

En 1988, la taxonomie des rhizobiums au sens large s'est considérablement modifiée par la combinaison d'études polyphasiques et phylogénétiques. Deux genres nouveaux : *Azorhizobium* (DREYFUS *et al.*, 1988) et *Sinorhizobium* (CHEN *et al.*, 1988) et six nouvelles espèces ont été proposés (tableau I).

TABLEAU I  
Classification\* des rhizobiums  
d'après ELKAN (1992)

Genre	Espèce
<i>Bradyrhizobium</i> (JORDAN, 1982)	<i>B. japonicum</i> (JORDAN, 1982)
<i>Rhizobium</i> (JORDAN, 1982)	<i>R. leguminosarum</i> (JORDAN, 1982)
	<i>R. meliloti</i> (JORDAN, 1982)
	<i>R. loti</i> (JORDAN, 1982)
	<i>R. galegae</i> (LINDSTRÖM, 1989)
	<i>R. tropici</i> (MARTINEZ-ROMERO <i>et al.</i> , 1991)
	<i>R. huakuii</i> (CHEN <i>et al.</i> , 1991)
<i>Azorhizobium</i> (DREYFUS <i>et al.</i> , 1988)	<i>A. caulinodans</i> (DREYFUS <i>et al.</i> , 1988)
<i>Sinorhizobium</i> (CHEN <i>et al.</i> , 1988)	<i>S. fredii</i> (CHEN <i>et al.</i> , 1988)
	<i>S. xinjiangensis</i> (CHEN <i>et al.</i> , 1988)

\* Cette classification est d'ores et déjà contestée, notamment pour le genre *Sinorhizobium*.

Tout récemment, cette dernière classification a été remise en question, tant au niveau de certaines espèces et biovars que de certains genres (comme *Sinorhizobium* : JARVIS *et al.*, 1992).

La construction d'arbres phylogéniques prenant en compte un nombre de plus en plus important de bactéries a permis de confirmer encore l'hétérogénéité des genres et des espèces traditionnellement rangées dans la famille des *Rhizobiaceae* (YOUNG, 1992). Il semble donc encore prématuré de proposer une classification très formelle des rhizobiums qui soit compatible avec leur phylogénie.

GRAHAM *et al.* (1991) proposent que toute modification de la classification des rhizobiums ne soit prise en compte qu'après avoir franchi un certain nombre d'étapes et de contrôles, parmi lesquels : description de l'espèce dans « International Journal of Systematic Bacteriology » et dépôt de la souche-type dans une collection de souches internationalement reconnue, la description devant porter sur les caractères suivants : performances symbiotiques, caractéristiques culturelles et morphologiques, homologie ADN/ADN, hybridation ARNr/ADN, séquençage de l'ARNr 16S, RFLP de l'ADN et comparaison des profils isoenzymatiques. On peut ainsi percevoir le niveau de complexité des travaux nécessaires à la description d'un nouveau taxon.

## NOTION DE BIODIVERSITÉ BACTÉRIENNE

En dehors des préoccupations bien spécifiques liées à la systématique bactérienne, il est souvent nécessaire de pouvoir identifier et différencier une souche bactérienne d'une autre, soit afin d'explorer la richesse d'un site en bactéries, par exemple autour d'une fonction donnée (bactéries détoxifiantes, bactéries nitrifiantes, bactéries productrices d'un métabolite intéressant...), soit pour suivre le devenir d'une souche bactérienne d'intérêt particulier après sa réintroduction en milieu non contrôlé. On se situe alors en général au niveau infraspécifique, en raisonnant en termes de souches bactériennes, sans qu'il soit ainsi fait référence à des notions d'espèces, de genres ou de taxons en général. On cherchera à évaluer le niveau de diversité d'une population d'isolats ou de souches bactériennes.

Dans l'étude de la diversité, on cherchera principalement tout ce qui peut différencier une souche d'une autre, alors que le taxonomiste cherchera plutôt tout ce qui peut mettre en relation une souche avec une autre. A partir d'une étude de biodiversité sur un grand nombre de souches bactériennes, le taxonomiste pourra tenter de multiplier les techniques de caractérisation afin de vérifier si les souches non différenciées lors de l'étude de biodiversité pourraient constituer un ou plusieurs taxons. Dans une telle démarche, la taxonomie se situe en aval de la biodiversité.

La diversité biologique est un thème de réflexion et de recherche qui a connu un essor considérable depuis la Conférence des Nations Unies sur l'Environnement et le Développement à Rio en 1992.

## □ Pourquoi étudier la biodiversité bactérienne ?

Bien qu'il semble très hasardeux d'avancer des chiffres, on peut dire que la biodiversité microbienne est extrême. TRÜPER (1992) en donne quelques éléments. Cet auteur cite le cas du monde des insectes où le nombre d'espèces vivantes oscillerait entre 1 500 000 et 8 000 000. Chacune de ces espèces ayant des exigences alimentaires particulières, TRÜPER estime que l'on peut assigner une espèce bactérienne nouvelle à la flore microbienne digestive de chaque espèce d'insecte. Cet auteur rappelle que l'on est loin de connaître la totalité des espèces bactériennes intestinales chez l'homme ou même chez la souris de laboratoire. De plus, il est de nombreux environnements colonisés par les bactéries comme les sols, les grands fonds océaniques, les environnements extrêmes (salinité, température, pression, toxicité extrême), certaines associations symbiotiques avec des eucaryotes microscopiques (comme les ciliés, flagellés et amibes) qui n'ont été que très peu explorés.

Dans sa réunion du 4 novembre 1992 à Lyon, le groupe de travail sur « La Biodiversité en Ecologie Microbienne » a tenté d'analyser en quoi les micro-organismes constituaient un modèle particulièrement important pour comprendre le rôle de la diversité (nous reproduisons presque intégralement l'argumentation de ce groupe de travail) :

- Les micro-organismes présentent une diversité extrême.
- La diversité de leurs conditions de vie est bien plus étendue que celle des eucaryotes (de -5 à 120 °C, de 0 à 1 000 atmosphères).
- Leurs effectifs sont extrêmement importants : par exemple, on estime à  $10^{16}$  le nombre d'individus par hectare pour une espèce bactérienne « significative » (ne sont considérées comme « significatives » que les espèces représentant plus de 1 % de la microflore totale du sol).
- Les temps de génération sont extrêmement courts par rapport à ceux de la plupart des eucaryotes. La descendance et la transmission des caractères sont rapidement identifiables.
- Les bactéries sont fonctionnellement haploïdes.
- Il est possible de connaître la diversité d'importantes portions de l'ADN sans qu'il soit nécessaire de connaître les phénotypes associés.
- Il est possible d'étudier des micro-organismes non cultivables et d'avoir ainsi accès à un pool caché de diversité.
- Les micro-organismes occupent des fonctions-clés (nitrification, dénitrification, fixation d'azote, cellulolyse, méthanogénèse et autres métabolismes anaérobies, changements d'état du soufre et de différents métaux, détoxification, etc.) si bien que l'on peut souvent étudier les niveaux moléculaires, cellulaires et écosystémiques d'une fonction et de sa diversité.

## NOUVELLES APPROCHES PERMETTANT D'Étudier LA BIODIVERSITÉ

Les études de biodiversité mettant la plupart du temps en jeu un nombre important de souches et se situant au niveau infraspécifique, les techniques utilisées devront être très discriminantes tout en suivant des protocoles suffisamment simples pour être compatibles avec le grand nombre de souches examinées. Ces techniques devront également être adaptées aux caractéristiques de croissance des bactéries, qui ne sont pas toujours cultivables ou ne produiront parfois que très peu de biomasse *in vitro*. De plus, les étapes d'isolement de bactéries représentent un criblage, une sélection des souches les mieux adaptées aux conditions de cultures *in vitro*, une étude portant uniquement sur des souches en culture pure pouvant ainsi présenter un biais sérieux par rapport à la diversité réelle *in situ* (MAGGIA, 1991). En fonction des questions posées et des caractéristiques culturelles des bactéries, les outils devront donc être adaptés.

Nous ne ferons pas l'inventaire de toutes les techniques envisageables pour étudier la biodiversité microbienne, mais nous retiendrons celles qui sont actuellement les plus couramment utilisées.

Parmi les outils certainement les mieux adaptés pour répondre à ces préoccupations, citons en premier lieu l'amplification de l'ADN, appelée PCR : Polymerase Chain Reaction (SAIKI *et al.*, 1988), qui permet d'obtenir une grande quantité d'un fragment d'ADN ; le fragment amplifié peut atteindre une taille de 4 000 paires de bases (parfois plus sous certaines conditions). L'ADN amplifié peut être analysé par des enzymes de restriction (RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism), par des sondes spécifiques ou éventuellement par séquençage direct (BALLY *et al.*, 1992). La PCR permet de travailler sur des biomasses bactériennes très réduites en multipliant l'ADN et non pas les cellules (SIMONET *et al.*, 1990), de ne s'intéresser éventuellement qu'à une fonction spécifique (en utilisant des amorces spécifiques des gènes codant pour cette fonction : par exemple les gènes *nif* pour la fixation de l'azote), de comparer des fragments d'ADN « en aveugle » et d'évaluer ainsi la présence de bactéries (capables d'assurer cette fonction) dans un environnement aussi complexe que le sol, sans passer par une étape d'isolement de souches (PICARD *et al.*, 1992).

La technique RAPD ou Random Amplified Polymorphic DNA (WILLIAMS *et al.*, 1990) est également une technique d'amplification de l'ADN mais pour laquelle les amorces utilisées sont très courtes et non spécifiques et vont se fixer de nombreuses fois sur l'ADN génomique. La polymérase va ainsi amplifier de nombreux fragments de taille variable, la taille et le nombre de ces fragments permettant de différencier les souches et d'éviter ainsi l'utilisation d'enzymes de restriction. Toutefois la non spécificité des amorces impose de ne travailler que sur des bactéries en culture pure. La RAPD présente donc un champ d'application plus limité. Tou-

jours sur cultures pures, et avec une biomasse bactérienne suffisante, la technique des RFLP sur ADN génomique est très classiquement utilisée. Elle peut être combinée avec l'utilisation de sondes spécifiques marquées, permettant d'augmenter le caractère discriminant de la technique (cf. par exemple, KUYKENDALL *et al.*, 1992).

C'est à partir de 1978 seulement que les techniques de détection des variations génétiques par comparaison des profils isoenzymatiques ont été étendues aux populations bactériennes (par exemple, MYTTON *et al.*, 1978 ; GOULLET, 1980 ; SELANDER *et al.*, 1986 ; GARDES *et al.*, 1987). En effet, l'application de ces techniques au monde bactérien nécessitait tout d'abord la possibilité de cultiver un nombre important de souches bactériennes en quantité suffisante pour être analysables au niveau d'activités enzymatiques, ce qui représente une difficulté non négligeable avec certains genres bactériens à croissance lente, contraignant ainsi l'investigateur à réduire sérieusement la taille des populations à étudier ou à consacrer de longs préliminaires à optimiser les vitesses de croissance des bactéries (SCHWENCKE, 1991). D'une manière générale, l'étude du polymorphisme enzymatique consiste tout d'abord à réaliser un extrait protéique à partir d'un culot bactérien et à rechercher dans cet extrait le polymorphisme enzymatique par rapport à un substrat donné. Après électrophorèse, les enzymes sont révélées par réaction colorée. La lecture des gels permet alors de classer les isolats en fonction de leur « type électrophorétique » au sein duquel ils partagent les mêmes allèles à tous les loci enzymatiques examinés (YOUNG, 1992).

Les techniques immunologiques ont également largement été utilisées dans l'identification et le suivi de souches grâce à l'utilisation d'anticorps poly- ou, plus récemment (VELEZ *et al.*, 1988 ; KINKLE et SCHMIDT, 1992) monoclonaux. L'obtention d'anticorps à partir d'antigènes plus ou moins purifiés passera par une étape indispensable de vérification de la spécificité de ces anticorps vis-à-vis des souches testées (recherche des « réactions croisées »). La visualisation des réactions pourra se faire par immuno-agglutination sur microplaque, par immunodiffusion sur gel (visualisation des arcs d'immunodiffusion), par marquage des anticorps avec des fluorochromes détectables au microscope à épifluorescence (par exemple, le FITC : Fluoresceine IsoThioCyanate) ou par l'utilisation de combinaisons anticorps-enzyme, cette combinaison permettant de détecter des quantités extrêmement faibles d'antigènes par apparition d'une réaction colorée, quantifiable par spectrophotométrie (test ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Les tests d'immunofluorescence et ELISA peuvent être utilisés avec des bactéries non isolées (systèmes racinaires, sols,...) à condition de disposer des anticorps spécifiques (SCHWINGHAMER et DUDMAN, 1980 ; CLEYET-MAREL et CROZAT, 1982 ; FERNANDEZ-FLOURET et CLEYET-MAREL, 1987).

# ÉTUDE DE LA BIODIVERSITÉ ET CARACTÉRISATION DES RHIZOBIUMS D'ACACIA SPP.

## BIODIVERSITÉ RELATIVE À LA SPÉCIFICITÉ

L'étude de la biodiversité des rhizobiums chez les acacias ne peut être conduite indépendamment des caractéristiques symbiotiques et écologiques de la plante-hôte. L'originalité et l'intérêt d'une telle étude chez les acacias, comme chez la plupart des espèces ligneuses forestières, résident dans le fait que ces espèces sont représentées au sein de peuplements naturels encore existants (provenances) et que ces aires d'origine sont connues et bien délimitées. Ceci n'est évidemment pas le cas chez les espèces de Légumineuses herbacées et, en particulier, chez les espèces cultivées qui ont subi de nombreux cycles de sélection au cours des générations successives et une perte de leur état « sauvage » (LIE *et al.*, 1987). De plus, la sélection exercée sur ces plantes-hôtes au cours du temps n'a probablement pas été sans effet sur les rhizobiums associés ; en conséquence, la spécificité entre les rhizobiums et leurs plantes-hôtes a pu également subir des modifications.

### □ Spécificité chez les rhizobiums

La spécificité peut être définie par la diversité taxonomique des partenaires auxquels l'autre symbiote peut s'associer. La spécificité peut être stricte (une seule espèce bactérienne avec un seul genre de Légumineuse) ou plus large, c'est-à-dire concerner plusieurs taxons bactériens ou de Légumineuses.

Les *Rhizobium spp.*, répartis aussi bien dans les régions tempérées que tropicales, sont en général spécifiques vis-à-vis de leur plante-hôte associée. Leur spectre d'hôte étroit n'exclut pas toutefois l'existence de quelques transgressions d'un groupe d'inoculation croi-

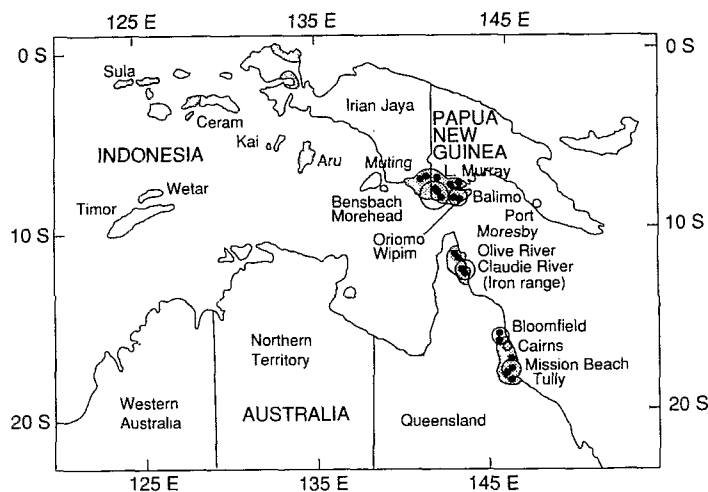
sée à un autre. Un groupe d'inoculation croisée peut être défini comme l'ensemble des souches de rhizobiums nodulant un groupe donné de plantes-hôtes (Y.-R. DOMMARGUES, communication personnelle). Par exemple, appartiennent au même groupe d'inoculation croisée les *Rhizobium* de *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium* et *Calliandra calothyrsus* ; à un autre groupe d'inoculation croisée les *Bradyrhizobium* d'*Acacia auriculiformis*, *Albizia lebbek*, *Paraserianthes falcataria*, *Thep Brosia candida* (TURK et KEYSER, 1992).

Les *Bradyrhizobium spp.* sont répartis essentiellement dans les régions tropicales et ont la réputation d'être peu spécifiques, à l'exception de *Bradyrhizobium japonicum* qui nodule le soja. Toutes les autres espèces de *Bradyrhizobium* sont réunies au sein du groupe Cowpea, nom anglais de la plante-hôte de référence *Vigna unguiculata*, nodulée par la majorité de ces souches de *Bradyrhizobium sp.* Le large spectre d'hôte des *Bradyrhizobium* du groupe Cowpea n'a permis, à ce jour, ni de distinguer plusieurs espèces ni de distinguer des groupes d'inoculation croisée parmi les espèces de Légumineuses qu'ils nodulent.

Cette différence de spécificité entre les *Rhizobium* et les *Bradyrhizobium* est loin d'être absolue en raison de nombreux contre-exemples que l'on trouve surtout chez les systèmes symbiotiques tropicaux et qui demeurent beaucoup moins étudiés que ceux des régions tempérées. Ainsi, certaines souches de rhizobium constituent un groupe intermédiaire entre les *Rhizobium spp.* et les *Bradyrhizobium spp.* Ces souches d'origine tropicale ont une croissance rapide et ont un spectre d'hôte très large. C'est le cas notamment de la souche NGR 234, isolée de *Lablab purpureus*, qui forme des nodules efficaces sur des espèces du groupe Cowpea habituellement nodulées par des *Bradyrhizobium spp.*, comme *Vigna unguiculata*, ou par des *Bradyrhizobium spp.* plus

Aires d'origine d'*Acacia mangium*,  
en noir sur la carte. On voit que ces aires  
sont relativement réduites  
(in : GUNN and MIDGLEY, 1991).

Natural distribution of *Acacia mangium*, indicated by dark dots. Note that these areas are relatively reduced.



spécifiques, comme *Glycine max* ; la souche NGR 234 nodule aussi la non-Légumineuse *Parasponia sp.* (TRINICK, 1980). Inversement, le caractère non spécifique attribué aux *Bradyrhizobium sp.* du groupe Cowpea (*Vigna*) est souvent remis en cause. Ainsi, AHMAD *et al.* (1981 a ; 1981 b) ont-ils montré que des souches de *Bradyrhizobium sp.*, isolées à partir de nodules de *Vigna sp.* prélevés dans différentes régions du Nigeria et du Niger, présentaient une spécificité variable selon leur origine : la plupart des souches provenant du Nigeria nodulent *Cajanus cajan* et *Vigna radiata* tandis que peu nodulent *Arachis hypogea* ; au contraire, la plupart des souches provenant du Niger nodulent *A. hypogea* mais peu nodulent *C. cajan* et *V. radiata*.

#### □ Spécificité de la symbiose chez les arbres fixateurs d'azote

Si la spécificité des rhizobiums peut être définie en fonction de leur spectre d'hôte, à l'inverse on peut attribuer la notion de spécificité à la plante-hôte. Dans ce cas, il faut distinguer deux niveaux : la spécificité d'une espèce peut dépendre de son aptitude à noduler (infectivité) ou de son aptitude à fixer l'azote (effectivité) avec différentes souches de rhizobium. Ainsi, DATE et HALLIDAY (1980) ont classé les espèces en fonction de leur spécificité vis-à-vis des rhizobiums et distinguent trois grands groupes :

- les plantes-hôtes spécifiques (groupe S) nodulant de façon effective avec un nombre restreint de souches de rhizobium ;
- les plantes-hôtes non spécifiques ineffectives (groupe PI, abréviation de l'anglais *promiscuous ineffective*) nodulant souvent avec un grand nombre de souches mais peu effectives la plupart du temps ;
- les plantes-hôtes non spécifiques effectives, nodulant de façon effective avec un grand nombre de souches (groupe PE, abréviation de l'anglais *promiscuous effective*).

DREYFUS et DOMMARGUES (1981), puis DUHOUX et DOMMARGUES (1985) ont classé les arbres fixateurs d'azote différemment en tenant compte du genre de rhizobium considéré. Ils distinguent trois groupes :

- **Groupe 1** : espèces nodulant exclusivement avec le genre *Bradyrhizobium*, comme *Acacia albida*, *Acacia holosericea*, *Acacia linarioides*, *Acacia mearnsii*, *Acacia decurrens*, *Acacia sieberiana*, *Erythrophleum guineense* et *Prosopis africana*.
- **Groupe 2** : espèces ayant une nodulation effective exclusivement avec le genre *Rhizobium sensu stricto*, comme *Acacia nilotica*, *Acacia raddiana*, *Acacia senegal*, *Acacia farnesiana*, *Albizia lebbbeck*, *Leucaena leucocephala* et *Prosopis juliflora*.
- **Groupe 3** : espèces nodulant indifféremment avec le genre *Bradyrhizobium* ou le genre *Rhizobium*, comme *Acacia cyanophylla*, *Acacia seyal* et *Acacia bivenosa*.

Cependant, ces différentes classifications ne sont pas absolues et l'appartenance des espèces à un groupe donné varie selon les auteurs (TURK et KEYSER, 1992),

ceci étant dû au fait que le nombre, la diversité et l'origine des souches de rhizobium testées ne sont pas les mêmes d'une étude à l'autre.

Dans ce paragraphe, nous considérerons les résultats obtenus par le B.S.F.T. (CIRAD-Forêt/ORSTOM, Nogent-sur-Marne, France) et le Laboratoire de Microbiologie de l'ORSTOM/ISRA (Dakar, Sénégal) sur la caractérisation des rhizobiums d'acacia de zones humides et de zones sèches respectivement. Nous essaierons de montrer les problèmes inhérents à l'étude de l'une et l'autre des associations.

## CAS DES ACACIAS DE ZONE HUMIDE CAS PARTICULIER D'ACACIA MANGIUM

Dans les zones tropicales humides, l'introduction d'*Acacia mangium* en plantation s'accroît fortement depuis une dizaine d'années en raison de ses qualités sylvicoles et de sa capacité à croître sur des sols peu fertiles, déficitaires en azote, en particulier. *A. mangium* a été introduit avec succès sur de grandes surfaces, principalement dans la province du Sabah, en Malaisie, où la plupart des plantations industrielles ont été mises en place sur d'anciennes zones de cultures très appauvries envahies par la graminée *Imperata cylindrica*. En 1985, 55 000 hectares avaient été déjà plantés au Sabah (UDARBE et HEPBURN, 1987). D'autres introductions couvrant des étendues plus limitées ont été réalisées aux Philippines, en Indonésie, en Papouasie-Nouvelle-Guinée, en Chine et en Afrique tropicale humide (National Academy of Science, 1983). Son bois est utilisé pour la production de pâte à papier et les potentialités agroforestières de cette espèce sont nombreuses. Les prévisions de plantation dans les cinq prochaines années en Asie du Sud-Est font état de 600 000 hectares (Indonésie, Malaisie et Thaïlande). Dans ce contexte, un programme de recherche sur la symbiose *A. mangium*-rhizobium a été entrepris par le CIRAD-Forêt depuis plusieurs années. Ce programme auquel sont associés plusieurs partenaires travaillant outre-mer et le B.S.F.T. a pour but d'approfondir les connaissances sur cette association afin d'accroître la productivité de l'espèce par la voie symbiotique et son aptitude à fixer l'azote.

#### □ Caractérisation des souches d'*A. mangium*

Comme il n'existait aucune collection de souches de rhizobium d'*A. mangium* avant 1985, notre premier objectif a été d'isoler un nombre aussi important que possible de souches de rhizobium à partir de nodules racinaires d'*A. mangium* prélevés dans différentes régions du monde. *A. mangium* nodule spontanément dans son aire d'origine et dans les différentes localités où il a été introduit. Une centaine de souches ont été isolées par le B.S.F.T. à partir de nodules d'*A. mangium* récoltés dans l'aire d'origine de l'espèce au Nord-Queensland, en Australie (SOUVANNAVONG et CRÉMIERE, 1986) et dans d'autres régions du monde. Leur caractérisation a montré qu'elles appartenaient toutes au genre *Bradyrhizobium*. Ces différentes souches ont été testées pour évaluer leur infectivité (capacité à



former des nodules) et leur effectivité (aptitude à fixer l'azote) en conditions contrôlées, vis-à-vis d'*A. mangium* mais également d'autres espèces de Légumineuses pour établir leur spectre d'hôte. Ces travaux ont montré qu'*A. mangium* est une plante-hôte assez spécifique dans la mesure où ces différentes souches d'*A. mangium* montrent des effectivités variables selon leur origine, contrairement à d'autres espèces non spécifiques qui, comme *Acacia auriculiformis* (GALIANA, 1990) et *Acacia crassicarpa*, nodulent et fixent l'azote invariable-

ment avec toutes ces souches (GALIANA *et al.*, 1990). De plus, chez *A. mangium*, les souches originaires d'Australie présentent une effectivité toujours supérieure aux souches d'autres origines ou aux souches de collection isolées chez d'autres espèces.

Ces résultats nous ont amené à tester l'efficacité de ces différentes souches de rhizobium *in situ* dans le cadre d'essais d'inoculation au champ. Ces essais particulièrement suivis dans trois pays aux conditions écolo-

**TABLEAU II**  
Principaux résultats des essais d'inoculation d'*Acacia mangium* avec rhizobium mis en place sur le terrain par le CIRAD-Forêt

Localisation des essais	Surface de l'essai	Date de mise en place	Age des plants au moment de l'observation	Souches testées*	Désinfection du sol de pépinière	Hauteur (%/Témoin)	Surface terrière (%/Témoin)	Collecte de nodules pour identification des souches	
ILES COOK Turoa	590 m <sup>2</sup>	7/88	3 ans 3 mois	Aust13c	-	4 %	30 %	+	
				AG3	-	11 %	18 %	+	
				Te	-	-	-	+	
Hospital Hill	590 m <sup>2</sup>	7/88	3 ans 3 mois	Aust13c	-	37 %	129 %	+	
				AG3	-	16 %	40 %	+	
				Te	-	-	-	+	
BENIN	(pépinière)	3/89	3 mois	Aust13c	+/-	41 %	-	-	
				Aust11c	+/-	30 %	-	-	
				RMBY	+/-	14 %	-	-	
				AG3	+/-	1 %	-	-	
				PBG3	+/-	9 %	-	-	
				TAL72	+/-	- 6 %	-	-	
				CB756	+/-	- 6 %	-	-	
				Te	+/-	-	-	-	
	Sémé	1,56 ha	6/89	1 an 8 mois	Aust11c	-	28 %	-	-
					Aust11c	+	9 %	-	-
					Te	-	-	-	-
					Aust13c	+	5 %	-	-
					Te	+	-	-	-
CB756	+	- 9 %	-	-					
COTE-D'IVOIRE Anguédédou	1,07 ha	3/88	4 mois	Aust13c	+	99 %	-	+	
				TAL72	+	124 %	-	+	
				RMBY	+	106 %	-	+	
				AG3	+	82 %	-	+	
				Te	+	28 %	-	+	
				Te	-	-	-	+	
				Te	-	-	-	+	
			1 an 9 mois	Aust13c	+	4 %	24 %	+	
				TAL72	+	3 %	23 %	+	
				RMBY	+	8 %	12 %	+	
				AG3	+	- 5 %	15 %	+	
				Te	+	- 1 %	13 %	+	
				Te	-	-	-	+	
				Te	-	-	-	+	
Port-Bouët	0,78 ha	4/90	1 an 8 mois	Aust13c	+	13 %	20 %	+	
				CB756	+	- 4 %	- 1 %	+	
				Te	+	-	-	+	

D'après : CHERRIER, 1989 ; EHRHART, 1991 ; GALIANA, 1990 ; MALLET et GNAHOUA, 1989, MESSANT, 1989, 1990 ; MUZY, 1989.  
Souches testées\* : Te = Plants témoins non inoculés.

giques très différentes, la Côte-d'Ivoire, les Iles Cook et le Bénin, ont tous montré et confirmé la supériorité des souches de *Bradyrhizobium* d'origine australienne. L'inoculation des plants avec les souches Aust 13c et Aust 11c, réalisée au stade pépinière, a ainsi un effet positif très significatif sur la croissance des arbres, tant en hauteur qu'en circonférence (ou surface terrière) plusieurs années après leur transplantation au champ (cf. tableau II, p. 13). Notons que la concordance des résultats obtenus en serre, et même *in vitro* au laboratoire, avec ceux obtenus au champ est parfois spectaculaire. Cette cohérence est notamment illustrée par l'essai mis en place à Sémé au Bénin : le classement des sept souches de *Bradyrhizobium* en fonction de leur efficacité sur la hauteur des plants, le poids sec de parties aériennes, le nombre et le poids sec de nodules racinaires après trois mois de croissance des plants en pépinière, que le sol de pépinière ait été préalablement désinfecté ou non, est exactement le même que celui obtenu au laboratoire en conditions contrôlées ou en serre avec des plants cultivés sur milieu sans azote.

Pour mieux conforter la validité de ces essais d'inoculation au champ et l'effet positif de certaines souches sur la croissance des arbres, nous avons prélevé des nodules racinaires après transplantation des arbres inoculés pour étudier la survie des souches introduites et leur compétition avec les souches locales de rhizobium. Les premiers résultats sur l'identification des souches par des méthodes sérologiques montrent que les souches les plus performantes sont présentes dans 100 % des nodules récoltés plus de deux ans après transplantation des arbres inoculés.

#### □ Orientation des travaux sur la caractérisation et la biodiversité des souches de rhizobium d'*A. mangium*

La spécificité relative des souches de *Bradyrhizobium sp.* d'*A. mangium* d'origines australiennes évoquée plus haut nous conduit à l'étude de leur biodiversité d'origine. L'aire de répartition naturelle d'*A. mangium* s'étend du Nord-Queensland, dans le nord-est de l'Australie, à l'Irian Jaya et aux provinces Maluku en Indonésie en passant par le sud de la Papouasie-Nouvelle-Guinée (TURNBULL, 1986). Cette zone géographique est comprise entre 1° de latitude sud en Indonésie et 18° de latitude sud en Australie. Notre collection de souches de rhizobium d'*A. mangium* provenant de cette région est constituée par 80 isolats uniquement d'origine australienne mais recouvrant toutes les régions de provenances de l'espèce dans ce pays entre 12°45' et 18°35' de latitude sud, soit sur une distance de 750 km du nord au sud. L'étude de la diversité génétique de cette population d'origine nous permettra de définir le niveau de spécificité de ces souches vis-à-vis d'*A. mangium* en les comparant :

- à d'autres souches de même origine prélevées sur d'autres espèces de Légumineuses originaires d'Australie ;
- à des souches d'*A. mangium* isolées dans d'autres zones géographiques d'introduction de l'espèce à partir



*Acacia mangium* de vingt-et-un mois, en plantation à Port-Bouët, Côte-d'Ivoire.

*Twenty-one-month-old Acacia mangium in Port-Bouët (Côte-d'Ivoire).*

de la collection importante que nous avons constituée (Côte-d'Ivoire, Congo, Cameroun, Sénégal, Guyane, Malaisie et Chine) ;

- et à des souches de collection provenant d'autres espèces de Légumineuses d'origines diverses.

### RHIZOBIUM D'ACACIA DE ZONES SÈCHES

#### □ Nodulation et présence des rhizobiums d'acacia en zones sèches

Des populations importantes de rhizobiums peuvent exister en surface du sol et au niveau de la nappe phréatique, même si celle-ci se trouve à une profondeur relativement importante. Ainsi, dans la zone soudano-guinéenne, les densités de rhizobiums capables de noduler *Acacia albida* sont-elles élevées (jusqu'à 10<sup>4</sup> bactéries/g de sol) et proches de celles rencontrées en présence de légumineuses en zones tempérées. Dans la zone sahélienne, les populations présentes sont sensiblement plus

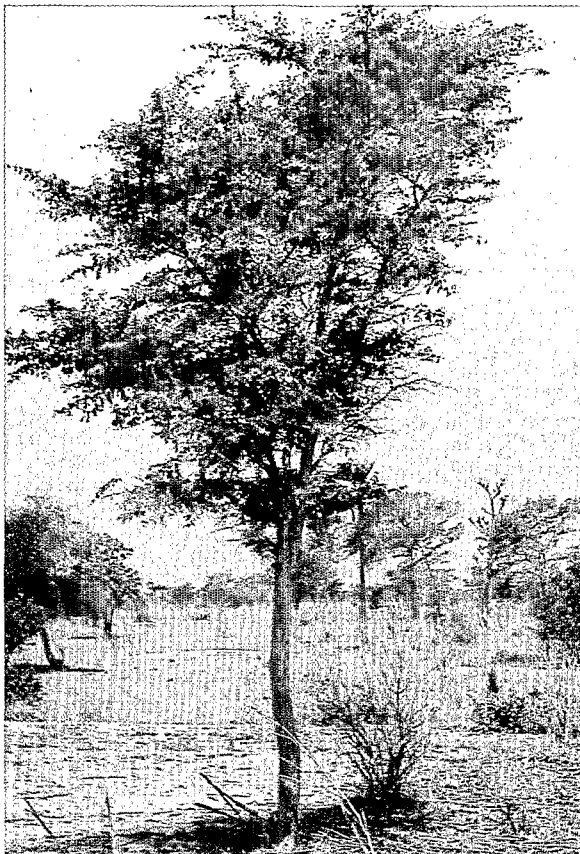


Photo E. DUHOUX

faibles ; dans cette zone, les populations les plus fortes ( $1,3 \cdot 10^3/g$  de sol) se trouvent au niveau de la nappe phréatique, à 34 mètres de profondeur (DUPUY et DREYFUS, 1992 ; DUPUY *et al.*, 1992, tableau III).

En revanche, dans ces zones sèches, il est rare d'observer des nodules sur les acacias adultes en milieu naturel. Des nodules ont pu être mis en évidence dans la zone soudano-guinéenne, sur des *Acacia albida* jeunes et adultes poussant dans des rizières en Casamance, avec une nappe phréatique proche de la surface (DUPUY et DREYFUS, 1992). Dans les zones plus sèches nous n'avons observé de nodules qu'au cours des années présentant une pluviométrie importante.

Ces observations suggèrent de nouveau plusieurs interrogations :

- Quels sont les facteurs (climatiques, édaphiques,...) contrôlant la nodulation des acacias dans la zone sahélienne ?
- Les fortes populations de rhizobiums mises en évidence au niveau de la nappe phréatique permettent-elles une nodulation (et une fixation d'azote) en profondeur ?
- Quel est l'impact sur la nodulation de la diversité observée au niveau des souches de rhizobium ?

**Jeune *Faidherbia albida* en saison sèche au Sénégal  
(région de Kaolack).**

*Young Faidherbia albida in Senegal (Kaolack area) in dry season.*

**TABLEAU III**  
**Distribution des populations de *Bradyrhizobium* dans quatre profils de sol sous le couvert d'un *Acacia albida* de la surface jusqu'à la nappe d'eau**

Zone écoclimatique sahélienne (de 100 à 500 mm de pluies annuelles)				Zone écoclimatique soudano-guinéenne (de 1 000 à 1 500 mm de pluies annuelles)			
LOUGA		DIKOUL		DJINAKI		KABROUSSE	
Profondeur (m)	Nombre de rhizobiums par g de sol	Profondeur (m)	Nombre de rhizobiums par g de sol	Profondeur (m)	Nombre de rhizobiums par g de sol	Profondeur (m)	Nombre de rhizobiums par g de sol
0,0	70	0,0	< 1	0,0	13 000	0,0	230
0,5	1 270	0,5	20	0,5	32 000	0,5	42 000
2,5	90	2,5	20	1,0	28 000	1,0	2 300
5,0	160	4,0	50	1,5	28 000	1,5*	9 180
7,5	< 1	6,0	< 1	2,0	43 000		
11,0	< 1	8,0	< 1	3,0	42 400		
14,0	< 1	10,0	< 1	4,0	1 500		
17,5	90	11,5	30	4,5*	1 500		
21,0	< 1	14,0	80				
24,0	40	16,5*	30				
27,5	10						
28,5	120						
30,0	20						
32,0	20						
33,5	340						
34,0*	1 320						

D'après DUPUY and DREYFUS, 1992.

\* Niveau de la nappe d'eau.

## □ Diversité des rhizobiums d'acacia de zones sèches

Les études récentes sur les rhizobiums associés aux acacias de la zone sahélienne ont confirmé les observations de DREYFUS et DOMMARGUES (1981) ; elles ont mis en évidence, de plus, une grande diversité, aussi bien parmi les souches à croissance rapide (*Rhizobium*) que parmi celles à croissance lente (*Bradyrhizobium*).

En analysant 97 souches isolées d'arbres (dont 42 d'*Acacia senegal* du Soudan) par l'analyse numérique de 115 caractères phénotypiques, ZHANG *et al.* (1991) ont ainsi pu séparer ces isolats en 19 groupes différents.

Au laboratoire de Microbiologie de l'ORSTOM/ISRA à Dakar, nous avons étudié la position taxonomique de *Rhizobium* isolés de plusieurs acacias de la zone sahélienne (notamment *A. senegal*, *A. raddiana*, *A. seyal*) par une approche polyphasique : profils électrophorétiques des protéines cellulaires totales (SDS-PAGE), hybridations ADN/ADN et ARNr/ADN, capacité d'assimilation de plusieurs substrats carbonés, contenu plasmidique, séquençage de l'ARNr 16S, spectre d'hôte. Nous avons pu montrer (de LAJUDIE *et al.*, 1992a et b, 1993) que ces isolats appartiennent à deux groupes nettement distincts, l'un proche de *Rhizobium meliloti*, l'autre proche de *R. loti*. De plus ces groupes ne présentent pas la même spécificité d'hôte : l'un est constitué uniquement de souches isolées d'*Acacia*, l'autre comprend des souches d'*Acacia* mais aussi de *Sesbania rostrata* (il est intéressant de noter que ces deux genres, *Acacia* et *Sesbania*, bien que nodulés par les mêmes rhizobiums, appartiennent à deux sous-familles de Légumineuses différentes, Mimosacées et Papilionacées).

La diversité des rhizobiums à croissance lente isolés de nodules d'*Acacia albida* est également importante : les isolats que nous avons obtenus de différents sols du Sénégal se répartissent par électrophorèse des protéines cellulaires totales dans trois des cinq sous-groupes que comporte actuellement le grand groupe des *Bradyrhizobium* (DUPUY *et al.*, 1992 ; GILLIS *et al.*, 1992).

Cette diversité observée pose un certain nombre de questions, tant sur la compréhension du fonctionnement de ces symbioses arbres-rhizobiums en milieu sahélien que sur les interventions possibles pour améliorer leur fonctionnement, en particulier :

- Ces différents groupes de rhizobiums coexistent-ils sur les mêmes sites ?
- Présentent-ils des différences d'adaptation à l'environnement ?
- Répondent-ils pareillement aux modifications des conditions de leur environnement ?
- Leur potentiel fixateur d'azote est-il le même ?
- Quelle(s) souche(s) de quel groupe sélectionner pour une éventuelle inoculation ?

## CONCLUSION

Les objectifs d'une étude sur la biodiversité des rhizobiums sont peu différents de ceux définis chez les végétaux supérieurs, surtout lorsque le matériel biologique analysé n'a pas été modifié génétiquement et que les populations sauvages sont encore en place dans leurs aires d'origine. L'analyse descriptive de ces populations de base, qui fait souvent appel aux mêmes techniques chez les deux types d'organismes (isoenzymes, RFLP...), permet de caractériser leur structure génétique. Dans les deux cas, la connaissance de cette base génétique de départ et de sa diversité permettra d'orienter les stratégies d'amélioration génétique à entreprendre. De même, l'analyse de la biodiversité permet de différencier et de classer (taxonomie) les ressources génétiques disponibles dans un but de conservation. Chez les rhizobiums mais également chez d'autres micro-organismes du sol, ce besoin s'est déjà concrétisé par la constitution de banques internationales conservant une collection considérable de souches, comme le réseau MIRCEN (*Microbial Resource Center*) placé sous l'égide de l'UNESCO qui coordonne les activités d'une vingtaine de centres à travers le monde (NIFTAL, USDA, CAB, ...). La conservation des micro-organismes symbiotiques associés aux arbres tropicaux, en particulier, constitue une des propositions faites par l'ACIAR dans le plan stratégique du CIFOR. Il est ainsi fortement recommandé d'associer les récoltes prospectives de graines à celles de leurs symbiotes racinaires. Cette volonté a déjà été mise en pratique depuis plusieurs années par certains organismes de recherche nationaux comme le CSIRO (Division of Forestry) en Australie ou l'ISRA.

Quel que soit le niveau de caractérisation recherché (estimation de la biodiversité ou caractérisation taxonomique complète), il est indispensable, si l'on veut maîtriser les outils biotechnologiques que sont les bactéries, d'être en mesure d'identifier de manière fiable et rapide les souches les unes par rapport aux autres.

Au niveau de la foresterie tropicale, l'essor récent des Légumineuses forestières tant en plantations industrielles (production de pâte à papier) qu'en agroforesterie, dans des zones souvent peu fertiles, renforce la nécessité de maîtriser l'utilisation des bactéries fixatrices d'azote associées à ces essences. Il est en particulier primordial, lors d'expériences d'inoculation au champ, d'être capable d'estimer précisément l'impact de ces pratiques sur la plante et son environnement. ■

## REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier le Dr. Y. R. DOMMARGUES pour ses suggestions enrichissantes.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AHMAD (M. H.), EAGLESHAM (A. R. J.), HASSOUNA (S.), SEAMAN (B.), AYANABA (A.), MULONGOY (K.), PULVER (E. L.), 1981 a. — Examining the potential for inoculant use of cowpeas in West African soils. *Tropic. Agron. (Trin.)*, 58 : 325-335.
- AHMAD (M. H.), EAGLESHAM (A. R. J.), HASSOUNA (S.), 1981 b. — Examining serological diversity of cowpea rhizobia by the ELISA technique. *Arch. Microbiol.*, 130 : 281-287.
- BALLY (R.), SIMONET (P.), HAURAT (J.) and NORMAND (P.), 1992. — Characterization of *Azospirillum irakense* and *Azospirillum lipoferum* by direct sequencing of a PCR amplified 16S rRNA gene. *Symbiosis*, 13 : 47-53.
- BRUNCK (F.), COLONNA (J.-P.), DUCOUSO (M.), GALIANA (A.), PRIN (Y.), SOUGOUFARA (B.), DOMMERMUES (Y. R.), 1990. — La maîtrise de l'inoculation des arbres avec leurs symbiotes racinaires : synthèse d'une sélection d'essais mis en place en Afrique francophone. *Bois et Forêts des Tropiques*, 223 : 24-42.
- CHARTIER (A.), 1991. — Glossaire de génétique moléculaire et génie génétique. Ed. INRA, Paris, 47 p.
- CHEN (W. X.), YAN (G. H.), and LI (J. L.), 1988. — Numerical taxonomy study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium gen. nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38 : 392-397.
- CHEN (W. X.), LI (G. S.), QI (Y. L.), WANG (E. T.), YUAN (H. L.) and LI (J. L.), 1991. — *Rhizobium huakuii sp. nov.* isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41 : 275-280.
- CHERRIER (J.-F.), 1989. — Rapport de mission dans l'archipel des Iles Cook. Centre Technique Forestier Tropical, 71 p.
- CLEYET-MAREL (J.-C.) et CROZAT (Y.), 1982. — Etude écologique en immunofluorescence de *Rhizobium japonicum* dans le sol et la rhizosphère. *Agronomie* 2, 243-248.
- DATE (R. A.), HALLIDAY (J.), 1980. — Relationships between rhizobium and tropical forage legumes. In *Advances in legume science*. Eds. Summerfield R.J., Bunting A.H., Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 597-601.
- DREYFUS (B. L.), DOMMERMUES (Y. R.), 1981. — Nodulation of *Acacia* species by fast- and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 : 97-99.
- DREYFUS (B.), GARCIA (J. L.) 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. Bacteriol.*, 38 : 89-98.
- DUHOUX (E.) et DOMMERMUES (Y.), 1985. — The use of nitrogen-fixing trees in forest and soil restoration in the tropics. In *Biological Nitrogen Fixation in Africa* (Proceedings of the First Conference of the African Association for Biological Nitrogen Fixation). Eds Ssali H., and Keya S.O., MIRCEN, Nairobi, pp. 384-400.
- DUPUY (N. C.) and DREYFUS (B. L.), 1992. — *Bradyrhizobium* populations occur in deep soil under the leguminous tree *Acacia albida*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 : 2415-2419.
- DUPUY (N.), LORQUIN (J.), NDIAYE (S.), ALAZARD (D.), GILLIS (M.) and DREYFUS (B.), 1992. — Les *Bradyrhizobium* d'*Acacia albida* et d'*Aeschynomene sp.* : bactéries photosynthétiques et non photosynthétiques. In IFS (ed.) *Interactions Plantes Microorganismes*. Stockholm, Suède, pp. 371-381.
- EHRHART (Y.), 1991. — Maintien de l'environnement et production de bois dans le Pacifique Sud. Rapport semestriel d'activité. Rapport multigraphié CTFT, 104 p.
- ELKAN (G. H.), 1992. — Taxonomy of the rhizobia. *Can. J. Microbiol.* 38 : 446-450.
- FERNANDEZ-FLOURET (D.) et CLEYET-MAREL (J.-C.), 1987. — Identification par test ELISA de souches de *Bradyrhizobium japonicum* en culture et dans les nodosités de soja (*Glycine max* (L.) Merr.). *C. R. Acad. Agric. Fr.*, 73, n° 1, pp. 163-171.
- FRED (E. B.), BALDWIN (I. L.) and MCCOY (E.), 1932. — Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Press, Madison, Wis. (in : Elkan 1992).
- GALIANA (A.), CHAUMONT (J.), DIEM (H. G.), DOMMERMUES (Y. R.), 1990 b. — Nitrogen fixation potential of *Acacia mangium* and *Acacia auriculiformis* seedlings inoculated with *Bradyrhizobium* and *Rhizobium spp.* *Biol. Fertil. Soils*, 9 : 261-267.
- GALIANA (A.), 1990. — La symbiose *Acacia mangium*-rhizobium. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), 246 p.
- GARDES (M.), BOUSQUET (J.) and LALONDE (M.), 1987. — Isozyme variation among 40 *Frankia* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 : 1596-1603.
- GILLIS (M.), POT (B.), MOREIRA (F.), DUPUY (N.), DREYFUS (B. L.), MAESTROJUAN (G.) and KERSTER (K.), 1992. — Grouping of bradyrhizobia from diverse origins by SDS-PAGE and phenotypic studies. Conference on Taxonomy and Automated Identification of bacteria. FEMS Symposium, July 20-24, Prague, Tchécoslovaquie.
- GOULLET (P.), 1980. — Esterase electrophoretic pattern relatedness between *Shigella* species and *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 117 : 493-500.
- GRAHAM (P. H.), 1964. — The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. *J. Gen. Microbiol.*, 35 : 511-517.
- GRAHAM (P. H.), SADOWSKY (M. J.), KEYSER (H. H.), BARNET (Y. M.), BRADLEY (R. S.), COOPER (J. E.), DE LEY (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 : 582-587.
- GUNN (B. V.) and MIDGLEY (S. J.), 1991. — Exploring and accessing the genetic resources of four selected tropical acacias. in : *Advances in Tropical Acacia Research*. Turnbull J.W. ed. ACIAR Canberra, pp. 57-63.

- HENNECKE (H.), KALUZA (K.), THÖNY (B.), FÜHRMANN (M.), LUDWIG (W.) and STACKEBRANDT (E.), 1985. — Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen fixing bacteria. Arch. Microbiol., 142 : 342-348.
- 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 assignement to *Rhizobium fredii*. Int. J. Syst. Bacteriol. 42 : 93-96.
- JORDAN (D. C.), 1982. — Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium gen. nov.*, a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. Int. J. Syst. Bacteriol., 32 : 136-139.
- JORDAN (D. C.), 1984. — Rhizobiaceae, p. 234-245. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. The Williams & Wilkins, Co., Baltimore.
- KINKLE (B. K.) and SCHMIDT (E. L.), 1992. — Stability of a monoclonal antibody determinant in soil populations of *Bradyrhizobium japonicum*. Soil Biol. Biochem., 24 : 819-820.
- 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 elkani* sp. nov. Can. J. Microbiol., 38 : 501-505.
- de LAJUDIE (P.), LORTET (G.), NEYRA (M.), BADJI (S.), NDOYE (I.), BOIVIN (C.), GILLIS (M.) and DREYFUS (B. L.), 1992a. — Etude taxonomique des *Rhizobium* d'*Acacia* et de *Sesbania*. In : IFS (ed.) Interactions Plantes Microorganismes. Stockholm, Suède, pp. 238-245.
- de LAJUDIE (P.), WILLEMS (A.), BOIVIN (C.), LORTET (G.), NEYRA (M.), POT (B.), DREYFUS (B. L.) and GILLIS (M.), 1992b. — Three novel *Rhizobium* groups nodulating *Acacia* and *Sesbania* species. In Abstracts of the 6th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. July 11-16, 1992, Seattle, USA.
- DE LAJUDIE (P.), NEYRA (M.), DUPUY (N.), ALAZARD (D.) et GILLIS (M.), 1993. — Diversité des *Rhizobium*, spécificité de nodulation et aptitude à fixer l'azote chez les acacias sahéliens, pp. 257-262. in John Libbey Eurotext (éd.), Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides. Groupe d'Etudes de l'Arbre. Paris. France.
- LAWRENCE (E.), 1990. — Henderson's dictionary of biological terms, 10th edition. Longman Scientific & Technical, Harlow, UK, 637 pp.
- LIE (T. A.), GÖTKAN (D.), ENGIN (M.), Pijnenborg (J.) AND ANLARSAL (E.), 1987. — Co-evolution of the legume-Rhizobium association. Plant Soil, 100 : 171-181.
- LINDSTRÖM (K.), 1989. — *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol., 39 : 365-367.
- LÖHNIS (F.) and HANSEN (R.), 1921. — Nodule bacteria of leguminous plants. J. Agr. Res. 20 : 543-546.
- MAGGIA (L.), 1991. — Thèse de Doctorat, Université Paris VII, Paris.
- MALLET (B.), GNAHOVA (G.), 1989. — Etude comparative de l'effet d'inoculation de différentes souches de rhizobium sur diverses provenances d'*A. mangium* et *A. auriculiformis* en pépinière et plantation. Rapport multigraphié CTFT-Côte d'Ivoire, 20 p.
- MARTINEZ-ROMERO (E.), SEGOVIA (L.), MERCANTE (F. M.), 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.
- MESSANT (D.), 1989. — Projet plantation bois de feu au Sud-Bénin, campagne 1989. Essai d'inoculation sur *Acacia mangium*. Rapport multigraphié, Unité de recherches forestières, Cotonou, Bénin, 25 p.
- MESSANT (D.), 1991. — Rapport annuel campagne 1990. Rapport multigraphié, Unité de recherches forestières, Cotonou, Bénin, 25 p.
- MUZY (M.), 1989. — Rapport final d'activités aux Iles Cook. Rapport multigraphié CTFT, Rarotonga, Iles Cook.
- MYTTON (L. R.), MCADAM (N. J.) and PORTLOCK (P.), 1978. — Enzyme polymorphism as an aid to identification of *Rhizobium* strains. Soil Biol. Biochem. 10 : 79-80.
- National Academy of Sciences, 1983. In *Mangium* and other fast-growing Acacias for the humid tropics. U.S. National Academy Press, Washington, DC, pp. 18-19.
- PICARD (C.), PONSONNET (C.), PAGET (E.), NESME (X.) and SIMONET (P.), 1992. — Detection of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 2717-2722.
- PRIN (Y.), MAGGIA (L.), DIEM (H. G.), PICARD (B.) and GOULLET (P.), 1991. — Electrophoretic comparison of enzymes from 22 single-spore cultures of *Frankia* strain ORS140102. FEMS Microbiol. Lett. 77 : 223-228.
- SAIKI (R. K.), GELFAND (D. H.), Stoffel (S.), Scharf (S. J.), Higuchi (R.), HORN (G. T.), MULLIS (K. B.) and ERLICH (H. A.), 1988. — Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239 : 487-491.
- SCHWENCKE (J.), 1991. — Rapid, exponential growth and increased biomass yield of some *Frankia* strains in buffered and stirred mineral medium (BAP) with phosphatidylcholine. Plant Soil 137 : 37-41.
- SCHWINGHAMER (E. A.) and DUDMAN (W. F.), 1980. — Methods for identifying strains of diazotrophs. In Bergersen F.J. (ed.) Methods for evaluating biological nitrogen fixation. John Wiley & Sons, Chichester. pp. 337-365.
- SELANDER (R. K.), CAUGANT (D. A.), OCHMAN (H.), MUSSER (J. M.), GILMOUR (M. N.) and WHITTMAN (T. S.), 1986. — Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl. Environ. Microbiol. 51 : 873-884.
- SIMONET (P.), NORMAND (P.), MOIROUD (A.) and BARDIN (R.), 1990. — Identification of *Frankia* strains in nodules by hybridization of polymerase chain reaction products with strain-specific oligonucleotide probes. Arch. Microbiol. 153 : 235-240.

- SOUVANNAVONG (O.), CRÉMIERE (L.), 1986. — Récolte de provenances d'acacias dans le nord du Queensland (Australie). Rapport interne, Centre Technique Foréster Tropical.
- TRINICK (M. J.), 1980. — Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. J. Appl. Bacteriol., 49 : 39-53.
- TRÜPER (H. G.), 1992. — Prokaryotes : an overview with respect to biodiversity and environmental importance. Biodiv. and Conserv. 1 : 227-236.
- TURK (D.) and KEYSER (H. H.), 1992. — Rhizobia that nodulate tree legumes : specificity of the host for nodulation and effectiveness. Can J. Microbiol., 38 : 451-460.
- TURNBULL (J. W.) (Ed.), 1986. — Multipurpose Australian trees and shrubs. ACIAR monograph No. 1, Australian Center for International Agricultural Research, Canberra.
- UDARBE (M. P.), HEPBURN (A. J.), 1987. — Development of *Acacia mangium* as a plantation species in Sabah. In ACIAR Proceedings No. 16. Ed. Turnbull J.W., pp. 157-159.
- VELEZ (D.), MACMILLAN (J. D.) and MILLER (L.), 1988. — Production and use of monoclonal antibodies for identification of *Bradyrhizobium japonicum* strains. Can. J. Microbiol. 34 : 88-92.
- 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 TRÜPER (H. G.), 1987. — Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int. J. System. Bact. 37 : 463-464.
- 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 Res. 18 : 6531-6535.
- WILSON (J. K.), 1944. — Over five hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of legumes. Soil Sci. 58 : 61-69.
- YOUNG (J. P. W.), 1989. — The population genetics of bacteria. In D.A. Hopwood and K.F. Chater (ed.), Genetics of Bacterial Diversity. Academic Press, London, pp. 417-438.
- YOUNG (J. P. W.), 1992. — Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans (ed.), Biological Nitrogen Fixation. Chapman & Hall, Inc. New York, pp. 43-86.
- ZHANG (X.), HARPER (R.), KARSISTO (M.), and LINDSTRÖM (K.), 1991. — Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. Int. J. Syst. Bacteriol. 41 : 104-113.

## DEUX THÈSES RÉCENTES ÉDITÉES PAR LE CIRAD-Forêt EN BIOTECHNOLOGIE

### La symbiose fixatrice d'azote chez *Acacia mangium-Rhizobium*

GALIANA A.-246 p., 21 x 29,7 cm  
(fig., tab., photos) - 1991.  
Prix France : 250,00 F TTC  
Etranger : 280,00 F TTC

L'aptitude d'*Acacia mangium* à fixer l'azote peut être accrue de façon très significative si l'on sait exploiter la variabilité génétique de la plante-hôte et celle de sa bactérie symbiotique.

Cet ouvrage rassemble les résultats d'une étude de souches de *Bradyrhizobium* isolées dans l'aire d'origine d'*Acacia mangium* (Australie), et dans diverses zones d'introduction de l'espèce, puis étudiées en laboratoire et au champ (Bénin, Iles Cook, Côte-d'Ivoire).

Le travail sur la plante-hôte est fondé sur la sélection précoce de clones en fonction de leur potentiel fixateur d'azote. Plusieurs clones ont pu être sélectionnés et multipliés après la mise au point d'une méthode de micropropagation *in vitro* conforme d'*A. mangium*.

### Importance des symbioses racinaires pour l'utilisation des acacias de l'Afrique de l'Ouest

Ducouso M.-205 p., 21 x 29,7 cm  
(fig., tab., photos) - 1991.  
Prix France : 250,00 F TTC  
Etranger : 280,00 F TTC

Cette étude présente les principaux systèmes symbiotiques et leur importance relative au Sénégal et en Guinée. Un soucier de *Rhizobium s.l.* et une mycothèque, créés à cette occasion, ont été utilisés afin de déterminer expérimentalement les types mycorhiziens dans le genre *Acacia s.l.* et l'influence de l'azote et du phosphore sur la symbiose quadripartite *Acacia holosericea-Bradyrhizobium sp.-Glomus mosseae-Pisolithus sp.* Les relations entre une bactérie fixatrice d'azote et un champignon ectomycorhizien ont été observées *in vitro* en coculture.

Renseignements et commandes :

Services Publications du CIRAD-Forêt

45 bis, avenue de la Belle Gabrielle 94736 NOGENT-SUR-MARNE CEDEX (France)  
Tél. : (1) 43 94 43 00 — Télécopie : (1) 43 94 43 81 — Télex : CEFETO 264653 F

## RHIZOBIA NODULATING ACACIAS

### Biodiversity and taxonomy

Y. PRIN, A. GALIANA, M. DUCOUSSO, N. DUPUY, Ph. de LAJUDIE and M. NEYRA

The microbial world has its very own problems concerning the study of biodiversity and taxonomy. Bacteria differ from typical higher eucaryotes in many relevant ways. Among these, the range of mechanisms for genetic exchange and rearrangement, which include conjugation, transduction and transformation, plasmids, phages and transposable elements, are the most controversial in the studies of genetic diversity.

When studying biodiversity, one is trying to differentiate bacterial strains from each other in a population. Such studies make it possible to evaluate the richness of one site in bacterial strains, to point out the need for isolation of new strains, to follow one introduced strain among this population, etc. Taxonomy is trying to describe as precisely as possible one given strain to determine if it can be considered as a known taxon or not. Describing a new taxon is the final step of a complex and strictly defined sum of characterization experiments, generally called polyphasic analysis.

Nitrogen-fixing leguminous trees like acacias are being planted on a wide scale in the arid and wet tropics to provide fuelwood, pulp, construction materials, fodder and nitrogen-rich biomass for improving soil fertility. In most cases, exotic species are being planted as they have been shown to outperform indigenous taxa in terms of vigor.

Biological nitrogen fixation which is an essential attribute of the productivity of these legume trees is largely dependant on the associated bacterial symbiont: rhizobium. Numerous laboratory and field experiments have shown that proper inoculation of the plantlets with the adequate rhizobial strain can induce a substantial increase of growth, wood and foliage production.

All bacterial strains being not equally compatible, infective and effective with any host-plant there is thus a need for being able to identify and differentiate rhizobia from each other. These problems of bacterial strain identification are related to both biodiversity and taxonomy.

The Laboratoire de Microbiologie (ORSTOM/ISRA) in Dakar, Senegal, is interested in rhizobia nodulating Sahelian acacias. A high diversity has been observed among these rhizobia and the taxonomic position of some strains nodulating *Acacia senegal*, *A. raddiana* and *A. seyal* has been defined. Numerous studies are underway to understand the relationships between this diversity and the environmental conditions.

In the Laboratoire de Biotechnologie des Symbioses Forestières Tropicales (CIRAD-Forêt/ORSTOM) in Nogent, studies are focussed on the diversity of rhizobia nodulating wet tropics acacias, mainly *A. mangium*. These studies are conducted to assess the diversity of these rhizobia in the zones where *A. mangium* is native compared to those where it has been introduced, to evaluate the need for isolating new strains, to follow an introduced rhizobial strain and evaluate its competitiveness towards local nodulating strains in field inoculation experiments.