

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE VEGETALE



THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES

Spécialité : BIOLOGIE VEGETALE

Option : MICROBIOLOGIE – PHYSIOLOGIE VEGETALE

Sur le sujet :

**SYMBIOSE FIXATRICE D'AZOTE *ACACIA SEYAL* DEL. – RHIZOBIUM :
PERSPECTIVES POUR LE REBOISEMENT DES TERRES DES BASSES VALLEES
DU SINE ET DU SALOUM (SENEGAL) AFFECTEES PAR LA SALINITE**

Présentée et soutenue publiquement le 22 Décembre 2010

Par

Diégane DIOUF

Devant le jury composé de :

Président :	Pr. Ibrahima NDOYE	Professeur Titulaire	UCAD	Président
Membres :	Pr. Kandioura NOBA	Professeur Titulaire	UCAD	Rapporteur
	Pr. Amadou Moustapha BA	Professeur Titulaire	UAG (France)	Rapporteur
	Pr. Amadou Tidiane BA	Professeur Titulaire	UCAD	Examineur
	Dr. Bernard DREYFUS	Directeur de Recherches	IRD (France)	Examineur
	Pr. El Hadji Samba N. SYLLA	Professeur Titulaire	UCAD	Examineur

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES -----	I
LISTE DES ACRONYMES ET ABREVIATIONS -----	VI
RESUME -----	VIII
ABSTRACT -----	IX
REMERCIEMENTS -----	X
DEDICACES -----	XII
LISTE DES TABLEAUX -----	XIII
LISTE DES FIGURES -----	XIV
PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE -----	XVI
Liste des articles acceptés ou en préparation -----	XVI
Colloques édités -----	XVI
Résumés de communications à des congrès scientifiques internationaux -----	XVI
INTRODUCTION GENERALE -----	1
PROBLEME DE RECHERCHE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE -----	9
Définition du problème de recherche -----	9
Hypothèses et Objectifs de recherche -----	10
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE -----	13
1. Fixation biologique de l'azote : Généralités -----	13
1.1. Importance de l'azote dans la nutrition des plantes -----	13
3.2. Généralités sur la fixation biologique d'azote -----	14
2. La symbiose fixatrice d'azote Légumineuse–rhizobium -----	17
3.3. Origine et apparition de la symbiose fixatrice d'azote -----	17
3.4. Evolution des symbioses fixatrices d'azote -----	18
3. Les partenaires symbiotiques -----	19
3.5. Les légumineuses -----	19
3.1.1. Evolution des légumineuses -----	19
3.1.2. Diversité des légumineuses -----	20
3.6. Les rhizobiums -----	21
3.1.3. Taxonomie des rhizobiums -----	21
3.1.3.1. Les différentes approches taxonomiques -----	21
3.1.3.2. Taxonomie phénotypique -----	21
3.1.3.3. Taxonomie numérique -----	22
3.1.3.4. Taxonomie moléculaire -----	23
Détermination du pourcentage guanine + cytosine (% G + C) -----	23
Hybridations d'acides nucléiques -----	24
Séquençage -----	25
Technologie des puces à ADN -----	25
3.1.4. Techniques de classification des micro-organismes -----	26
3.1.5. Diversité génétique des espèces de Rhizobium -----	28
3.2.4. Evolution de la phylogénie microbienne -----	32
3.6.4.1. Gènes ribosomiaux -----	34
3.6.4.2. Gènes chromosomaux -----	35
3.6.4.3. Gènes plasmidiques -----	35
4. Diversité génétique des rhizobiums d'Acacia -----	37

5.	Etablissement de la symbiose fixatrice d'azote Légumineuse-Rhizobium -----	38
5.1.	Dialogue Moléculaire-----	38
5.1.1.	Gènes symbiotiques rhizobiens -----	39
5.1.1.1.	Gènes de nodulation-----	40
5.1.1.1.1.	Gènes nod communs-----	40
5.1.1.1.2.	Gènes spécifiques -----	41
5.1.1.1.3.	Gènes régulateurs nodD-----	41
5.1.1.2.	Gènes de fixation de l'azote-----	42
5.1.2.	Flavonoïdes inducteurs de la symbiose des Acacia -----	43
5.2.	La spécificité d'hôte-----	44
5.3.	Coévolution en symbiose légumineuses-rhizobium -----	45
5.4.	Mécanismes d'infection et de nodulation -----	47
5.4.1.	Mécanismes d'infection-----	47
5.4.2.	Formation du nodule -----	48
6.	La nodulation des <i>Acacia</i> spp. -----	49
7.	Mécanisme de fixation de l'azote atmosphérique-----	50
8.	Importance de la fixation symbiotique de l'azote -----	50
9.	Contraintes environnementales de la fixation biologique de l'azote-----	52
10.	Influence de facteurs environnementaux sur la symbiose Acacia-rhizobium -----	52
11.	Mécanismes d'adaptation des bactéries aux stress osmotiques -----	54
12.	Présentation d' <i>Acacia seyal</i> Delile -----	56
12.1.	Taxonomie -----	56
12.2.	Description botanique-----	57
12.3.	Aire de répartition géographique et écologie-----	59
12.4.	Phénologie -----	60
12.5.	Importance de l'espèce -----	60
CHAPITRE I : DIVERSITE GENETIQUE DES RHIZOBIUMS AUTOCHTONES DES SOLS DES BASSES VALLEES DU SINE ET DU SALOUM ASSOCIES A <i>A. SEYAL</i> -----		63
I.	Introduction -----	63
Matériel et méthodes-----		66
1.	Echantillonnage de sols -----	66
2.	Piégeage des rhizobiums -----	68
3.	Caractérisation moléculaire de la diversité génétique des souches de rhizobium associées à <i>A. seyal</i> -----	69
3.1.	Traitement des nodules et extraction de l'ADN -----	69
3.2.	Isolement, croissance et conditions de culture des souches des rhizobiums -----	70
3.3.	Analyse du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP) de l'IGS 16S-23S ADNr des souches de rhizobiums-----	71
4.	Caractérisation phylogénétique des souches de rhizobium associées à <i>A. seyal</i> -----	72
4.1.	Séquençage de l'ADNr 16S -----	72
4.2.	Séquençage de l'ADNr 16S-23S -----	73
5.	Infectivité et effectivité <i>in vitro</i> des souches de rhizobiums associées à <i>A. seyal</i> -----	74
Résultats -----		76
1.	Avant propos -----	76
2.	Piégeage des rhizobiums -----	77
3.	Analyse du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP) de l'IGS 16S-23S de l'ADNr-----	81

4. Caractérisation phylogénétique des souches de rhizobium associées à <i>A. seyal</i> -----	84
4.1. Séquençage de l'ADNr 16S-----	84
4.2. Séquençage de l'ADNr 16S-23S -----	86
5. Infectivité et effectivité des souches de rhizobium sur <i>A. seyal</i> -----	88
Discussion-----	91
CHAPITRE II : ANALYSE PHYLOGENETIQUE DES GENES SYMBIOTIQUES ET CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES SOUCHES DE MESORHIZOBIUM SP. ASSOCIEES A A. SEYAL DEL. -----	95
Introduction-----	95
Matériel et méthodes-----	98
1. Souches bactériennes et leurs conditions de culture-----	98
2. Propriétés phénotypiques des souches de <i>Mesorhizobium</i> sp.-----	98
3. Recherche de gènes codant pour le système un transport de type BCCT parmi des souches de <i>Mesorhizobium</i> sp. -----	99
3.1. Définition des amorces -----	99
3.2. Amplification par PCR -----	100
3.3. Séquençage de gènes codant pour le système de transport de type BCCT-----	100
4. Cultures des plants-----	101
4.1. Spectre d'hôte des souches de <i>Mesorhizobium</i> sp. -----	101
4.2. Infectivité et effectivité en pépinière des souches de <i>Mesorhizobium</i> sp. vis-à-vis d' <i>A. seyal</i> -----	102
5. Analyse moléculaire des séquences des gènes symbiotiques-----	103
Résultats-----	105
1. Avant propos-----	105
2. Propriétés phénotypiques des souches de <i>Mesorhizobium</i> sp.-----	106
3. Recherche de gènes codant pour le système un transport de type BCCT parmi des souches de <i>Mesorhizobium</i> sp. -----	108
4. Spectre d'hôte des isolats de rhizobium d' <i>A. seyal</i> -----	110
5. Infectivité et effectivité en pépinière des souches de <i>Mesorhizobium</i> sp. vis-à-vis d' <i>A. seyal</i> -----	112
6. Analyse moléculaire des séquences de gènes symbiotiques des souches de <i>Mesorhizobium</i> sp. d' <i>A. seyal</i> -----	114
Discussion-----	119
CHAPITRE III : INFLUENCE DES CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES SUR LA DIVERSITE FONCTIONNELLE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DES SOLS-----	123
Introduction-----	123
Matériel et méthodes-----	125
1. Echantillonnage et analyse des sols-----	125
2. Estimation du nombre de rhizobiums nodulant <i>A. seyal</i> -----	125
3. Détermination de la biomasse microbienne totale-----	126
4. Minéralisation de l'azote -----	126
5. Diversité fonctionnelle des communautés microbiennes des sols-----	126
6. Analyse statistique-----	127
Résultats-----	128
1. Avant propos-----	128
2. Analyse des caractéristiques physiques et chimiques des sols -----	129
3. Evaluation de la biomasse racinaire et de la nodulation in situ -----	130

4.	Estimation du nombre de rhizobiums nodulant <i>A. seyal</i> et de la biomasse microbienne	132
5.	Variation spatiale de la minéralisation de l'azote-----	132
6.	Analyse en composante principale des effets combinés des caractéristiques chimiques des sols sur leur fonctionnement microbien-----	133
7.	Diversité fonctionnelle des communautés microbiennes des sols-----	134
	Discussion-----	137
1.	Analyse des effets combinés des caractéristiques physico-chimiques des sols sur leur fonctionnement microbien et biologique -----	137
2.	Analyse de la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes des sols -----	138
CHAPITRE IV : REPONSES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DES PLANTS D'ACACIA SEYAL DEL. SOUS CONTRAINTE SALINE -----		
	Introduction -----	141
	Matériel et méthodes-----	143
1.	Effet du sel (NaCl) sur la germination des graines -----	143
2.	Effet du sel (NaCl) sur la croissance des espèces-----	143
3.	Influence du NaCl sur la croissance des rhizobiums en milieu liquide -----	144
4.	Effet du sel (NaCl) sur la symbiose <i>A. seyal</i> -rhizobium -----	144
5.	Procédure analytique-----	145
6.	Analyses statistiques des données -----	147
	Résultats -----	148
1.	Avant propos -----	148
2.	Effet du NaCl sur la germination des graines -----	149
3.	Effet du sel (NaCl) sur la croissance <i>in vitro</i> des espèces d' <i>Acacia</i> spp.-----	149
4.	Effet du sel sur la croissance des souches -----	153
5.	Effet du NaCl sur la symbiose <i>A. seyal</i> -rhizobium-----	155
6.	Effet du NaCl sur la teneur en protéines solubles et activités GS -----	157
7.	Effet du NaCl sur la teneur en chlorophylles et activité PEPC des feuilles -----	158
iv.	Discussion-----	160
1.	Effet du sel (NaCl) sur la germination des graines -----	160
2.	Effet du NaCl sur la croissance et la nodulation des plants d' <i>A. seyal</i> inoculés -----	160
3.	Réponses biochimiques des plants d' <i>A. seyal</i> au stress salin-----	161
CHAPITRE V : EFFET DE L'INOCULATION AVEC DES SOUCHES DE <i>MESORHIZOBIUM</i> SP. ET/OU DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES SUR LA CROISSANCE ET LA NUTRITION MINERALE DE PLANTS D' <i>A. SEYAL</i> DEL. -----		
	Introduction -----	163
	Matériel et méthodes-----	166
1.	Matériel végétal et conditions de culture des plants -----	166
2.	Production d'inoculum de champignon mycorhiziens arbusculaires et de rhizobium	166
3.	Inoculation microbienne et traitements salés-----	166
4.	Evaluation de la nodulation, de la colonisation mycorhizienne et de l'effectivité des symbioses rhizobiennes et mycorhiziennes-----	167
5.	Analyse des teneurs minérales de feuilles et des racines-----	169
6.	Analyses statistiques -----	169
lii.	Résultats-----	170
1.	Avant propos -----	170

2. Colonisation microbienne des racines de plants d’A. seyal en conditions de stress salin	171
3. L’inoculation microbienne améliore la croissance des plants d’ A. seyal en condition de stress salin -----	174
4. Effet de l'inoculation sur la nutrition minérale des plants en relation avec la salinité	174
5. Teneur en proline des feuilles en rapport avec la salinité -----	178
iv. Discussion -----	179
1. Colonisation microbienne des racines de plants d’A. seyal en conditions de stress salin	179
2. L’inoculation microbienne peut améliorer la tolérance au stress salin des plants d’A. seyal -----	180
3. Effet de l'inoculation sur la nutrition minérale des plants sous contrainte saline----	181
4. Teneur en proline des feuilles en rapport avec la salinité -----	182
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE -----	184
Diversité génétique des rhizobiums autochtones des sols des basses vallées du sine et du saloum associés a A. Seyal -----	184
Analyse phylogénétique des gènes symbiotiques et caractérisation phénotypique des souches de Mesorhizobium sp. associées a A. seyal -----	185
Influence des paramètres physico-chimiques sur la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes des sols-----	186
Réponses physiologiques et biochimiques d'A. seyal Del. sous contrainte saline-----	188
Effet de l’inoculation avec des souches de Mesorhizobium sp. et/ou des champignons mycorhiziens à arbuscules sur la croissance et la nutrition minérale de plants d’A. seyal Del. -----	188
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----	190
ANNEXES -----	230
ANNEXE 1 : Préparation des solutions-----	230
ANNEXE 2 : Marqueur de poids moléculaire-----	232
ANNEXE 3 : Substrats organiques utilisés pour établir les profils cataboliques des sols--	234

LISTE DES ACRONYMES ET ABREVIATIONS

µg	Microgramme
µl	Microlitre
µS	Microsiemens
ACP	Analyse en Composante Principale
ADNr	Acide Désoxyribonucléique Ribosomique
ANOVA	Analysis Of Variance
ANRr	Acide Ribonucléique Ribosomique
ATP	Adénosine 5'-Triphosphate
BET	Bromure d'Ethidium
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Paire de Bases
bv	Biovar
CIRAD	Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
Cm	Centimètre
CMA	Champignons Mycorhiziens à Arbuscules
CNRF	Centre National de Recherches Forestières
CTAB	Cetyltrimethyl Ammonium Bromide
CTFT	Centre Technique Forestier Tropical
dATP	Désoxyadénosine-Triphosphate
dCTP	Désoxycytosine-Triphosphate
dGTP	Désoxyguanine-Triphosphate
dNTP	Désoxyribonucléique Tris-Phosphate
DO	Densité Optique
dTTP	Désoxytymidine-Triphosphate
EC ou CE	Electrical Conductivity ou Conductivité Électrique
EDTA	Ethylène Diamine Tétracétate
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
g	Gramme
h	Heure
ha	Hectare
<i>Hae</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>
i.e.	id est (C'est-à-dire)
IGS	Intergenic Spacer (Espace Intergénique)
INP	Institut National de Pédologie
IRD	Institut de Recherches pour le Développement
ISRA	Institut Sénégalaise de Recherches Agricoles
ITS	Internal Transcribed Spacer
kb	Kilobase ou Kilo-Paire de Bases
Kg	Kilogramme
Km	Kilomètre
l	Litre
LAMA	Laboratoire des Moyens Analytiques
LCM	Laboratoire Commun de Microbiologie (IRD/ISRA/UCAD), Dakar, Sénégal

LISTE DES ACRONYMES ET ABREVIATIONS

LMG	Collection de rhizobiums du Laboratoire de Microbiologie de Gand, Gand, Belgique
LSTM	Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Montpellier, France
MESUCURRS	Ministère de l'Enseignement Supérieur, des Universités, des Centres Universitaires Régionaux (CUR) et de la Recherche Scientifique
MF	Masse de Matière Fraîche
mg	Milligramme
min	Minute
MJ	MégaJoules
ml	Millilitre
ML	Maximum Likelihood
mM	millimolaire
mm	Millimètre
MPN	Most Probable Number (Nombre le Plus Probable)
MS	Masse de Matière Sèche
<i>Msp</i>	<i>Moraxella species</i>
NCBI	National Center For Bioinformatics Institute
nm	Nanomètre
ORS	Collection de Rhizobiums du LCM IRD/ISRA/UCAD, Dakar, Sénégal
ORSTOM	Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer
p/v	Poids par Volume
pb	Paire de Bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)
pH	Potentiel Hydrogène
ppm	Parties par Million
PROGERT	Projet de Gestion des Terres Dégradées dans le Bassin Arachidier
pSym	Plasmide Symbiotique
PVPP	Polyvinyl Polypyrrolidone
QSP	Quantité Suffisamment Proportionnelle
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de la Longueur des Fragments de Restriction)
rpm	Rotation par Minute
s	Seconde
STM	Collection de rhizobiums du LSTM, Montpellier, France
TAE	Tris Acétate Edta
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borate Edta
TE	Tampon Tris-HCl, EDTA
TY	Tryptone Yeast Extract
UAG	Université des Antilles et de la Guyane
UPGMA	Unweighted Pair Group Method Average
UV/VIS	Ultra-Violet / Visible
V	Volt
v/cm	Volt par Centimètre
v/v	Volume par Volume
YEM	Yeast Extract Mannitol
YMA	Yeast Extract Mannitol Agar

RESUME

La salinisation des sols est un problème environnemental majeur et croissant, aggravant la perte de terres boisées et arables, particulièrement dans les régions arides et semi-arides. L'effet du sel sur les plantes se traduit notamment par une réduction de la disponibilité de l'azote. De ce point de vue, les légumineuses sont très importantes dans le processus de réhabilitation des terres dégradées, grâce à leur aptitude à réaliser une symbiose efficace avec des bactéries fixatrices d'azote naturellement présentes dans leur rhizosphère. Le principal objectif de ce travail est de mettre en évidence la diversité des rhizobiums associés à *Acacia seyal* Del. dans le Bassin Arachidier du Sénégal affecté par la salinité et de présenter l'importance des communautés microbiennes symbiotiques sur l'adaptation au stress salin d'*A. seyal*.

Une expérience de piégeage a permis de montrer la large répartition des bactéries nodulant *A. seyal* dans les sols des basses vallées du Sine et du Saloum. Nos résultats montrent une forte diversité génétique, phénotypique et symbiotique de ces rhizobiums ; qui ne serait pas liée à l'origine des sols d'isolement. Nos résultats montrent que cette espèce dont la nodulation semble peu spécifique, en conditions de laboratoire, est préférentiellement nodulée par des souches de rhizobium proches des genres *Mesorhizobium* et *Ensifer*. La faible spécificité d'hôtes d'*A. seyal* pourrait s'expliquer par sa capacité à établir une symbiose avec un large éventail d'espèces de rhizobiums portant des gènes de nodulation et de fixation d'azote, en particulier *nodC* et *nifH*, phylogénétiquement divergents. Cette promiscuité d'*A. seyal* pourrait d'ailleurs constituer un avantage important pour cette légumineuse et expliquer sa large distribution en Afrique.

L'évaluation de la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes par la détermination du Profil de Réponse Catabolique (CRP) des sols de l'horizon de surface 0-25 cm de 4 peuplements naturels d'*A. seyal* met en exergue une importante variabilité dans l'activité métabolique des microorganismes des sols entre les sites prospectés. En outre, nos résultats montrent que la faible fertilité des sols entrave fortement l'activité des microorganismes indigènes. L'apport de microorganismes symbiotiques comme les rhizobiums et les champignons mycorhiziens à arbuscules qui améliorent la fertilité des sols pourrait alors stimuler les activités métaboliques de ces microorganismes indigènes.

Il ressort de cette étude qu'*A. seyal* est modérément tolérante au sel, avec un taux de germination élevé (40%) en présence de NaCl à 342 mM (20 g/l), meilleur que celui des espèces d'*Acacia bivenosa* DC. Prod. et d'*Acacia sclerosperma* F. Muell., dont la tolérance au sel au cours de la germination est éprouvée. *A. seyal* pourrait ainsi constituer une réserve de graines viables lorsque les niveaux de salinité sont élevés. Cette propriété pourrait faciliter une installation réussie de cette espèce dans les environnements salins. Nos résultats ont permis de rendre compte que l'inoculation microbienne, notamment la double inoculation avec des rhizobiums et un cocktail de champignons mycorhiziens à arbuscules, contribuait à la réduction des effets dépressifs du stress salin sur les plants d'*A. seyal* cultivés en pépinière.

En conclusion, nos résultats mettent en exergue que l'important rôle que pourraient jouer *A. seyal* dans l'amélioration des processus de reboisement des terres dégradées en tant qu'espèce modérément tolérante au sel et hôte peu spécifique, qui peut établir une symbiose efficace avec des rhizobiums de diverses origines génomiques, peut être amélioré par l'inoculation microbienne. Par conséquent, l'effet synergique de la double inoculation pourrait être utilisé pour diminuer le taux de mortalité des jeunes plants couramment observé lors de la transplantation de plantations forestières dans les sols semi-arides.

Mots-clés : *Acacia* ; champignons mycorhiziens ; écophysologie ; fixation de l'azote ; microbial diversité ; Leguminosae ; nutrition minérale ; osmorégulation ; phylogénie ; rhizobium ; salinité ; Sénégal ; symbiose.

ABSTRACT

Soil salinization is a major environmental and increasing problem, exacerbating the loss of woodland and arable land, particularly in arid and semi-arid areas. The effect of salt on plants is reflected in particular by reducing nitrogen availability. Thus, legumes are very important in the rehabilitation process of degraded lands through their ability to achieve effective symbiosis with nitrogen-fixing bacteria naturally present in their rhizosphere. The main objective of this work is to highlight the diversity of rhizobia associated with *Acacia seyal* Del. in the Senegalese Groundnut Basin affected by salinity and to demonstrate the importance of symbiotic microbial communities on adaptation of *A. seyal* to salt stress.

A trapping experiment showed the wide distribution of populations of root nodulating bacteria associated to *A. seyal* in soils of the Groundnut Basin. Results showed high genetic, phenotypic, and symbiotic diversity of these rhizobia. However, this diversity was not related to the origin of soils sampling. Our results showed that this species which seems not specific in nodulation in laboratory conditions was preferentially nodulated by strains of rhizobia close to *Mesorhizobium* and *Ensifer* genera. We also showed that the low host specificity of *A. seyal* could be explained by its ability to establish symbiosis with a wide range of species of rhizobia carrying nodulation and nitrogen fixation genes, in particular *nifH* and *nodC*, phylogenetically divergent. The promiscuity of *A. seyal* could also be an important advantage for this legume, and explain its wide distribution in Africa.

The assessment of soil microbial functional diversity by studying patterns of in situ catabolic potential (ISCP) of the surface layer 0-25 cm of 4 natural stands of *A. seyal* highlights high variability in the metabolic activities of soil microorganisms between the sites sampled. In addition, our results showed that low soil fertility, among other physico-chemical properties of soils, severely hampers the activity of indigenous microorganisms. The introduction of symbiotic microorganisms such as rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi by improving soil fertility could then stimulate the metabolic activity of indigenous microorganisms.

We demonstrated that *A. seyal* is moderately salt tolerant, with a high germination rate (40%) in the presence of 342 mM NaCl (20 g/l), better than the species *Acacia bivenosa* DC. Prod. and *A. sclerosperma* F. Muell., screened for their salt tolerance during seed germination in the presence of NaCl. Thus, *A. seyal* could constitute a reserve of viable seeds when salinity levels are high. This trait could facilitate a successful installation of this species in saline environments. We showed that microbial inoculation, including dual inoculation with rhizobia and a cocktail of arbuscular mycorrhizal fungi, contributed to the reduction of the depressant effects of salt stress on *A. seyal* seedlings grown in nursery.

In conclusion, our results showed that the important role that *A. seyal* could play in the improvement of reforestation process on degraded lands as a moderately salt tolerant species and a promiscuous host, which can establish effective symbiosis with rhizobia from diverse genomic backgrounds, can be improved by microbial inoculation. Hence, the synergistic effect of double inoculation could be used to decrease the transplant mortality, commonly observed during forest plantation establishment in semi-arid soil conditions.

Keywords: *Acacia*; mycorrhizal fungi; ecophysiology; nitrogen fixation; microbial diversity ; Leguminosae; mineral nutrition; osmoregulation; phylogeny; rhizobia; salinity; Senegal; symbiosis.

REMERCIEMENTS

A l'occasion de la présentation de ce mémoire je voudrais exprimer ma reconnaissance et mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur concours et leur soutien lors de la réalisation de ce travail.

Mes remerciements s'adressent en premier lieu aux personnes qui me font l'honneur de faire partie du jury pour juger ce travail.

Je remercie sincèrement Monsieur le Ministre, Pr. Amadou Tidiane BA, qui a encadré et suivi avec attention les différentes étapes de ce travail. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour l'appui qu'il m'a toujours assuré, pour la rigueur et l'enthousiasme qu'il a manifesté tout au long de ce travail, mais aussi et surtout pour la disponibilité dont il a fait montre pour la soutenance de cette thèse, malgré son calendrier très chargé. Je le remercie pour l'insigne honneur qu'il me fait d'avoir bien voulu présider ce jury.

Je remercie vivement Pr. Kandoura NOBA, Chef du Département de Biologie Végétale de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar, qui m'a offert l'opportunité de m'inscrire dans son département et d'avoir accepté d'être co-rapporteur de cette thèse. Son humanisme m'inspire énormément.

La réalisation d'une partie de ce travail n'a été possible que grâce à l'environnement scientifique et moral dont j'ai pu bénéficier au LSTM- Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes CIRAD/ENSAM/INRA/IRD de Montpellier (France), sous la direction de Dr. Bernard DREYFUS Directeur de Recherches à l'IRD ; auprès de qui j'ai beaucoup appris. Je le remercie vivement de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Qu'il trouve ici le témoignage de ma très haute considération et ma grande reconnaissance pour l'intérêt qu'il a toujours porté à mes recherches. Grâce à lui, j'ai pu bénéficier de la collaboration de l'équipe du Pr. D. LERUDULLIER. Je le remercie surtout d'avoir accepté de faire le déplacement pour juger ce travail malgré ses multiples occupations.

Mes sincères remerciements vont également aux autres membres du jury. Je voudrais témoigner ma reconnaissance à Pr. Amadou Moustapha BA de l'Université des Antilles et de la Guyane (UAG), d'avoir accepté d'être co-rapporteur de cette thèse. Je remercie Pr. Ibrahima NDOYE et Pr. El Hadji Samba Ndao SYLLA de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar pour leurs soutiens à tous points de vue, pour la relecture du manuscrit et pour avoir bien voulu juger ce travail.

Toute ma gratitude va à Dr. Marc NEYRA qui a encadré et suivi les premières étapes de ce travail de recherche au LCM-Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/ISRA/UCAD de Dakar (Sénégal). Je suis heureux d'avoir pu bénéficier de son amitié et de sa confiance. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour l'appui illimité dont il m'a toujours assuré dans la conduite de ce travail.

J'adresse également mes remerciements aux autorités administratives de l'UCAD, notamment Pr. Abdou Salam SALL et Pr. Matar SECK, respectivement ancien Recteur de l'UCAD et ancien Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de l'UCAD, pour l'appui qu'ils m'ont toujours apporté pour mes séjours scientifiques en France.

Je remercie Pr. Serigne Amadou NDIAYE, Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de l'UCAD, et tout son Cabinet pour leur soutien au moment du tirage de ce document.

J'exprime ma reconnaissance à tout le personnel du Département de Biologie Végétale. Certains de mes collègues enseignants dudit Département m'ont enseigné et m'ont fait aimer la biologie végétale et m'ont fait ainsi prendre conscience de la noblesse du métier d'Enseignant. J'ai une pensée pieuse en la mémoire de Pr. feu Nicolas DIALLO. Puise Dieu l'accueillir au Paradis.

Je remercie Pr. Bhen Sikina TOGUEBAYE, Directeur de la Recherche de l'UCAD, et tout le personnel de la Direction de la Recherche.

Je remercie les organismes et personnalités extérieures qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier les autorités scientifiques et administratives de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) qui ont bien voulu prendre en charge mes séjours au LSTM, dans le cadre d'un programme de Bourses d'Echanges Scientifiques de Courte Durée. Ce travail a reçu le soutien financier l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF), à travers un Projet de Coopération Scientifique InterUniversitaire (PCSI N° 6314PS512 / 2005-2007). Que les autorités et le personnel de ces organismes trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

J'exprime ma gratitude à tous mes collaborateurs dans cette thèse pour leur précieuse contribution ; que je ne saurais estimer, mais que j'apprécie énormément. Je veux nommer par ordre alphabétique : Dr. Jean-Christophe AVARRE, M. Niokhor BAKHOUM, Dr. Gilles BENNA, Dr. Clémence CHAINTREUIL, Pr. Nicolas DIALLO, Dr. Omar DIOUF, Dr. Mayécour DIOUF, Dr. Robin DUPONNOIS, Dr. Dioumacor FALL, M. Aliou FAYE, M. Omar Salif GUEYE, Dr. Aboubacry KANE, Dr. Didier LESUEUR, Dr. Anicet MANGA, Dr. Lionnel MOULIN, Pr. Ibrahima NDOYE, M. Issa NDOYE, Mr Omar SADIO, Dr. Saïdou SALL et Dr. Ramatoulaye Thiaba SAMBA-MBAYE, Pr. El Hadji Samba NDao SYLLA.

Mes remerciements s'adressent aussi à la chaleureuse équipe des chercheurs, stagiaires et techniciens du LCM IRD/ISRA/UCAD : Pr. Tahir DIOP, Dr. Abdala DIEHDIU, Dr. Fatou GUEYE, Dr. Mamadou GUEYE, Dr. Mansour THIAO, Dr. Tatiana Krassova WADE, M. Mansour GNING, Dr. Arsène SANON, Mlle Nathalie Diagne, Mlle Fatou NDOYE, M. Godar SÈNE, M. Abdoulaye SOUMARÉ, Mlle Fatou DIOUF, Mlle Seynabou SÈNE, Mlle Christine OUATARA, Fatoumata FALL, M. Jean BAKHOUM, M. Omar TOURÉ, M. Mathieu FAYE, Anna Marthe KONTÉ, M. Oussèynou GUÈYE, Mme Ngongé FAYE-NIANG, M. Francis do RÉGO, Mme Marie Claire Da SILVA-NDIAYE, Mme Maimouna CISSOKHO-SALL, M. Cheikh NDIAYE, M. Daouda BADJI, M. Paul TENDENG et M. Alpha Omar DIALLO. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma gratitude.

Je dis merci à tout le personnel du LEMSAT- Laboratoire d'Ecologie Microbienne des Sols et Agrosystèmes Tropicaux, pour la réalisation des travaux sur l'étude du biofonctionnement des sols, sous la conduite de Dr. Saïdou SALL.

Je ne saurais oublier le personnel du LSTM. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude pour leur soutien scientifique et moral.

J'exprime ma reconnaissance aux familles IRRIBARNE et BAUDIN qui nous ont constamment offert, ma famille et moi, leur gentillesse et leur disponibilité illimitées.

Je remercie mes amis de Briançon (Monette et Claude), de Gap (Carmen et François), de Saint-Etienne-en-Dévoluy (Josy, Père Bertrand et tous les amis de l'Association Francette Achery) et de St-Martin-de-Queyrières (Mamie Renée) qui m'ont toujours accueilli avec enthousiasme durant mes différents séjours en France.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à ce travail et que je ne puis citer individuellement, c'est avec sincérité que je témoigne à chacun ma sympathie.

Enfin, j'adresse mes sincères remerciements à ma famille, particulièrement à ma maman qui a été à l'origine de ce long cheminement.

A mon épouse, je dis : Non ! Rien de rien. Non ! Je ne regrette rien ! A toi, qui a su me comprendre et me soutenir, et à nos enfants Jean Bernard Made, Laure Gora, Gabriel Nicolas Sadakh et Raphaël Latyr ; pour votre persévérante attente durant mes longues et répétitives absences, ce travail est le vôtre.

DEDICACES

Je rends grâce à l'Alpha et l'Oméga

Je dédie ce travail à :

Feu mon père Jean Baptiste Sadakh

Ma mère Rosalie Gora

Mon épouse Marie Etienne Ndella

***Mes enfants Jean Bernard Made, Laure Gora,
Gabriel Nicolas Sadakh et Raphaël Latyr***

Rémy Made

Mes frères et soeurs

Paul Moundor MADIOUNE

Mes amis d'enfance

Ce travail est le vôtre !

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Superficies affectées par le sel au Sénégal

Tableau 2 : Classification des bactéries nodulant des légumineuses

Tableau 3 : Caractéristiques des sites d'échantillonnage des sols ayant servi au piégeage des rhizobiums sur des racines de plants d'*A. seyal*

Tableau 4 : Diversité des génotypes de rhizobiums associés à *Acacia seyal*

Tableau 5 : Profils IGS-RFLP obtenus par analyse PCR-RFLP de l'IGS 16S-23S de l'ADNr de broyats de nodules

Tableau 6 : Tests de nodulation et capacité de fixation d'azote sur *A. seyal* des souches types et des souches représentatives des genres *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* et *Rhizobium*

Tableau 7 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR et le séquençage de gène codant pour le système de transport de type BCCT

Tableau 8 : Tests de spécificité des souches de *Mesorhizobium* sp. basés sur la nodulation (+) de différentes légumineuses ligneuses, 28 jours après l'inoculation

Tableau 9 : Effets de l'inoculation microbienne sur la croissance de plants d'*A. seyal* et le nombre total des nodules après 3 mois de culture en serre sur sol de Sangalkam non désinfecté

Tableau 10 : Caractéristiques physico-chimiques des sols de Foundiougne, Ndiafate, Ngallou et Sarène

Tableau 11 : Activités microbiennes des sols des sites de Foundiougne, Ndiafate, Ngallou et Sarène

Tableau 12 : Matrice de corrélation des caractéristiques chimiques et biologiques des sols de tous les sites confondus

Tableau 13 : Effet de NaCl sur le taux de germination (%) de graines d'*Acacia bivenosa*, *A. sclerosperma* et *A. seyal*

Tableau 14 : Effet du sel (NaCl) à différentes concentrations (0, 43, 86, 128, 171, 214, 256 et 342 mM) sur le nombre de feuilles des plants d'*A. seyal*, d'*A. bivenosa* et d'*A. sclerosperma* cultivés en tubes Gibson pendant 4 semaines

Tableau 15 : Effet de quatre niveaux de salinité (0, 85, 171 et 256 mM NaCl) sur la croissance de plants d'*A. seyal* inoculés ou non cultivés en tubes Gibson pendant 40 jours

Tableau 16 : Effet de quatre niveaux de salinité (0, 85, 171 et 256 mM NaCl) sur la teneur en protéines solubles (mg/g de matière fraîche) et l'activité glutamine synthétase (GS) ($\mu\text{mol } \gamma\text{-Glutamylhydroxamate/h/g}$ de matière fraîche) des feuilles, des racines et des nodules de plants d'*A. seyal* cultivés en tubes Gibson

Tableau 17 : Effet de l'inoculation microbienne avec *Rhizobium* et/ou les champignons mycorhiziens à arbuscules sur la production de biomasse (g/plant) et le nombre de nodules de plants d'*A. seyal* cultivés pendant 4 mois sur un sol non désinfecté

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Zones affectées par la salinisation des terres au Sénégal

Figure 2 : Tanne dans les basses vallées du Sine (Foundiougne – Région de Fatick)

Figure 3 : Un arbre d'*Acacia seyal* dans une tanne entouré de graminées (*Sporobolus* sp.) dans les basses vallées du Sine

Figure 4 : Le cycle de l'azote

Figure 5 : Arbre phylogénétique universel obtenu à partir d'analyses comparatives de séquences ARNr

Figure 6 : Relations phylogénétiques entre bactéries fixatrices d'azote symbiotiques et non symbiotiques

Figure 7 : Pouvoirs discriminants de différentes techniques de taxonomie des *Rhizobiaceae*

Figure 8 : Arbre phylogénétique 16S rDNA, construit avec toutes les souches types des espèces des alpha- et bêta-protéobactéries

Figure 9 : La symbiose Rhizobium/légumineuses : un dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie

Figure 10 : Gros plan d'un nodule racinaire sur un plant de Medicago, inoculés avec une souche de *E. meliloti*

Figure 11 : Epines d'*Acacia seyal* Del. var. *fistula* (Schweinf.) Oliv.

Figure 12 : Fleurs d'*Acacia seyal* Del. var. *seyal*

Figure 13 : Un arbre d'*A. seyal* brouté par une chèvre en saison sèche à Koutal (Région de Kaolack – Sénégal)

Figure 14 : Carte d'occupation des sols du Bassin arachidier

Figure 15 : Projection des profils IGS-RFLP représentant les différents isolats de Rhizobium, la salinité et le pH des échantillons de sol sur les deux premières composantes principales (PC1 X PC2) déterminé par l'analyse de correspondance

Figure 16 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences des gènes ARNr 16S des bactéries isolées des nodules de plants d'*A. seyal*

Figure 17 : Relation phylogénétique entre les séquences des régions IGS des souches ORS (en gras) et les souches de *Mesorhizobium* spp.

Figure 18 : Phénogramme construit avec la méthode UPGMA mettant en évidence la similitude phénotypique chez les isolats de rhizobiums d'*Acacia seyal*

Figure 19 : Gel d'électrophorèse du produit d'amplification par PCR du gène codant pour le système de transport de type BCCT

Figure 20 : Arbre phylogénétique (Neighbor-joining) basé sur les séquences alignées (577 pb) des gènes codant pour le système de transport de type BCCT en utilisant MEGA4

Figure 21 : Plants d'*A. seyal* témoins et inoculés avec la souche ORS 3324 après 3 mois de culture en serre sur sol de Sangalkam non désinfecté

Figure 22 : Arbre phylogénétique (Neighbor-joining) de séquences alignées de 466 pb de gènes *nodA* utilisant l'algorithme MEGA4

Figure 23 : Arbre phylogénétique (Neighbor-joining) de séquences alignées de 448 pb de gènes *nodC* utilisant l'algorithme MEGA4

Figure 24 : Arbre phylogénétique (Neighbor-joining) de séquences alignées de 362 pb de gènes *nifH* utilisant l'algorithme MEGA4

Figure 25 : Distribution des racines et des nodules en fonction de la profondeur d'échantillonnage des sols à Foundiougne, Ndiafate, Ngallou et Sarène

Figure 26 : Projection sur les deux premières composantes principales (F1 X F2) des effets combinés des caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sols prélevés sous *A. seyal* à l'horizon de surface (0-25 cm) sur les biomasses racinaires et racinaires et les activités microbiennes

Figure 27 : Réponse catabolique des sols des différents sites par suite de l'addition des substrats individuels

Figure 28 : Dégagement moyen de CO₂ par groupe de substrats et par site

Figure 29 : Effet du sel (NaCl) à différentes concentrations (0, 43, 86, 128, 171, 214, 256 et 342 mM) sur la hauteur des tiges principales des plants d'*A. seyal*, d'*A. bivenosa* et d'*A. sclerosperma* cultivés en tubes Gibson pendant 4 semaines

Figure 30 : Effet de quatre niveaux de salinité (0, 85, 171 et 256 mM NaCl) sur la croissance en milieu liquide de différentes souches de *Mesorhizobium* sp. Nodulant *A. seyal*.

Figure 31 : Effet de quatre niveaux de salinité (0, 85, 171 et 256 mM NaCl) sur le nombre moyen de nodules de plants d'*A. seyal* inoculés avec deux souches de *Mesorhizobium* sp. (ORS 3394 et ORS 3403)

Figure 32 : Effet de quatre niveaux de salinité (0, 85, 171 et 256 mM NaCl) sur la teneur en chlorophylle des feuilles de plants d'*Acacia seyal* cultivés en tubes Gibson pendant 40 jours et inoculés ou non avec la souche de *Mesorhizobium* sp. ORS 3403

Figure 33 : Effet de quatre niveaux de salinité (0, 85, 171 et 256 mM NaCl) sur l'activité PEPC (mmol NADH/h/g de matière fraîche) des feuilles de plants d'*A. seyal* cultivés en tubes Gibson pendant 40 jours et inoculés ou non avec la souche de *Mesorhizobium* sp. ORS 3403

Figure 34 : Notation de l'infection mycorhizienne (classes 0 à classe 5)

Figure 35 : Racines mycorhizées de plants d'*A. seyal* inoculés avec des champignons mycorhiziens à arbuscules et cultivés pendant 4 mois sur un sol non désinfecté

Figure 36 : Taux (Fréquence et Intensité) de mycorhization de plants d'*A. seyal* inoculés avec des champignons mycorhiziens à arbuscules et cultivés pendant 4 mois sur un sol non désinfecté

Figure 37 : Teneur foliaire en N, P, K et Na de plants d'*A. seyal* inoculés avec des rhizobiums et/ou des champignons mycorhiziens à arbuscules et cultivés pendant 4 mois sur un sol non désinfecté

Figure 38 : Teneur racinaire en N, P, K et Na de plants d'*A. seyal* inoculés avec des rhizobiums et/ou des champignons mycorhiziens à arbuscules et cultivés pendant 4 mois sur un sol non désinfecté

Figure 39 : Teneur foliaire en proline (µmole/g Matière fraîche) de plants d'*A. seyal* inoculés avec des rhizobiums et/ou des champignons mycorhiziens à arbuscules et cultivés pendant 4 mois sur un sol non désinfecté

PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE

Liste des articles acceptés ou en préparation

1. **Diouf D**, Fall D, Chaintreuil C, Ba AT, Dreyfus B, Neyra M, Ndoye I, Moulin L (2010). Phylogenetic analyses of symbiotic genes and characterization of functional traits of *Mesorhizobium* spp. strains associated to a promiscuous species *Acacia seyal* Del. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 818-830. URL : <http://dx.doi.org.10.1111/j.1365-2672.2009.04500.x>. (**Impact Factor 2009 : 2.098**)
2. Fall D, **Diouf D**, Diouf O, Neyra M, Diallo N (2009). Physiological and biochemical responses of *Acacia seyal* (Del.) seedlings under salt stress conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 32: 1122-1136. URL : <http://dx.doi.org/10.1080/01904160902943155>. (**Impact Factor 2009 : 0.512**)
3. **Diouf D**, Ndoye I, Fall D, Kane A, Ba AT, Neyra M (2008). Caractérisation phénotypique et symbiotique de souches de *Mesorhizobium* spp. nodulant *Acacia seyal* Del. *Journal des Sciences et Technologies* 7: 1-10. URL : http://jst.ucad.sn/2008_vol7_1_full=1.htm
4. **Diouf D**, Samba-Mbaye R, Lesueur D, Ba AT, Dreyfus B, de Lajudie P, Neyra M (2007). Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. rhizobial populations indigenous to Senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. *Microbial Ecology* 54: 553-566. URL : http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8252-8_47. (**Impact Factor 2009 : 3.251**)
5. **Diouf D**, Fall D, Kane A, Bakhom N, Ba AT, Duponnois R. Symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi and *Mesorhizobium* spp. enhances growth and mineral nutrition of *Acacia seyal* (Del.) seedlings under salt stress. (en préparation).

Colloques édités

1. de Lajudie P, Neyra M, Galiana A, Nzoue A, Sy A, Molouba F, Chaintreuil C, Moulin L, Le Roux C, Domergue O, Jourand P, Merabet C, Bekki A, Gueye M, Sylla S, Ndoye I, **Diouf D**, Wade T, Sow H, Houngnandan P, Zoubeirou AM, Yattara I, Sacko O, Atallah T, Zakhia F, Mars M, Mahdhi M, Jeder H, Filali-Maltouf A, Mohamed SH, Dreyfus B (2009). Investigating and promoting new local legume symbioses for development in West African and Mediterranean countries. Actes du Congrès International MICROBIOD « Microbial Biotechnology for Development », Marrakech, Maroc, 02-05 Novembre 2009. pp. 47-48. MICROBIONA Edition. <http://www.ucam.ac.ma/microbiona/Ressources/Actes-congres-MICROBIOD-2009.pdf>
2. **Diouf D**, Samba-Mbaye R, Lesueur D, Ba AT, Dreyfus B, De Lajudie P, Neyra M (2008). Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. Rhizobial populations indigenous to senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. In: *Biological nitrogen fixation. Towards poverty alleviation through sustainable agriculture*. Actes du 15^e Congrès International pour la Fixation Biologique de l'Azote & 12^e Congrès International de l'Association Africaine pour la fixation Biologique de l'Azote, 21-26 Janvier, Cape Town, Afrique du Sud. (FD Dakora, SBM Chimphango, AJ Valentine, C Elmerich, W Newton, Eds.). pp. 129-130, Dordrecht : Springer, Netherlands. URL: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8252-8_47

Résumés de communications à des congrès scientifiques internationaux

1. **Diouf D**, Fall D, Kane A, Bakhom N, Ba AT, Ndoye I, Duponnois R (2010) Valorisation des microorganismes symbiotiques pour la réhabilitation des écosystèmes dégradés au Sahel : Symbiose mycorrhizienne et rhizobienne de *Acacia seyal* (Del.) en conditions de contrainte saline. Communication orale présentée au "1st International Congress on Mycorrhizal Symbiosis : Ecosystems and Environment of Mediterranean Area (Mycomed 2010)", 11-13 Octobre 2010, Marrakech, Maroc (Résumés des communications p. 71).
2. **Diouf D**, Fall D, Kane A, Bakhom N, BA AT, Duponnois R (2009). L'inoculation avec des champignons mycorrhiziens à arbuscules et des *Mesorhizobium* spp. améliore la croissance et la nutrition minérale d'*Acacia seyal* (Del.) en conditions de stress salin. Communication orale présentée à la Xe Animation Régionale de l'AUF, 10-13 Novembre 2009, Dakar, Sénégal (Résumés des communications p. 39).

3. De Lajudie P, Neyra M, Galiana A, N'Zoué A, Sy A, Molouba F, Chaintreuil C, Moulin L, Le Roux C, Domergue O, Jourand P, Renier A, Mérabet C, Bekki A, Gueye M, Sylla S, Ndoye I, **Diouf D**, Wade T, Sow H, Houngnandan P, Zoubeirou AM, Yattara I, Sacko O, Atallah T, Zakhia F, Mars M, Mahdhi M, Jeder H, Filali-Maltouf A, Mohamed SH, Dreyfus B (2008). Investigating and promoting new local legume symbioses for development in West African and Mediterranean countries. 8e Conférence Européenne pour la fixation de l'Azote, 30 Août-3 Septembre 2008, Ghent, Belgique, (Résumés des communications p. 279). http://publications.cirad.fr/une_notice.php?dk=553559
4. **Diouf D**, Fall D, Ba AT, Dreyfus B, Neyra M, Ndoye I, Moulin L (2008). Phylogenetic analyses of symbiotic genes (*nodA*, *nodC*, and *nifH*) do not reflect the taxonomy of rhizobia that nodulate *Acacia seyal* in Senegal. Communication orale présentée au 13^e Congrès de l'Association Africaine pour la fixation Biologique de l'Azote, 15–18 Décembre 2008, Hammamet, Tunisie (Résumés des communications p. 5).
5. **Diouf D**, Kane A, Dreyfus B, Ba AT, Duponnois R (2007). Amélioration de la tolérance à la salinité de plantations d'*Acacia seyal* Del. par la maîtrise des champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules et des bactéries auxiliaires de la mycorhization et fixatrices d'azote. Poster présenté au Colloque International sur les Biotechnologies (BioTech World 2007), 24-25 novembre 2007, Oran, Algérie (Résumés des communications p. 17).
6. **Diouf D**, Kane A, Dreyfus B, Ba AT, Sylla S, Duponnois R (2007). Investigation of the symbiotic associations of legume species and their potential for revegetation of salted area in Senegal. Poster présenté au Congrès International Rhizosphere 2, 25-31 Août 2007, Montpellier, France (Résumés des communications p. 202).
7. **Diouf D**, Samba-Mbaye R, Lesueur D, Ba AT, Dreyfus B, Neyra M (2007). Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. rhizobial populations indigenous to Senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. Poster et Communication orale présentés au 15^e Congrès International pour la Fixation Biologique de l'Azote & 12^e Congrès International de l'Association Africaine pour la fixation Biologique de l'Azote, 21–26 Janvier 2007, Cape Town, Afrique du Sud.
8. Fall D, **Diouf D**, Neyra M, Diouf O, Diallo N (2004). Effet du sel (NaCl) sur la germination, la croissance, la nodulation et le métabolisme azoté et carboné chez *Acacia seyal* (Del.). Poster présenté au 11^e Congrès International de l'Association Africaine pour la fixation Biologique de l'Azote, 22-27 Novembre 2004, Dakar, Sénégal (Résumés des communications p. 68).
9. **Diouf D**, Samba-Mbaye R, Dreyfus B, Ba AT, Lesueur D, Avarre JC, Neyra M (2004). Genetic polymorphism and salt resistance of rhizobia associated with *Acacia seyal* isolated from different Senegalese soils. Poster présenté au 11^e Congrès International de l'Association Africaine pour la fixation Biologique de l'Azote, 22-27 Novembre 2004, Dakar, Sénégal (Résumés des communications p. 71).
10. **Diouf D**, Chaintreuil C, Ba AT, Lesueur D, Samba-Mbaye R, Dreyfus B, Benna G, Neyra M (2004). Genetic diversity and phylogeny of rhizobia associated with *Acacia seyal* isolated from Senegalese soils. Poster présenté à la 6^e Conférence Européenne pour la fixation de l'Azote, 24-27 Julliet 2004, Toulouse, France (Résumés des communications p. 71).
11. **Diouf D**, Lesueur D, Ba AT, Dreyfus B, De Lajudie P, Neyra M (2004). Diversité et structure des populations de rizobium symbiotes d'*Acacia seyal* de sols du Sénégal. Poster présenté à la 2e Conférence Méditerranéenne de Rhizobiologie, 23-25 Mai 2004, Oran, Algérie (Résumés des communications p.44).

INTRODUCTION GENERALE¹

La salinisation² des sols est un problème environnemental majeur et croissant. Environ 800 millions d'hectares de terres à travers le monde, soit plus de 6% de la superficie totale des terres de la planète, sont affectés par le sel (FAO 2009). En outre, les changements climatiques aggravent la perte de terres boisées dans les régions arides et semi-arides (Zeng 2003). Ainsi, l'offre de services provenant des forêts naturelles est insuffisante pour satisfaire la demande. Au Sénégal, les superficies affectées par la salinisation sont estimées à 1 200 000 ha (Sadio 1991). Selon des évaluations plus récentes de l'Institut National de Pédologie (INP) du Sénégal, 996 950 ha de terres sont affectées par la salinisation (Tableau 1).

Tableau 1 : Superficies affectées par le sel au Sénégal (INP, 2008)

Zones	Superficies (ha)
Casamance	262422
Vallée du fleuve	179765
Fleuve Gambie	192332
Niayes	7165
Sine-Saloum	221360
Sénégal Oriental	133901
TOTAL	996947

Au Sénégal, le phénomène de salinisation affecte principalement les zones côtières (Barbiero et al. 2004). Le déficit pluviométrique de ces dernières années a contribué à accentuer les effets de la salinité³ en aval des quatre principaux bassins versants du territoire à savoir le Sénégal, le Sine, le Saloum et la Casamance (Zeng 2003) (Figure 1).

¹ Les notes de bas de pages sont pour l'essentiel tirées soit Wikipedia (<http://fr.wikipedia.org/>) soit du Glossaire de la biotechnologie pour l'alimentation et l'agriculture de la FAO (http://www.fao.org/biotech/index_glossary.asp?lang=fr)

²La salinisation est l'accumulation des sels dans les sols. Elle a pour principales conséquences une augmentation de la pression osmotique, une toxicité pour les végétaux due à l'accumulation de certains ions, dont Na⁺, et une dégradation du sol.

³ La salinité désigne la quantité de sels dissous dans un liquide.

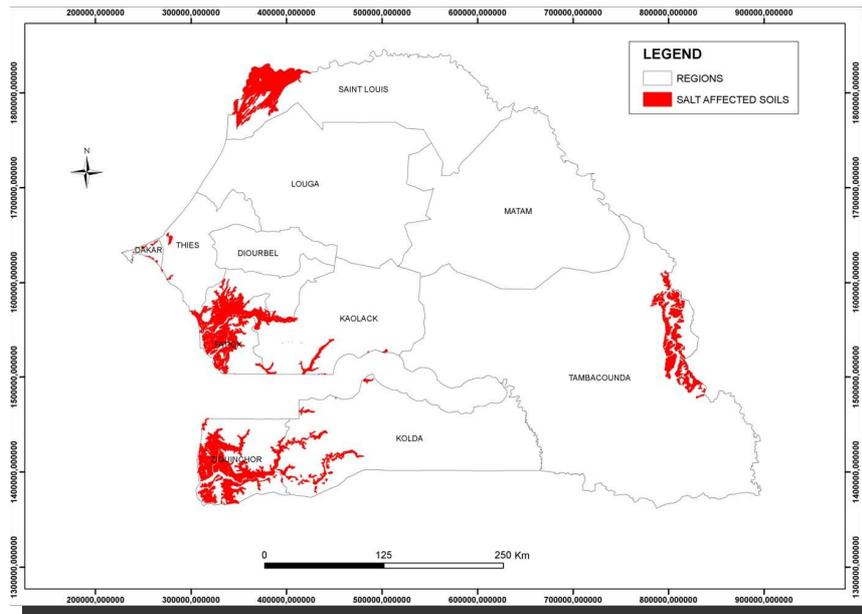


Figure 1 : Zones affectées par la salinisation des terres au Sénégal. (Source : INP, 2008)

Plusieurs facteurs expliquent cette sursalure des terres :

D'une part, l'existence d'une salure primaire d'origine fossile et de nature chlorurée sodique (NaCl) et magnésienne (MgCl_2), apportée par d'anciennes invasions marines à la faveur d'un golfe aujourd'hui comblé par les alluvions du fleuve. D'autre part, dans certains cas, le taux des sels dans le sol est la résultante de leur lessivage vers les couches profondes par les eaux de pluie et des remontées capillaires sous l'effet de l'évaporation de l'eau en surface. Or, la sécheresse est caractérisée à la fois par une diminution des précipitations et une augmentation de l'évaporation (Boivin and Le Brusq 1985). Les sels solubles remontent donc à la surface des sols, où ils forment des croûtes ou des structures poudreuses. La sécheresse entraîne ainsi une sursalure des sols exondables. La couche superficielle du sol devient pulvérulente, et est bientôt entraînée par les vents. Les remontées capillaires et la salinisation sont d'autant plus importantes qu'il existe une nappe phréatique peu profonde et salée, comme c'est le cas dans beaucoup de zones basses au Sénégal (Delta du Fleuve, Lac de Guiers, Niayes, Sine, Saloum, zone fluviomarine de Casamance). Par ailleurs, le lessivage par les pluies des sels accumulés en surface (croûte, moquette) conduit généralement à une augmentation de la salinité du fleuve et de ses affluents en début d'hivernage. En l'absence d'une pluviométrie normale, le front de salinité remonte très loin dans les marigots (Marius 1985; 1995).

La salinisation des sols est un des facteurs de désertification. Elle provoque une dégradation des propriétés biologiques, chimiques et physiques des sols. Les conséquences de cette dégradation des propriétés des sols est la diminution de leur fertilité ; qui entraîne une réduction des rendements des cultures, et parfois la disparition du couvert végétal naturel remplacé par d'immenses étendues de zones salées (ou Tannes⁴) (Boivin and Job 1988) (Figure 2).



Figure 2 : Tanne dans les basses vallées du Sine (Foundiougne – Région de Fatick). Notez l'absence de végétation aux bords de ce marigot (terres basses), où seules subsistent quelques rares espèces végétales, du fait de l'extrême salinité (croûtes de sel blanches). © D. Diouf

⁴ Un tanne (ou tann) désigne la partie d'un marais maritime la moins fréquemment submergée et aux sols généralement sursalés et nus ou avec peu de végétation.

La salinité est apparue depuis les années 1940 comme une sérieuse contrainte de l'utilisation agricole des tannes du Sine Saloum (Massibot and Carles 1946). Or, dans cette zone rurale l'agriculture constitue l'activité économique dominante. C'est à cet effet que l'État du Sénégal a initié de nombreux projets de gestion des ressources en sols et en eaux et visant particulièrement la récupération des terres salées.

Globalement, trois grands types d'activités ont été menés au Sénégal en vue de lutter contre la salinisation des terres : il s'agit d'actions mécaniques, chimiques et biologiques.

Les actions mécaniques de lutte ont consisté à la construction de digues anti-sel. Ces digues ont surtout concerné la Casamance et le Sine-Saloum ; où l'Etat, à travers plusieurs projets, a réalisé des endiguements dans les vallées pour empêcher l'intrusion des eaux marines. Déjà vers les années 1940, la plupart des zones du Sine-Saloum (Faoye, Djilass, Fimela) étaient protégées contre les inondations par de grandes digues (Charreau 1963; Massibot and Carles 1946) construites à la limite des terrasses basses. Grâce à ces digues la riziculture a été longtemps pratiquée dans les zones de dépression et les terrasses basses, car elles permettaient de canaliser les eaux de pluies. De même, de nombreux petits barrages dotés d'ouvrages évacuateurs ont été réalisés dans différentes vallées de la Casamance avec le Projet Intermédiaire puis Intégré de Développement Agricole de la Basse Casamance (PIDAC), le projet de Développement Rural de la Basse Casamance (DERBAC), le Projet pour la Gestion de l'Eau dans la zone Sud (PROGES), le Projet d'appui à la petite irrigation locale (PAPIL) et le Projet d'Appui au Développement Rural en Casamance (PADERCA).

Cependant, les premières tentatives de dessalement des tannes par des aménagements hydro-agricoles, en vue de leur mise en valeur agricole entre les années 1939 et 1946 (Massibot and Carles 1946) et entre 1960 et 1965 (Bonfils and Faure 1965) se sont soldées par des échecs, faute de techniques appropriées. Dans certains cas, les actions mécaniques ont été confrontées à une triple problématique : la sursalure, l'hyperacidité des sols et la position topographique très basse qui restreint les possibilités de drainage (Adams et al. 1965). Selon certains auteurs, la réalisation de tels ouvrages pour des zones déjà acidifiées manque de pertinence (Boivin and Le Brusq 1985). De plus, la gestion et l'entretien des aménagements hydro-agricoles n'avaient toujours pas été pleinement assurés ; ce qui n'a

pas favorisé leur fonctionnement adéquat et durable. La mise en valeur des terres a davantage été compliquée par la sécheresse. Depuis l'installation de la sécheresse des années 1970, ces digues ont été abandonnées et sont actuellement totalement détruites.

Pour faciliter la récupération des terres et leur mise en valeur agricole, la réalisation de ces digues était accompagnée de technologies mises au point par la recherche. Parmi lesquelles, les cultures en billons et les vannes à crémaillères pour réguler la circulation des eaux et la création de variétés hâtives de riz. Ainsi, divers programmes tels que le projet WINROCK-ISRA et le PROGES ont contribué à la fin des années 90 à la promotion de l'utilisation de variétés de semences améliorées.

Au plan chimique, le phosphogypse⁵ a été utilisé, durant trois années (1970-1973), pour le dessalement des terres du Delta du fleuve Sénégal, sur la cuvette de Boundoum Ouest (Mutsaers and Van Der Velden 1973). Le phosphogypse permet le remplacement des ions sodium par le calcium dans le complexe du sol. Il s'ensuit une libération de ces ions qui seront évacués par le lessivage des sols. Cependant, cette technique nécessite de gros moyens techniques et reste onéreuse du fait des importantes quantités de phosphogypse nécessaires. En effet, il faut 1 à 4 tonnes de phosphogypse pour traiter 1 ha de sol (Mutsaers and Van Der Velden 1973). Selon Ndiaye (1999), l'apport de gypse et de phosphogypse doit cependant se faire avec discernement en fonction du type de sol et de ses propriétés physiques et chimiques. Il faudrait notamment tenir compte de la teneur en aluminium échangeable pour les sols acides ou du taux de sodium échangeable ; dont le seuil limite pour un effet néfaste sur la structure du sol est de 10%-15% (Richards 1954). Il apparaît également que le phosphogypse contient des métaux lourds à faible concentration. Il s'agit surtout du plomb, du cadmium et du chrome. Or, ces métaux peuvent être toxiques pour les plantes, même à faible concentration (Ndiaye 1999).

Les actions biologiques, ont quant à elles surtout porté sur les possibilités d'afforestation des tannes et de leurs abords. La persistance du phénomène de salinisation des terres a été à l'origine des tentatives de reboisement des sols salés de la zone des Niayes (Mboro et Lac Tanma) et dans le Delta du fleuve Sénégal effectuées par le service des Eaux et Forêts dès

⁵ Le phosphogypse est issu de la fabrication de l'acide phosphorique.

1965 (Giffard 1970). L'objectif de ces reboisements était de valoriser ces terres marginales pour la production de bois de feu et de contribuer ainsi à la satisfaction de la demande d'une population en pleine croissance. Les recherches sylvicoles sur les sols salés du Sine-Saloum ont été entreprises par le CTFT en 1967, dans l'actuelle région de Kaolack, à Kabatoki, Koutal et Keur-Mactar en vue d'une part de l'utilisation sylvopastorale de ces terres salées et ; d'autre part, l'aménagement du paysage rural de cette région en réintroduisant l'arbre dans les préoccupations des paysans (Giffard 1972). Les recherches se sont orientées principalement vers la sélection d'essences forestières susceptibles de se développer sur des sols qui se caractérisent par un caractère halomorphe très marqué (présence de Solontchaks⁶), un caractère hydromorphe (sols inondés trois mois dans l'année). Il s'agissait entre autres des espèces tolérantes au sel comme *Tamaris* (*Tamarix* spp.), *Eucalyptus* (*Eucalyptus* spp.) et *Niaouli* (*Melaleuca* spp.). Les dix premières années de croissance ont suscité beaucoup d'espoir car les essences utilisées semblaient s'adapter au milieu. Mais la forte mortalité apparue par la suite a très fortement minimisé les chances de récupération des sols ; cependant, elle pose le problème de la connaissance préalable du niveau de salinité du milieu d'introduction et du seuil de tolérance des essences utilisées. Cela nécessitait d'une part une caractérisation des sites de reboisement afin de mettre en évidence les contraintes de croissance et des recherches sur la résistance des essences forestières. Les recherches menées sur le terrain de mai 1984 à octobre 1985 par l'ISRA/CNRF en collaboration avec l'ORSTOM révélèrent une grande complexité du milieu et une interaction des facteurs de croissance à tel point qu'il paraissait très difficile de mettre en évidence l'action de tel ou tel paramètre pédologique (Sadio 1986). Toutefois, le rôle très néfaste d'une salinité excessive et d'une forte acidité a été mis en évidence sur la mortalité des arbres et/ou le ralentissement de la croissance des arbres. Les autres facteurs tels que les réserves hydriques et la profondeur de la nappe n'intervenaient que secondairement. Tous ces facteurs semblent être conditionnés par le pédoclimat. En effet, le déficit pluviométrique provoqué par la période de sécheresse persistante a contribué à l'amplification de l'influence de la salinité et de l'acidité sur le comportement des arbres. Cependant, le comportement des arbres est plus lié à la nature de l'essence qu'au site ; car quel que soit le site considéré, le seuil de tolérance est le même pour une essence donnée.

⁶ Solontchaks, le mot vient du Russe *Sol* (sel) et *chak* (secteur salé). Sol salé, couvert d'efflorescences de sel.

Les résultats obtenus par la suite entre 1979 et 2004 à travers plusieurs projets et programmes intervenant dans la zone (Projet de Reboisement Communautaire dans le Bassin Arachidier, PRECOBA ; Projet Autopromotion et Gestion des Ressources Naturelles au Sine-Saloum, PAGERNA ; Programme de Restauration Agronomique des Sols Salés, PARSS ; etc ...) ont montré que plusieurs espèces locales ou exotiques (*Melaleuca* spp., *Acacia* spp., *Prosopis* spp., *Eucalyptus* spp., *Casuarina* spp., *Tamarix* spp...) pourraient être utilisées pour reboiser les zones affectées par la salinité et contribuer à la satisfaction des besoins en bois des populations. En fait, de nombreuses espèces végétales, halophiles en particulier, ont développé des mécanismes anatomiques, morphologiques et physiologiques pour s'adapter et se développer dans ces zones salées (Zou et al. 1995). Cependant, la réintroduction de ces plantes, associées à une bonne gestion des communautés de symbiotes microbiens (bactéries fixatrices d'azote, champignons mycorhiziens, bactéries solubilisatrices de phosphate), pourrait être un outil biotechnologique efficace pour la reconstitution des écosystèmes dégradés (Diouf et al. 2005; Dommergues 1995; Requena et al. 2001; Thrall et al. 2005).

Le stress salin induit une grande diversité de changements physiologiques et biochimiques chez les plantes (Al-Karaki 2001; Lambers 2003). L'effet du sel sur les plantes se traduit plus particulièrement par une réduction de la disponibilité de l'azote (Menge and Kirkby 1982; Munns 1993; Serraj 2002). De ce point de vue, les légumineuses sont très importantes dans le processus de réhabilitation des terres dégradées, grâce à leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique, résultant d'une association naturelle entre elles et les rhizobiums. La capacité des espèces d'*Acacia*, telle qu'*Acacia seyal*, à s'établir sur des sols pauvres et inadaptés à d'autres espèces serait en partie liée à leur aptitude à réaliser une symbiose efficace avec des bactéries fixatrices d'azote et des champignons mycorhiziens présents naturellement dans leur rhizosphère⁷ (Allen and Allen 1981; Dommergues 1995; Doran and Turnbull 1997; Fougny et al. 2007). Ces processus microbiens peuvent être exploités dans la réhabilitation des sols affectés par la salinité avec des espèces tolérantes au sel *via* les techniques d'inoculation microbienne contrôlée (Duponnois et al. 2007; Giri et al. 2007). Par ailleurs, l'effet de ces phénomènes symbiotiques ne se limite pas à leur influence sur la croissance de la plante mais a aussi de profondes implications dans le fonctionnement des

⁷ La rhizosphère est la région du sol directement formée et influencée par les racines et les micro-organismes associés.

cycles biogéochimiques du sol. En conséquence, les champignons mycorhiziens et les bactéries fixatrices d'azote sont des composantes essentielles dans le fonctionnement durable des écosystèmes (Amato and Ladd 1988; Dickie et al. 2007; Dommergues 1995; Hart et al. 2003). Leur installation peut également faciliter la colonisation des sites dégradés par des espèces moins adaptées.

PROBLEME DE RECHERCHE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

DEFINITION DU PROBLEME DE RECHERCHE

Dans les basses vallées du Sine et du Saloum, la salinisation a eu pour conséquence de fortes pressions sur les terres cultivables et la disparition de la végétation sur de grandes superficies. Cependant, au sein de ces écosystèmes particuliers se développent de grandes plaines à graminées dominées par des espèces de *Sporobolus sp.* et de *Leptochloa fusca*, souvent associées à des îlots d'*A. seyal* (Figure 3). Cette légumineuse tropicale, hautement fixatrice d'azote (Ndoye et al. 1995), s'associe également à des champignons mycorhiziens (Manga et al. 2007) et pourrait jouer un important rôle dans le cycle de l'azote. De plus, elle peut se développer à la fois sur des sols salés et non salés. Ces adaptations naturelles font qu'elle est potentiellement utile pour des applications écologiques, en matière d'agroforesterie, d'aménagement paysager ou de réhabilitation des tannes.



Figure 3 : Un arbre d'*Acacia seyal* dans une tanne entouré de graminées (*Sporobolus sp.*) dans les basses vallées du Sine (Foundiougne – Région de Fatick). © D. Diouf

Aussi, la prospection de la diversité symbiotique naturelle des légumineuses sauvages adaptées à ces biomes est la première étape d'une telle approche. Cependant, en dépit de l'importance agronomique et écologique d'*A. seyal*, les informations concernant la diversité et les propriétés symbiotiques des souches de rhizobium nodulant cette espèce sont peu nombreuses et fragmentaires (de Lajudie et al. 1998b; Diaw-Guene et al. 1998; Odee et al. 2002).

La sélection de rhizobiums pour une symbiose effective en milieu salin nécessite deux critères : la tolérance du rhizobium et de la plante hôte au sel et l'effectivité du rhizobium en présence de la plante hôte en conditions de stress salin. *A. seyal* est largement répandue dans les steppes côtières du Sénégal affectées par le sel ; où la conductivité électrique (CE)⁸, dominée par des ions de chlorure de sodium, est comprise entre 8 et 130 dS/m (Barbiero et al. 2004). Toutefois, peu d'informations sont disponibles sur son niveau de tolérance au sel. A notre connaissance très peu de travaux ont été consacrés à la symbiose *A. seyal*-rhizobium en conditions de contrainte saline. Les travaux relatifs à l'effet du sel sur les paramètres symbiotiques d'espèces d'*Acacia* spp. sont relativement rares et concernent essentiellement des acacias australiens (Craig et al. 1991; Diouf et al. 2005; Hatimi 1999).

De même, si l'on envisage de réintroduire dans un sol salé une espèce fixatrice d'azote en présence de rhizobiums sélectionnés tolérants au sel et effectifs pour l'espèce, il semble indispensable de contrôler qu'ils soient également compétitifs vis-à-vis des souches natives du sol.

HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'hypothèse de ce travail est la suivante : La symbiose fixatrice d'azote joue un rôle dans les qualités d'adaptation d'*A. seyal* aux sols salés, du moins durant les premiers stades de développement. Cependant, les caractéristiques physico-chimiques du sol influencent la diversité des souches de rhizobiums présents naturellement dans sa rhizosphère et le fonctionnement de la symbiose *A. seyal*-rhizobium.

⁸ La conductivité électrique est l'aptitude d'un matériau à laisser les charges électriques se déplacer librement, autrement dit à permettre le passage du courant électrique. La salinité est depuis 1978 officiellement mesurée à partir de la conductivité électrique de l'eau à une certaine température et pression.

Le principal objectif de ce travail est de mettre en évidence la diversité des rhizobiums associés à *A. seyal* dans les basses vallées du Sine et du Saloum et de montrer l'importance des communautés microbiennes symbiotiques sur la tolérance au stress salin d'*A. seyal*. De ce fait, les objectifs spécifiques sont :

- ❖ la détermination en conditions contrôlées du potentiel infectieux rhizobien des sols des basses vallées du Sine et du Saloum ;
- ❖ la caractérisation de la diversité génétique, phénotypique et symbiotique des rhizobiums associés à *A. seyal*;
- ❖ la description des interactions entre les caractéristiques du sol sur les activités microbiennes ;
- ❖ la détermination de l'impact de l'inoculation microbienne sur le fonctionnement de la symbiose *A. seyal*-rhizobium et la tolérance au stress salin des plants d'*A. seyal*.

Le premier chapitre présente l'influence des conditions écologiques sur (i) le potentiel infectieux rhizobien des sols des basses vallées du Sine et du Saloum et (ii) la diversité des rhizobiums autochtones associés à *A. seyal*. Ainsi, dans un premier temps nous avons examiné le potentiel de nodulation sur *A. seyal* des bactéries de divers échantillons de sols. Ensuite, nous avons analysé le polymorphisme génétique des populations de rhizobiums associés à *A. seyal* dans les basses vallées du Sine et du Saloum. Une seconde étude a été réalisée ; cette fois-ci en séquençant les gènes codant pour l'ARNr 16S et l'IGS 16S-23S, à l'effet de préciser la position phylogénétique les génotypes de rhizobia identifiés par PCR-RFLP.

Afin d'apporter des compléments d'interprétation au chapitre I, nous avons exploré dans le chapitre II les caractéristiques phénotypiques des rhizobiums associés à *A. seyal* et la diversité des gènes *nodA*, *nodC* et *nifH*, choisis comme des indicateurs de la nodulation et de la fixation de l'azote. En outre, une expérience a été réalisée en serre sur des sols non désinfectés, afin de déterminer l'efficacité de l'inoculation avec des souches de *Mesorhizobium* sp., isolées à partir des nodules d'*A. seyal*, sur le développement précoce de leur hôte. En effet, les qualités d'adaptation et de compétition des microsymbiotes associés à *A. seyal* en conditions de stress salin peuvent être déterminantes dans la réponse des

plantes à l'inoculation. Ces qualités restent également nécessaires pour assurer un effet durable de l'inoculation au champ. Nous avons testé cette hypothèse dans le chapitre II.

Les niveaux de tolérance au sel sont variables pour les plantes hôtes et leurs symbiotes ; la nodulation des espèces d'*Acacia* nécessite une plus faible concentration de sel que les niveaux de tolérance des rhizobiums. Par conséquent, la sélection pour la tolérance au sel des deux partenaires est une stratégie appropriée pour le reboisement forestier dans des environnements salins. Dans le chapitre III, nous avons évalué la diversité fonctionnelle des communautés des sols de 4 peuplements naturels d'*A. seyal*, afin de déterminer le rôle éventuel des paramètres physiques et chimiques du sol sur son biofonctionnement. Dans le chapitre IV, nous avons évalué le niveau de tolérance au sel d'*A. seyal*, au moment de la germination et au stade juvénile. Les effets de la salinité sur la germination des graines d'*A. seyal*, la croissance, la nodulation et l'assimilation du carbone et de l'azote de plants d'*A. seyal* ont été déterminés.

Les techniques d'inoculation microbienne contrôlée avec des espèces de plantes tolérantes au sel pourraient être exploitées pour la réhabilitation des sols affectés par la salinité. Parmi les communautés microbiennes de la rhizosphère, les champignons mycorhiziens et les bactéries fixatrices d'azote sont des composantes essentielles du fonctionnement durable des écosystèmes. Dans le chapitre V, nous avons étudié l'influence des facteurs biotique (co-inoculation avec des souches de rhizobium sélectionnées et des champignons mycorhiziens arbusculaires) et abiotique (stress salin) sur l'efficacité des souches de rhizobiums d'*A. seyal*. L'impact de ces facteurs sur les paramètres morphométriques (croissance et nodulation) et éco-physiologiques (efficacité de la nutrition minérale) de plants d'*A. seyal* inoculés a été déterminé.

Dans une dernière partie, les résultats ont été discutés et les conclusions générales de l'ensemble de ces travaux sont exposées ainsi que les perspectives se profilant à l'issue des résultats obtenus.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE : GENERALITES

1.1. Importance de l'azote dans la nutrition des plantes

L'élément chimique « azote⁹ » est (avec le carbone, l'oxygène et l'hydrogène) un des composants principaux du Vivant et des écosystèmes ainsi que des agrosystèmes (Figure 4).

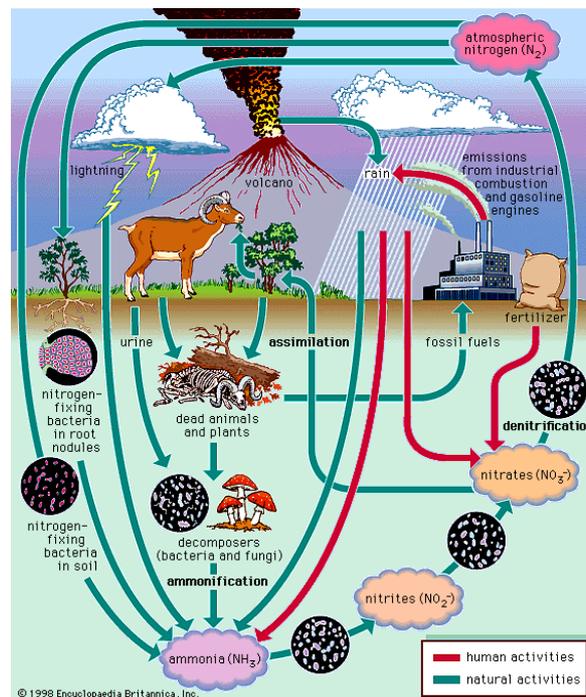


Figure 4 : Le cycle de l'azote. Les flèches rouges indiquent les sources d'azote issues des activités humaines. Les flèches vertes indiquent les transformations naturelles de l'azote (processus microbiens, forces physiques et chimiques).

L'azote est un composant essentiel des protéines et des acides nucléiques (Epstein and Bloom 2005). C'est l'un des principaux acteurs de la synthèse chlorophyllienne. Il est l'un des éléments nutritifs majeurs utilisés par les plantes. La nutrition azotée favorise la photosynthèse, stimule le développement et l'activité racinaire, contribuant ainsi à l'absorption des autres éléments minéraux et à la croissance des plantes (Stevenson 1986).

⁹ Lavoisier a choisi le nom *azote*, qui signifie « privé de vie », du fait que contrairement à l'oxygène, il n'entretient pas la vie des animaux.

L'azote est présent dans le sol sous diverses formes (engrais minéraux ou organiques, azote atmosphérique). Les plantes absorbent l'azote sous forme de nitrates (NO_3^-) et d'ammonium (NH_4^+). L'importance relative de chacune de ces formes dépend de l'espèce végétale et des conditions environnementales. Cependant, les organismes végétaux et animaux supérieurs ne peuvent intégrer l'azote de l'air dans leur métabolisme. Ce processus est appelé « fixation biologique de l'azote »

3.2. Généralités sur la fixation biologique d'azote

Sous sa forme gazeuse, l'azote désigne le gaz diatomique (diazote, N_2), constituant majoritaire de l'atmosphère terrestre, représentant presque les 4/5^e de l'air (78,06 %, en volume). La fixation biologique de l'azote est une propriété strictement limitée aux procaryotes¹⁰ (Hardy and Knight 1968). Si l'on considère l'arbre phylogénétique des organismes vivants (basé sur la séquence d'ADN ribosomique 16S, Figure 5), on constate que les microorganismes fixateurs d'azote appartiennent à deux des trois règnes primaires : les archaebactéries et les eubactéries (Young 1992). Ceci laisse supposer que la fixation de l'azote est une propriété très ancienne des microorganismes et qu'elle aurait joué un rôle important dans l'établissement et le maintien de la vie sur terre.

Dans les classifications actuelles des procaryotes, les micro-organismes fixateurs d'azote occupent des positions phylogénétiques proches de celles des micro-organismes non fixateurs (Figure 6) (Kneip et al. 2007; Sawada et al. 2003; Woese et al. 1990). De tels liens suggèrent que la fixation d'azote est une propriété qui a été acquise et/ou perdue par les micro-organismes, *via* notamment des phénomènes de transfert latéral de gènes (Bailly et al. 2007; Provorov 1998).

¹⁰ Un procaryote fait référence à une structure cellulaire particulière, sans noyau ni autres organites, et s'opposant à la structure eucaryote.

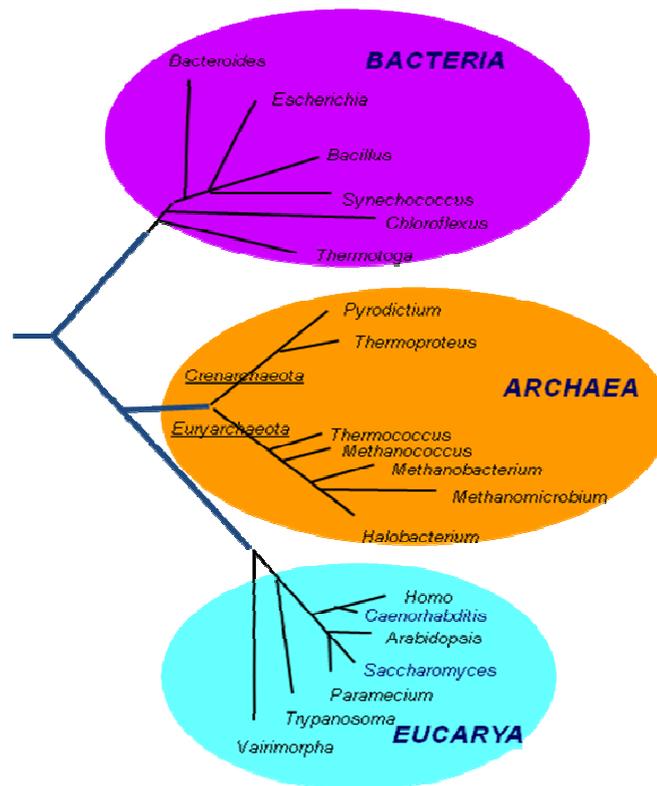


Figure 5 : Arbre phylogénétique universel obtenu à partir d'analyses comparatives de séquences ARNr. La racine a été déterminée en utilisant le couple de gènes paralogues EF-Tu/EFG (Woese 2000).

Chez les eubactéries, la fixation d'azote est associée à une large diversité de métabolismes, des anaérobies aux aérobies, des phototrophes aux chimio-organotrophes (Blondeau 1980).

Certaines bactéries dites fixatrices libres vivent à l'état libre dans le sol et les eaux et assurent la fixation de l'azote sans être associées à d'autres organismes. Les fixateurs libres comprennent des genres variés : bactéries aérobies chimio-organotrophes (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*), bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) ou aérobies facultatives (*Klebsiella*, *Bacillus*, *Rhodospirillum*) et des cyanobactéries (*Synechococcus*).

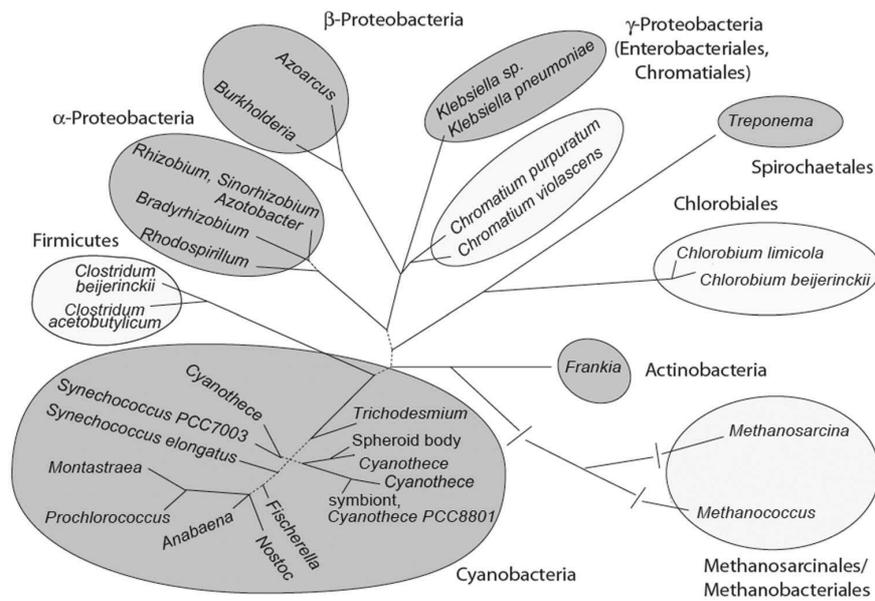


Figure 6 : Relations phylogénétiques entre bactéries fixatrices d'azote symbiotiques et non symbiotiques. Les groupes contenant des espèces symbiotiques sont signalés en gris, les groupes non symbiotiques sont entourés d'ellipses blanches. Les branches avec moins de 70% de valeur de bootstrap non paramétrique dans les analyses des intergroupes de taxons (428 pb) sont en pointillés (Kneip et al. 2007).

D'autres bactéries dites fixatrices symbiotiques vivent en symbiose avec des plantes. Ces fixateurs symbiotiques sont beaucoup plus efficaces en termes de fixation d'azote et comprennent notamment les bactéries capables d'induire la formation de structures particulières différenciées, les nodosités (nodules en anglais), sur leurs plantes hôtes. Il existe deux groupes de bactéries symbiotiques, les bactéries unicellulaires gram¹¹ négatif collectivement appelées rhizobiums, qui forment des nodules de racines ou parfois de tiges chez de nombreuses légumineuses (ou Fabacées), et les bactéries filamenteuses gram positif du genre *Frankia* qui nodulent diverses espèces d'angiospermes, essentiellement des arbres et des arbustes, notamment les *Alnus*, *Eleagnus*, *Casuarina* ou *Myrica* (Benson and Silvester 1993). Un troisième groupe de bactéries symbiotiques plus restreint est représenté par quelques cyanobactéries du genre *Nostoc* qui forment des symbioses intracellulaires avec les plantes du genre *Gunnera* (Chiu et al. 2005; Meeks and Elhai 2002).

¹¹ La coloration de Gram permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Elle doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui mit au point le protocole en 1884.

Chez les Archées, la fixation d'azote est commune aux groupes des méthanogènes et des halophiles. Cependant, cette fonction n'est pas systématique. Aucun fixateur d'azote n'a été décrit chez les archaebactéries croissant obligatoirement sur milieu soufré.

2. La symbiose fixatrice d'azote Légumineuse-rhizobium

De nombreuses plantes de la famille des légumineuses peuvent développer des nodules sur leurs racines et établir une relation symbiotique fixatrice d'azote avec des bactéries du sol communément appelées rhizobiums. La symbiose¹² Légumineuse-rhizobium est actuellement la symbiose la plus étudiée et la mieux connue, tant au niveau écologique et agronomique que moléculaire (Doyle and Luckow 2003; Lafay and Burdon 2007; Martinez-Romero 2009; Sprent 2007; Sprent and James 2008).

Les rhizobiums vivent dans une relation mutualiste avec des légumineuses; où la bactérie fournit à la plante hôte une forme d'azote assimilable (NH_4^+), rendant ainsi la plante autotrophe pour l'azote atmosphérique et en retour cette dernière lui procure un micro-habitat favorable, ainsi que de l'énergie et des substrats carbonés issus de la photosynthèse (Dommergues et al. 1999). Ces échanges entre les deux partenaires symbiotiques se réalisent au niveau d'un organe différencié appelé nodosité ou nodule qui se forme au niveau racinaire ou parfois caulinaire (Dreyfus et al. 1988).

3.3. Origine et apparition de la symbiose fixatrice d'azote

En supposant une origine des légumineuses il y a 60 millions d'années (Ma) (Lavin et al. 2005), il eut par la suite de grands changements climatiques, en particulier une subite augmentation de l'humidité et de la température de 5-10 °C, accompagnée d'une importante libération de méthane et de dioxyde de carbone à partir des sédiments des fonds marins (Bowen et al. 2004; Sluijs et al. 2006). Du fait que le processus de fixation de l'azote utilise une importante quantité du carbone fixé par la plante hôte, un excès de dioxyde de carbone associé à un déficit d'azote combiné pourrait être à l'origine de la fixation de l'azote, il y a environ 58 Ma (Bowen et al. 2004; Sprent 2007). La nodulation serait ainsi apparue, il y a environ 58 Ma (Sprent 2007). Il semblerait que les rhizobiacées ont

¹² Le terme symbiose fut proposé par le botaniste allemand Heinrich Anton de Bary en 1879, et décrivait alors la vie en association d'organismes différents. Cette définition incluait des symbioses obligatoires (parasitisme, commensalisme) ou non-obligatoires (mutualisme, coopération).

recruté la voie de signalisation des mycorhizes et que l'organogénèse du nodule serait dérivée du programme génétique de l'organogénèse des racines secondaires (Hirsch et al. 2001).

3.4. Evolution des symbioses fixatrices d'azote

La nodulation n'est ni universelle parmi les légumineuses, ni limitée à cette famille ; bien qu'elle soit la première chose qui vient à l'esprit lorsque les légumineuses sont mentionnées. Au contraire, sa répartition est complexe, et a jusqu'à présent défié toute explication simple de son origine dans la famille des légumineuses ou parmi les plantes à fleurs (Sprent 2001; Sprent and James 2008).

Une analyse phylogénétique¹³ des séquences de gènes¹⁴ chloroplastiques a montré que les légumineuses et les plantes actinorhiziennes (nodulées par *Frankia* spp.) appartiennent au clade des Rosides I (Soltis et al. 2000; Soltis et al. 1995). Toutefois, l'existence d'une prédisposition pour la nodulation de cette lignée, n'a pas été clairement établie (Hirsch et al. 2001). Les familles de plantes fixatrices d'azote de ce clade ne semblent pas partager un ancêtre commun. Les plantes qui nodulent avec des rhizobiums, ne se retrouvent que chez les Fabales, à la seule exception de l'espèce *Parasponia* de la famille des *Ulmaceae* (Trinick and Galbraith 1976). Cependant, les membres de cette famille ne sont pas plus étroitement liés aux *Leguminosae* qu'à aucune autre famille de dicotylédones. Ainsi, aucun sens phylogénétique ne peut être donné à ce phénomène de nodulation qui aurait certainement surgi tout à fait de manière indépendante entre et même au sein des familles (Young and Johnston 1989). Il est probable que la capacité à former des nodules soit apparue plusieurs fois et indépendamment au cours de l'évolution. Cette aptitude aurait aussi été perdue plusieurs fois, par exemple pour l'adaptation à des sols plus fertiles. Cette hypothèse permet d'expliquer la présence de plantes non nodulées à l'intérieur du clade des plantes à nodules (de Faria et al. 1989).

Diverses herbes, dont certaines d'importance agronomique, telles que la canne à sucre (*Saccharum officinarum*), le maïs (*Zea mays*) et le riz (*Oryza sativa*) s'associent avec

¹³ La phylogénie est l'histoire évolutive déduite d'organismes apparentés.

¹⁴ Le gène détermine la structure d'une protéine ou d'un ARN.

différentes bactéries fixatrices d'azote, parmi lesquelles des espèces de *Glucoacetobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum* et *Azoarcus*. Cependant, ces associations n'entraînent pas la formation de nodules. Certaines des réponses positives notées sur la croissance des plantes par ces interactions fixatrices d'azote seraient dues à la production de phytohormones, mais la fixation d'azote a également été démontrée (Sevilla et al. 2001).

3. Les partenaires symbiotiques

3.5. Les légumineuses

3.1.1. Evolution des légumineuses

Dans cette revue, nous adopterons la terminologie de Lewis et ses collaborateurs, en utilisant les *Leguminosae*, plutôt que les *Fabaceae*, pour désigner toute la famille (Lewis et al. 2005). De récentes études moléculaires sur des légumineuses fossiles, ont révélé que les légumineuses ont probablement évolué il y a environ 60 Ma, au début de la période tertiaire et après l'extinction du crétacé¹⁵ ou l'extinction K/T (Lavin et al. 2005; Sprent 2007). De nombreuses autres familles d'angiospermes apparurent également durant cette période (Schrire et al. 2005).

Le centre d'origine des légumineuses se situerait dans l'Hémisphère nord (Laurasie) (Lavin et al. 2005), contrairement à une vieille hypothèse de l'évolution qui plaçait leur origine dans l'Ouest du Gondwana (austrotropical). En effet, les légumineuses ne sont pas aussi bien représentées dans les flores fossiles en Amérique du Sud et en Afrique. Cependant, cette situation pourrait plus refléter un faible échantillonnage et/ou de mauvaises conditions de conservation par rapport à l'hémisphère nord, plutôt qu'une distribution restreinte de la famille dans l'hémisphère sud (Doyle and Luckow 2003).

Contrairement à une ancienne hypothèse décrivant un mouvement de propagation direct entre l'Amérique du Sud et l'Afrique (exclue parce que la séparation des continents aurait eu lieu bien avant l'évolution des légumineuses, il y a environ 100 Ma), l'on croit maintenant que les légumineuses se seraient propagées à partir de leur centre d'origine vers le Nord des Amériques, via le boréotropiques et puis vers le sud pour atteindre l'Asie et l'Afrique (Doyle

¹⁵ L'Extinction du Crétacé, qui s'est produite il y a 65,5 Ma environ, fut une extinction massive d'espèces animales et de plantes, à grande échelle et dans une courte période de temps à l'échelle géologique.

et al. 2000; Sprent 2007). Leur dispersion se serait faite par voie d'eau sur de grandes distances, éventuellement d'une île à une autre (Pennington et al. 2006) ou par des phénomènes météorologiques extrêmes tels que des cyclones tropicaux (Nathan 2006). Cela pourrait expliquer la proximité notée entre certaines espèces d'*Acacia* d'Amérique du Nord et du Sud et à celles d'Afrique (Sprent 2007).

3.1.2. Diversité des légumineuses

Les légumineuses appartiennent à la famille des *Leguminosae* (ou *Fabaceae*) à l'ordre des Fabales. Elles forment la troisième famille par ordre d'importance chez les Angiospermes avec près de 20000 espèces (Doyle 1994). C'est l'une des familles les plus diversifiées du groupe des plantes supérieures et comprend des espèces ligneuses et des herbacées. Elles se subdivisent en 3 sous-familles de tailles très inégales (Polhill et al. 1981): les *Caesalpinioideae*, les *Mimosoideae* et les *Papilionoideae*. Les *Caesalpinioideae* forment un groupe très divers de 162 genres et environ 3000 espèces d'arbres et d'arbustes des régions intertropicales (Doyle and Luckow 2003); les *Mimosoideae*, avec 77 genres et environ 3000 espèces, qui sont pour la plupart des arbres et arbustes des régions intertropicales; les *Papilionoideae*, de loin les plus nombreux avec 476 genres et environ 14000 espèces réparties sur tout le globe et constituent l'essentiel des plantes herbacées des régions tropicales et tempérées (de Faria et al. 1989).

Les légumineuses sont très diverses dans leur morphologie, leur habitat, et leur écologie (Doyle and Luckow 2003). Cependant, une des particularités de la plupart de ces plantes réside dans leur capacité à s'associer avec des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote. Sur la totalité des légumineuses recensées, seuls 20% ont été examinés pour leur aptitude à induire une nodulation (Allen and Allen 1981). Parmi les trois sous-familles de légumineuses, la nodulation est rare chez les *Caesalpinioideae* (environ 23% des espèces examinées). Par contre, 97% des espèces examinées chez les Papilionacées et 90% chez les Mimosacées sont capables de noduler (Allen and Allen 1981; de Faria et al. 1989; Doyle et al. 1997).

3.6. Les rhizobiums

3.1.3. Taxonomie des rhizobiums

Les rhizobiums appartiennent à la famille des Rhizobiacées (Jordan 1984), qui renferme un ensemble hétérogène de bactéries en bâtonnet, à Gram négatif, aérobies et non sporulantes (Dommergues et al. 1999). Ils constituent une faible proportion des bactéries du sol. Cependant, les méthodes de recensement des rhizobiums et de mesure de leur diversité ne donnent généralement pas une description exacte. Leur nombre pourrait être sous-estimé et leur diversité pourrait également être masquée en raison d'écarts causés par le choix de l'hôte pour les piéger du sol (Duodu et al. 2006) et les facteurs physiques et chimiques du sol (Sadowsky and Graham 1998). Ainsi, la plus grande diversité de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* a été observée dans les sols labourés par rapport aux sols enherbés (Palmer and Young 2000). Aussi, les résultats d'une étude des profils plasmidiques d'isolats de rhizobiums de différentes espèces de *Sesbania* de sites écologiquement distincts suggèrent une plasticité du pool génétique des rhizobiums en réponse aux changements d'environnements permettant aux rhizobiums à s'adapter à l'hétérogénéité de l'habitat (Mohammed et al. 2001).

3.1.3.1. Les différentes approches taxonomiques

La diversité des rhizobiums peut être évaluée par différentes approches taxonomiques. Par le passé, la taxonomie¹⁶ reposait principalement sur des caractères phénotypiques et chimiotaxonomiques (Graham et al. 1991). La classification des rhizobiums fait souvent appel à des caractères génétiques (hybridation ADN-ADN, séquençage des ADNr 16S, séquençage de divers gènes...), mais elle est actuellement basée sur une approche polyphasique (de Lajudie et al. 1994; Jarvis et al. 1997; Vandamme et al. 1996), qui semble être la mieux adaptée.

3.1.3.2. Taxonomie phénotypique

Jusqu'au début des années 1960, toute la taxonomie bactérienne reposait sur une classification phénotypique proposée par Ferdinand Cohn en 1872. Elle était basée sur des

¹⁶ Taxinomie (taxonomie) : Science qui a pour objet de décrire les organismes vivants (ou ayant vécu) et de les regrouper en entités appelés taxons (familles, genres, espèces, etc.) afin de pouvoir les nommer (nomenclature) et les classer (systématique).

caractères morphologiques (forme des bactéries, présence ou absence de flagelle, nature de la paroi, ...), physiologiques (type métabolique, source d'énergie, de carbone, d'azote, type de substrat utilisé, capacité à produire certaines molécules ou métabolites secondaires...), des critères de sérogroupage (immunofluorescence et test ELISA). Cependant, une classification phénotypique a l'inconvénient de ne refléter qu'une faible quantité d'informations. De plus, le choix des critères qualifiés "d'importants" est subjectif et il peut varier d'un auteur à un autre ce qui est une source potentielle d'instabilité. Par ailleurs, le concept d'inoculation croisée, aujourd'hui presque abandonné, définit les espèces végétales en fonction de leurs symbiotes partagés ; et a pendant longtemps été utilisé comme critère pour la classification des rhizobiums. Toutefois, cette idée a été contestée parce que de nombreux chevauchements de spectre d'hôtes ont été observés ; et des réponses différentes de plantes à l'inoculation avec des bactéries ont jeté le doute sur sa validité. En effet, une seule légumineuse, par exemple *Acacia*, *Glycine max* ou *Leucaena* peut être associée à des microsymbiotes génétiquement éloignés (Martinez-Romero et al. 1991). L'échange de gènes entre microsymbiotes peut modifier le spectre d'hôtes de deux biovars. Cependant, les tests de nodulation des plantes sont très importants, car ils permettent de prédire leur aire de répartition, en cas de reboisement, sur la base de la caractérisation de la structure moléculaire des signaux qui régissent la nodulation. Néanmoins, il est apparu que les rhizobiums sont très diversifiés, tant du point de vue de leurs spectres d'hôtes que de leurs propriétés physiologiques. Young et Haukka ont montré une certaine corrélation entre les deux caractères (1996).

3.1.3.3. Taxonomie numérique

En 1763, le botaniste français Michel Adanson proposait une méthode de classification qui tenait compte de l'ensemble des caractères d'un organisme. En 1957, Sneath appliqua une méthode similaire aux bactéries et développa une taxonomie qualifiée de numérique ou d'adansonienne (Sneath 1957; Sokal and Sneath 1963). La méthode consiste à étudier, pour chaque souche, un grand nombre (minimum 50) de caractères (caractères morphologiques, biochimiques, culturels, chimiotaxonomiques, tests d'inhibition, sérologiques, génétiques, etc.) semblables et dissemblables et à attribuer le même poids à chacun des caractères qui sont codés « 1 » (présence du caractère) ou « 0 » (absence du caractère). Le but recherché est de rassembler dans une classe de similitude (unité taxonomique opérationnelle ou OTU)

les individus les plus semblables. La similitude globale entre les souches bactériennes est fonction de la similitude des nombreux caractères sur lesquels est fondée la comparaison. Alors, les taxons sont construits sur la base de diverses corrélations de caractères des groupes étudiés. Cependant, même en multipliant le nombre de caractères étudiés (jusqu'à 300 dans certaines études), la taxonomie numérique n'évalue qu'une partie du potentiel génétique d'une bactérie. De plus, l'attribution du même poids aux différents caractères pose problème. Certains taxonomistes considèrent que certains caractères sont plus importants que d'autres dans la classification (Sepkoski 1974).

3.1.3.4. Taxonomie moléculaire

Les méthodes génotypiques sont celles qui sont basées sur les molécules d'ADN ou d'ARN. Sans doute, ces méthodes modernes dominent actuellement les études taxonomiques comme une conséquence du progrès technologique, mais surtout parce que la position actuelle des bactériologistes sur la classification est qu'elle doit refléter les relations naturelles telles qu'elles sont codées par l'ADN.

Détermination du pourcentage guanine + cytosine (% G + C)

Chargaff a montré que le contenu en bases puriques (G = guanine, A = adénine) et en bases pyrimidiques (C = cytosine, T = thymine) de l'ADN pouvait varier d'un organisme à un autre, mais qu'il était relativement constant pour les individus d'une même espèce (Chargaff 1950). Le contenu en base d'un ADN est exprimé par le % G + C qui est défini comme suit (chaque base étant exprimée par sa concentration molaire) : $\% G + C = [(G + C) \times 100 / (A + T + G + C)]$. Les déterminations du % G + C, sont utilisées comme techniques complémentaires d'identification des bactéries (Birdsell 2002; Wayne et al. 1987). Le % G + C varie de 24 à 76 % chez les bactéries (Vandamme et al. 1996). Généralement, on admet que des bactéries dont les % G + C diffèrent de plus de 3% ne devraient pas appartenir à une même espèce et que celles dont les % G + C diffèrent de plus de 10 % ne devraient pas appartenir à un même genre (Stackebrandt and Liesack 1993).

Hybridations d'acides nucléiques

La technique d'hybridation ADN-ADN (ou ADN-ARNr) est un principe de biologie moléculaire, fondé sur le phénomène de renaturation de l'ADN et les propriétés d'appariement des bases complémentaires d'acides nucléiques (De Ley et al. 1970; Marmur and Doty 1961). C'est, entre autres, le principe utilisé pour la phase de visualisation pour la technique northern blot ou Southern blot¹⁷. Dans les techniques classiques, l'un des ADN est généralement marqué par un isotope radioactif ou par une enzyme afin de reconnaître la provenance de chaque brin d'ADN dans les hybrides. Cette technique permet de comparer la totalité du génome bactérien, d'estimer le degré d'homologie entre deux bactéries et de déterminer ainsi le lien de parenté entre espèces (Cho and Tiedje 2001; Rossello-Mora 2006). Les hybridations ADN-ADN se sont révélées essentielles pour la définition d'une espèce bactérienne. Elles sont utilisées pour définir les espèces et dans une moindre mesure les genres. En revanche, elles n'ont que peu d'utilité pour classer des bactéries dans un rang hiérarchique supérieur au genre. Une valeur d'hybridation ADN-ADN de 70% a été proposée comme norme recommandée pour la délimitation des espèces (Wayne et al. 1987).

Cependant, cette technique présente de nombreux inconvénients notamment avec des quantités relativement importantes d'ADN de grande qualité nécessaires (en comparaison avec les techniques de PCR), un temps relativement long et une faible reproductibilité (Goris et al. 2007; Huss et al. 1983; Stackebrandt et al. 2002). Les hybridations ADN-ADN ne peuvent pas être utilisées pour comparer des bactéries très différentes. Son principal inconvénient, cependant, est qu'en raison de la nature comparative de la technique aucune base de données conséquente ne peut être construite, contrairement aux séquences génétiques (Gevers et al. 2005; Stackebrandt et al. 2002). Les termes de "*polyphasic taxonomy*" ou taxonomie mixte et consensuelle ont été introduits en 1970 par Colwell pour faire référence à une classification qui tient compte d'un maximum de données : données génétiques, données phénotypiques, données chimiotaxonomiques, données écologiques (Vandamme et al. 1996).

¹⁷ Les différents types de transfert (un ADN, un ARN ou une protéine) sur une matrice d'immobilisation sont nommés selon la sonde et/ou les molécules sondées: transfert de Southern: ADN/ADN), transfert de northern: ADN/ARNm, transfert de western: anticorps/protéine, southwestern blot (transfert de southwestern: ADN/protéine).

Séquençage

Malgré l'utilité de la détermination du contenu en G+C et des études d'hybridation ; les structures génomiques ne peuvent être comparées directement que par séquençage d'ADN ou d'ARN¹⁸. Le séquençage d'ADN est devenu aujourd'hui une partie importante de l'analyse génétique, avec des conséquences importantes non seulement pour la recherche fondamentale sur les processus biologiques fondamentaux tels que l'expression ou la régulation de gènes et la phylogénie, mais aussi pour la recherche appliquée, tels que les diagnostics et la thérapie génique. Jusqu'à présent c'est le séquençage du gène de l'ARNr (ARN ribosomique) qui a été le plus utilisé en taxonomie microbienne. Les séquences ARNr 5S et 16S sont les plus utilisées (Jensen et al. 1993; Woese and Fox 1977). Actuellement, la plupart des séquençages d'ADN sont réalisés par la méthode de Sanger (Sanger et al. 1977). Cette technique utilise la réaction de polymérisation de l'ADN avec une enzyme et des didésoxyribonucléotides (ddNTP).

Technologie des puces à ADN

La technologie des puces à ADN permet de fixer sur une petite plaque de verre, de silicium ou de plastique autant de brins d'ADN provenant de gènes différents de ce que l'on veut étudier. Cette biotechnologie récente permet d'analyser le niveau d'expression des gènes (transcrits) dans une cellule, un tissu, un organe, un organisme ou encore un mélange complexe à un moment donné et dans un état donné par rapport à un échantillon de référence. Généralement, après une étude de puce à ADN, la bioinformatique extrait une liste de gènes intéressants (en fonction de ce que l'on cherche). Pour confirmer ces gènes on fait appel à la technique de qPCR encore appelée PCR quantitative ou encore appelée RT-PCR pour *Real-Time PCR* (PCR en temps réel).

¹⁸ acide ribonucléique (ARN). Polymère d'acide organique composé de nucléotides tels que l'adénosine, la guanosine, la cytidine et l'uridine. C'est la molécule qui dérive de l'ADN par transcription et qui porte l'information (ARN messenger), donne une structure subcellulaire (ARN ribosomique) ou transporte les acides aminés (ARN de transfert). Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné.

3.1.4. Techniques de classification des micro-organismes

Les techniques d'électrophorèse¹⁹ comparative des protéines cellulaires totales, la comparaison des zymogrammes (électrophorèse sur gel en absence de SDS) et l'immunoélectrophorèse ont pendant longtemps été utilisées pour la caractérisation des bactéries. En outre, il est aussi possible de comparer l'information contenue dans les exopolysaccharides, les acides gras (Vauterin et al. 1996), les quinones (Collins and Jones 1981), les polyamines (Joshi et al. 2000) ou autres marqueurs chimiotaxonomiques. Les techniques actuelles de typage moléculaire reposent sur des profils (ou empreintes) d'amplification ou de restriction, ou combinant les deux. Quelques techniques utilisées en taxonomie sont classées, suivant le niveau de leur pouvoir discriminant à la figure 7.

¹⁹ Le principe de l'électrophorèse est de soumettre les échantillons à un champ électrique appliqué à travers une matrice poreuse. Les molécules vont migrer dans ces conditions avec une vitesse dépendante de leur charge électrique nette et/ou de leur poids moléculaire.

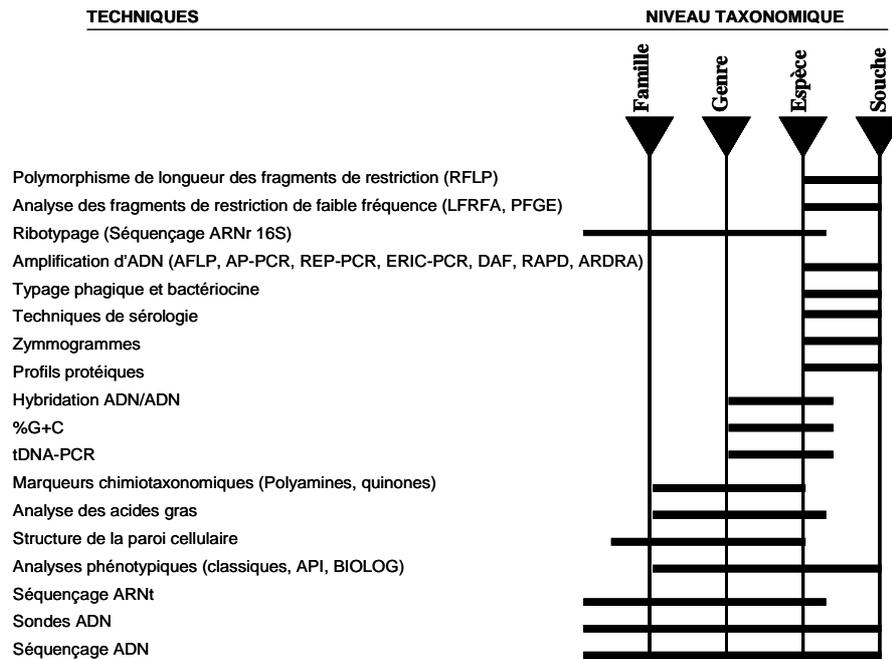


Figure 7 : Pouvoirs discriminants de différentes techniques de taxonomie des *Rhizobiaceae* (Vandamme et al. 1996). AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism ; AP-PCR : Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction; ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis; DAF: DNA Amplification Fingerprinting; ERIC-PCR: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR; FAME: Fatty Acid Methyl Ester; LFRFA: Low Frequency Restriction Fragment Analysis; PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis; RAPD ou «Random Amplified Polymorphic DNA» basée sur l'utilisation des amorces choisies au hasard, ERIC-PCR ou rep-PCR basée sur l'amplification de fragments à partir de séquences répétées du génome bactérien. Les fragments d'ADN de tailles différentes obtenus, seront séparés par électrophorèse en gel et les profils comparés par la suite. Ces techniques basées sur la PCR ont l'intérêt d'être simples et rapides (de Lajudie et al. 1998b; Judd et al. 1993; Laguerre et al. 1994). Elles ont beaucoup servi pour la description de nouvelles espèces de rhizobiums.

Les profils d'amplification sont obtenus par l'application de la technique de PCR ou «*Polymerase Chain Reaction*». Diverses variantes existent : PCR ciblée basée sur l'utilisation d'amorces (ou *primers*) correspondant à des séquences connues de gènes, RAPD ou «*Random Amplified Polymorphic DNA*» basée sur l'utilisation des amorces choisies au hasard, ERIC-PCR ou rep-PCR basée sur l'amplification de fragments à partir de séquences répétées du génome bactérien. Les fragments d'ADN de tailles différentes obtenus, seront séparés par électrophorèse en gel et les profils comparés par la suite. Ces techniques basées sur la PCR ont l'intérêt d'être simples et rapides (de Lajudie et al. 1998b; Judd et al. 1993; Laguerre et al. 1994). Elles ont beaucoup servi pour la description de nouvelles espèces de rhizobiums.

Les profils de restriction sont obtenus par l'emploi d'enzymes dites de restriction, qui coupent l'ADN en de séquences très spécifiques, plus ou moins longues. Cette approche peut être couplée à la première, si l'on soumet en plus les fragments d'ADN amplifiés à l'action d'enzymes de restriction : PCR-RFLP. Comme ces séquences sont réparties de

manière aléatoire et non uniforme sur le chromosome bactérien, les fragments d'ADN générés auront des tailles différentes. Il ne reste qu'à les séparer par électrophorèse en gel d'agarose pour pouvoir comparer les profils de restriction. De plus, n'importe quel profil sur gel peut être hybridé avec une sonde génétique particulière correspondant à un gène (codant pour les ARN ribosomiaux = ribotypage ; codant pour un gène de virulence ou résistance aux antibiotiques ; etc.) ou une séquence répétée que l'on veut étudier. Lorsque les fragments de restriction sont de taille « normale », la technique d'électrophorèse est classique et le profil obtenu est appelé RFLP ou «*Restriction Fragment Length Polymorphism*». Lorsque les fragments de restriction sont de très grande taille suite à l'utilisation d'enzymes qui coupent rarement l'ADN chromosomique, la technique d'électrophorèse est celle sur gel en champ pulsé appelée PFGE «*Pulse Field Gel Electrophoresis*».

3.1.5. Diversité génétique des espèces de *Rhizobium*

Les rhizobiums ont longtemps été classés au sein de la sous-classe des alpha-protéobactéries (Jarvis et al. 1997; Jordan 1982; Young and Haukka 1996). L'identification récente de bactéries fixatrices d'azote en association avec des légumineuses dans la sous-classe des bêta-protéobactéries (Chen et al. 2001; Moulin et al. 2001) a révélé la grande diversité taxonomique des rhizobiums (Figure 8).

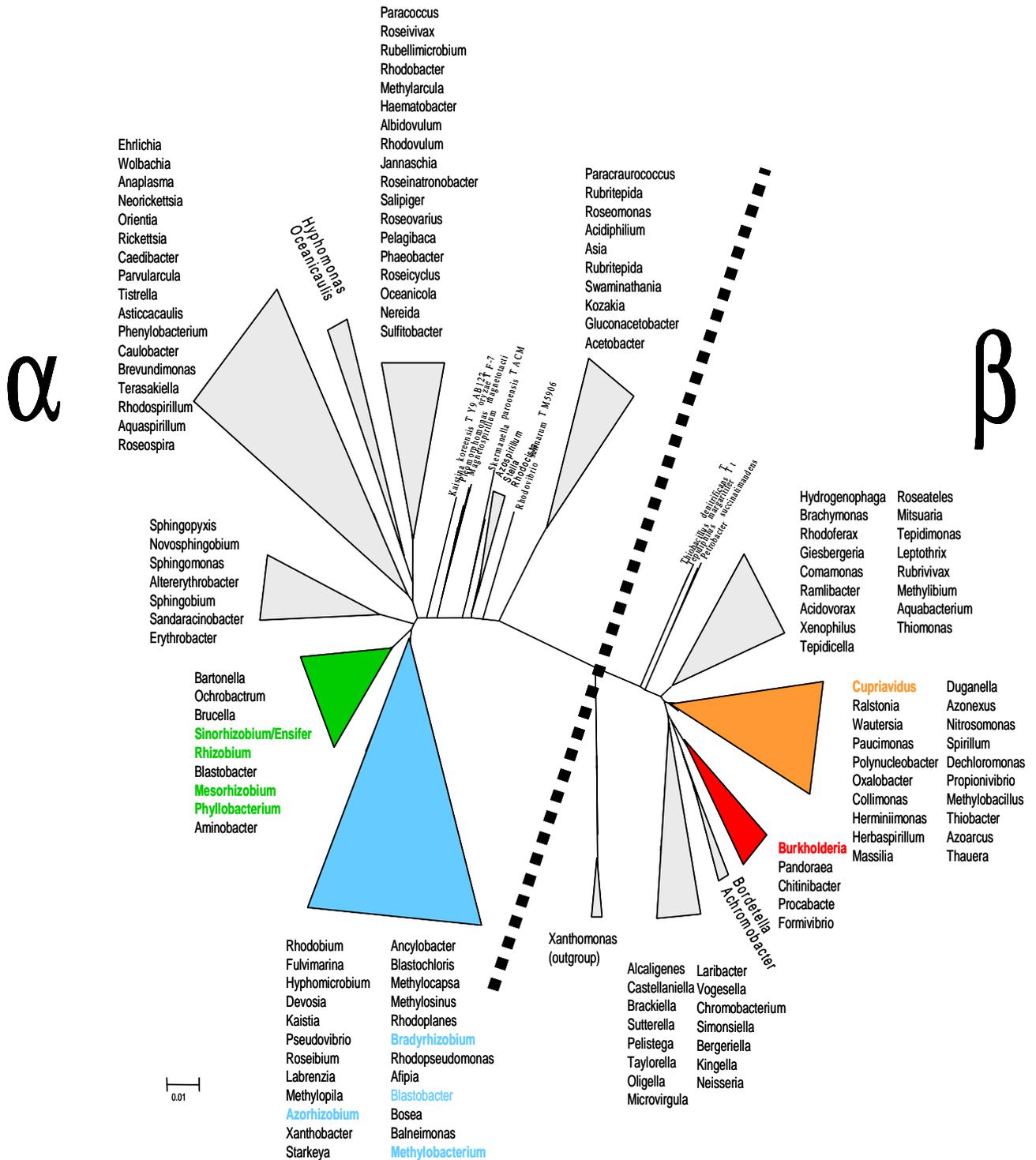


Figure 8 : Arbre phylogénétique 16S rDNA, construit avec toutes les souches types des espèces des alpha- et bêta-protéobactéries. Alignement récupéré dans RDP (*Ribosomal Database Project*), Distance Kimura 2P, arbre construit par NJ. Les genres bactériens possédant des rhizobiums sont indiqués en couleur, ainsi que les branches les portant. © Lionel Moulin, Octobre 2008.

Les rhizobiums comptent actuellement plus de 50 espèces (Tableau 2) réparties dans 14 genres dont certains appartiennent à la sous-classe des alpha-protéobactéries: *Azorhizobium* (Dreyfus et al. 1988); *Blastobacter* (van Berkum and Eardly 2002); *Bradyrhizobium* (Jordan 1982); *Devosia* (Rivas et al. 2002; Rivas et al. 2003); *Ensifer* (Syn. *Sinorhizobium*) (Young 2003); *Herbaspirillum* (Valverde et al. 2003); *Mesorhizobium* (Jarvis et al. 1997); *Methylobacterium* (Jourand et al. 2004; Sy et al. 2001); *Ochrobactrum* (Trujillo et al. 2005; Zurdo-Pineiro et al. 2007); *Phyllobacterium* (Mantelin et al. 2006; Valverde et al. 2005), *Rhizobium* (Jordan 1982) et *Shinella* (Lin et al. 2008). Récemment, d'autres espèces symbiotiques fixatrices d'azote de la sous-classe bêta-protéobactéries ont également été décrites chez les genres *Burkholderia* (Chen et al. 2007; Chen et al. 2006; Moulin et al. 2001) et *Cupriavidus* (Chen et al. 2001). Elles sont essentiellement des symbiotes des *Mimosa* spp. L'image de la diversité des rhizobiums est cependant loin d'être claire, particulièrement au vu du grand nombre d'espèces, de leur grande diversité et de leur large distribution géographique (Doyle and Luckow 2003). Des gamma-protéobactéries seraient également capables de noduler des légumineuses du genre *Hedysarum* (Benhizia et al. 2004).

Tableau 2 : Classification des bactéries nodulant des légumineuses

Nom de genre et d'espèce	Plantes hôtes	Références
Azorhizobium		(Dreyfus et al. 1988)
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	(Dreyfus et al. 1988)
<i>A. doebereineriae</i>	<i>Sesbania virgata</i>	(Moreira et al. 2006)
Blastobacter		(Zavarzin 1961)
<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene indica</i>	(van Berkum and Eardly 2002)
Bradyrhizobium		(Jordan 1982)
<i>B. betae</i>	*	(Rivas et al. 2004)
<i>B. canariense</i>	<i>Genisteae</i> et <i>Loteae</i>	(Vinuesa et al. 2005)
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	(Kuykendall et al. 1992)
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>	(Jordan 1982)
<i>B. jicamae</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>	(Ramirez-Bahena et al. 2009)
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max</i>	(Xu et al. 1995)
<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>	(Ramirez-Bahena et al. 2009)
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza spp.</i>	(Yao et al. 2002)
Burkholderia		(Gillis et al. 1995; Yabuuchi et al. 1992)
<i>B. caribensis</i>	<i>Aspalatus</i>	(Achouak et al. 1999; Moulin et al. 2001)
<i>B. cepacia</i>	<i>Alysicarpus glumaceus</i>	(Vandamme et al. 2002)
<i>B. phymatum</i>	<i>Machaerium lunatum</i>	(Vandamme et al. 2002)
<i>B. mimosarum</i>	<i>Mimosa spp.</i>	(Chen et al. 2006)
<i>B. nodosa</i>	<i>Mimosa spp.</i>	(Chen et al. 2007)
<i>B. sabiae</i>	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>	(Chen et al. 2008)
<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalathus carnosa</i>	(Vandamme et al. 2002)
Cupriavidus		(Makkar and Casida 1987)
<i>C. taiwanensis</i>		(Chen et al. 2001; Vandamme and Coenye 2004)
Devosia		(Nakagawa et al. 1996)
<i>D. neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>	(Rivas et al. 2003)
Ensifer (Sinorhizobium)		(Casida 1982; Young 2003)
<i>E. americanus</i>	<i>Acacia</i>	(Toledo et al. 2003)
<i>E. adhaerens</i>	<i>Sesbania, Medicago</i>	(Casida 1982; Young 2003)
<i>E. arboris</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	(Nick et al. 1999; Young 2003)
<i>E. fredii</i>	<i>Glycine max</i>	(Scholla et al. 1984; Young 2003)
<i>E. kostiensis</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	(Nick et al. 1999; Young 2003)
<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	(Wei et al. 2002; Young 2003)
<i>E. medicae</i>	<i>Medicago spp.</i>	(Rome et al. 1996; Young 2003)
<i>E. melliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus,</i>	(de Lajudie et al. 1994; Young 2003)
<i>E. morelense</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	(Wang et al. 2002)
<i>E. saheli</i>	<i>Sesbania spp, Acacia spp</i>	(de Lajudie et al. 1994; Young 2003)
<i>E. terangae</i>	<i>Sesbania spp, Acacia spp</i>	(de Lajudie et al. 1994; Young 2003)
<i>E. xinjiangense</i>	<i>Glycine max</i>	(Chen et al. 1988; Young 2003)
Herbaspirillum		(Baldani et al. 1986)
<i>H. lusitanum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	(Valverde et al. 2003)
Mesorhizobium		(Jarvis et al. 1997)
<i>M. albiziae</i>	<i>Albizia kalkora</i>	(Wang et al. 2007)
<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	(Wang et al. 1999)
<i>M. australicum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>	(Nandasena et al. 2009)
<i>M. caraganae</i>	<i>Caragana spp.</i>	(Guan et al. 2008)
<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	(Velazquez et al. 2001)
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	(Jarvis et al. 1997; Nour et al. 1994)
<i>M. gobiense</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	(Han et al. 2008a)
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sp., Acacia spp.</i>	(Chen et al. 1991; Jarvis et al. 1997)
<i>M. loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	(Jarvis et al. 1982; Jarvis et al. 1997)
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	(Jarvis et al. 1997; Nour et al. 1995)
<i>M. metallidurans</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>	(Vidal et al. 2009)
<i>M. opportunistum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>	(Nandasena et al. 2009)
<i>M. plurifarum</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	(de Lajudie et al. 1998b)
<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	(Gao et al. 2004)
<i>M. shangrilense</i>	<i>Caragana spp.</i>	(Lu et al. 2009)
<i>M. tarimense</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	(Han et al. 2008a)
<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	(Gao et al. 2004)

<i>M. thiogangeticum</i>	*	(Ghosh and Roy 2006)
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	(Chen et al. 1995; Jarvis et al. 1997)
Methylobacterium		(Patt et al. 1976)
<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria</i> spp.	(Jourand et al. 2004)
Ochrobactrum		(Holmes et al. 1988)
<i>O. cytisi</i>	<i>Cytisus scoparius</i>	(Zurdo-Pineiro et al. 2007)
<i>O. lupini</i>	<i>Lupinus albus</i>	(Trujillo et al. 2005)
Phyllobacterium		(Knosel 1984)
<i>P. leguminum</i>	<i>Astragalus algerianus</i>	(Mantelin et al. 2006)
<i>P. ifriqiyense</i>	<i>Lathyrus numidicus</i>	(Mantelin et al. 2006)
<i>P. trifolii</i>	<i>Trifolium, Lupinus</i>	(Valverde et al. 2005)
Rhizobium		(Frank 1889)
<i>R. alamii</i>	*	(Berge et al. 2009)
<i>R. alkalisoli</i>	<i>Caragana intermedia</i>	(Li Lu et al. 2009)
<i>R. cellulosityticum</i>	<i>Populus alba</i>	(Garcia-Fraile et al. 2007)
<i>R. daejeonense</i>	<i>Bioreactor. Nod+ M sativa</i>	(Quan et al. 2005)
<i>R. etli</i>	<i>P. vulgaris</i>	(Segovia et al. 1993)
<i>R. fabae</i>	<i>Vicia faba</i>	(Tian et al. 2008)
<i>R. galegae</i>	<i>G. orientalis, G. officinalis</i>	(Lindstrom 1989)
<i>R. gallicum</i>	<i>P. vulgaris</i>	(Amarger et al. 1997)
<i>R. giardinii</i>	<i>P. vulgaris</i>	(Amarger et al. 1997)
<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium sinuatum</i>	(Chen et al. 1997)
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	(Wang et al. 1998)
<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera</i> spp.	(Wei et al. 2002)
<i>R. larrymooreii</i>	*	(Bouzar and Jones 2001)
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Pisum sativum</i>	(Frank 1889)
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus, Lespedeza</i>	(Wei et al. 2003)
<i>R. lusitanum</i>	<i>P. vulgaris</i>	(Valverde et al. 2006)
<i>R. mesosinicum</i>	<i>Albizia, Kummerowia, Dalbergia</i>	(Lin et al. 2009)
<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza</i>	(Gu et al. 2008)
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>	(van Berkum et al. 1998)
<i>R. multihospitium</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	(Han et al. 2008b)
<i>R. oryzae</i>	<i>Oryza alta</i>	(Peng et al. 2008)
<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>	(Ramirez-Bahena et al. 2008)
<i>R. pisi</i>	<i>Pisum</i>	(Ramirez-Bahena et al. 2008)
<i>R. radiobacter</i>	*	(Young et al. 2001)
<i>R. rhizogenes</i>	<i>Phaseolus</i>	(Young et al. 2001)
<i>R. rubi</i>	*	(Young et al. 2001)
<i>R. selenitireducens</i>	*	(Hunter et al. 2007)
<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum coronarium</i>	(Squartini et al. 2002)
<i>R. tibeticum</i>	<i>Trigonella archiducis-nicolai</i>	(Hou et al. 2009)
<i>R. tropici</i>	<i>P. vulgaris, L. Leucaena</i>	(Martinez-Romero et al. 1991)
<i>R. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	(de Lajudie et al. 1998a; Young et al. 2001)
<i>R. yanglingense</i>	<i>Coronilla, Amphicarpaea</i>	(Tan et al. 2001)
<i>R. vitis</i>	*	(Ophel and Kerr 1990)
Shinella		(An et al. 2006)
<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	(Lin et al. 2008)

*Espèces répertoriées parmi les rhizobiums et dont l'aptitude de nodulation n'a pas été décrite.

3.2.4. Evolution de la phylogénie microbienne

La phylogénie tente de révéler le développement évolutif et l'histoire d'une espèce ou groupe taxonomique supérieur des organismes. Les organismes vivants sont tous reliés par des ancêtres de relations descendants. Dans le passé, les taxonomistes avaient regroupé les organismes sur la base des caractères phénotypiques. Aujourd'hui, la phylogénie moléculaire permet la reconstruction de l'histoire évolutive d'objets biologiques (organismes, gènes,

etc....) par comparaison de séquences d'acides nucléiques ou protéiques. L'hypothèse de travail est la suivante : plus des organismes partagent un ancêtre proche, plus leurs séquences devraient se ressembler. Les gènes (et leurs produits) sont des enregistrements de leur propre histoire, et, indirectement, des registres de l'histoire des organismes qui les portent (Olsen 2001).

Les premières comparaisons de séquences d'acides aminés conduisirent à la constatation que les mesures de la divergence des séquences étaient corrélées au temps (dont les repères étaient fournis par la paléontologie). Elles contribuèrent à la formulation de l'hypothèse de l'horloge moléculaire (Wilson et al. 1977; Zuckerkandl and Pauling 1962; 1965). La nouveauté résidait en ce qu'il devenait possible d'évaluer sur la base des séquences le temps de divergence de lignées pour lesquelles on n'avait pas de fossiles. Cette hypothèse, dont le mécanisme est une composante de la théorie neutraliste de l'évolution de Kimura (Kimura 1968), fut assez controversée dans son interprétation. Elle stipulait que les séquences macromoléculaires d'une même classe fonctionnelle évoluent de manière constante au cours du temps, et à la même vitesse entre lignées distinctes. Les molécules d'une classe fonctionnelle subissant de faibles contraintes évoluent plus vite que celles dont la fonction est plus vitale.

En 1983, Kimura a émis le concept d'horloge "évolutionnaire" : la vitesse de l'évolution est constante, les mutations qui surviennent dans le génome n'ont pas nécessairement de conséquences phénotypiques, mais elles sont étroitement corrélées avec le temps (Kimura 1983). Woese souligne que l'évolution a un rythme quasi indépendant des changements de phénotypes (Woese and Fox 1977). Les taux d'évolution de ces molécules sont très variables et dépendent du type de gène, du segment du gène, des lignées et du temps (Collins 1999). Les molécules qui évoluent rapidement sont mieux utilisées pour des divergences récentes concernant des organismes proches et celles à évolution lente pour des divergences anciennes pour comparer des organismes phylogéniquement très éloignés. Dans ces conditions, il est possible de construire un arbre généalogique (phylogénétique) en utilisant des méthodes mathématiques et en respectant quelques règles (Tamura et al. 2007).

3.6.4.1. Gènes ribosomaux

Chez les procaryotes, le séquençage et la comparaison des séquences des gènes ARN ribosomiques (16S ADNr) permettent d'évaluer le degré de parenté entre ces organismes. Le séquençage d'ADN est une des techniques les plus utilisées en phylogénie moléculaire actuellement dans le monde. En effet, depuis la publication de l'arbre universel par Woese (Woese 1987), aucun autre gène n'a autant été exploré à des fins phylogénétiques que l'ARNr 16S. Les gènes ARNr ont été présentés comme le chronomètre moléculaire évolutif idéal en grande partie en raison de certaines de ses caractéristiques intrinsèques. Ils sont présents dans toutes les cellules ce qui permet des comparaisons entre procaryotes et eucaryotes. Ils ont une structure bien conservée car toutes modifications pourraient avoir des conséquences importantes sur la synthèse protéique. Il existe des portions d'ARNr dont la séquence est identique chez tous les êtres vivants. Ils sont abondants dans la cellule et faciles à purifier. La classification phylogénétique retenue par l'actuelle édition du "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*" repose essentiellement sur les séquences des ADNr 16S (Garrity et al. 2005). Ces dernières sont les plus utilisées pour réaliser des arbres phylogénétiques car elles sont plus faciles à analyser que l'ARN 23S et plus riches en information que l'ARNr 5S (Jensen et al. 1993; Roberts et al. 2008). Les séquences en sont général disponibles dans des bases de données consultables sur Internet (GenBank ; EMBL, *European Molecular Biology Laboratory* ; DDBJ, *DNA Data Bank of Japan*). Il en va de même pour les programmes informatiques indispensables à l'alignement et la comparaison des séquences comme l'algorithme BLAST «pour *Basic Local Alignment Search Tool* », (ou Outil de Recherche Élémentaire d'Alignement Local) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul et al. 1997), au traitement des données et à la construction des arbres phylogénétiques (Tamura et al. 2007). Il convient cependant de noter que l'utilisation du marqueur moléculaire 16S n'est pas appropriée pour discriminer des espèces ayant divergé trop récemment (Fox et al. 1992; Ludwig and Schleifer 1999) ou celles (rares cependant) ayant subi des transferts latéraux de gènes d'ARNr (Eardly et al. 1996; Jain et al. 2003; van Berkum et al. 2003; Yap et al. 1999). Il a été fait état de preuves de transfert horizontal de séquences d'ARNr 16S entre taxons proches, notamment des espèces de *Mesorhizobium* spp. (Sullivan et al. 1996). Par conséquent, ce marqueur ne peut pas totalement supplanter l'hybridation ADN/ADN, à cause de la limitation de son pouvoir résolutif. Néanmoins, des

travaux de génomique comparative (Konstantinidis and Tiedje 2005b) ont démontré que les ARNr 16S et 23S restaient les meilleurs marqueurs pour déterminer la phylogénie globale des procaryotes.

3.6.4.2. Gènes chromosomaux

D'autres gènes marqueurs de l'évolution des organismes peuvent être séquencés. Certains gènes situés sur le chromosome peuvent être utilisés pour la phylogénie des rhizobiums. Le séquençage d'un "gène de ménage" (*housekeeping gene*, gène qui assure les fonctions indispensables à la vie de tous les types de cellules) ou de plusieurs "gènes de ménage" (MLSA pour *MultiLocus Sequence Analysis*) ont été largement utilisés pour classer des espèces au sein de genres bactériens. La technique MLSA consiste à étudier les séquences d'autres gènes de ménage, qui ont davantage varié au cours de l'évolution récente que les séquences des gènes codant l'ARNr 16S. Il s'agit des ARN polymérases, des facteurs d'élongation G (EF-G), gène *recA* (gène de recombinaison de l'ADN); *DnaK* ou *Hsp70* (Heat Shock Protein 70), *nifA*, *nifH* (gènes de fixation de l'azote); *GSI* et *GSI* (glutamine synthétase). Ces variations permettent donc de différencier des individus d'espèces ayant divergé récemment (quelques millions d'années). L'approche MLSA permet de différencier des espèces que le séquençage comparatif des gènes codant l'ARNr 16S ne différencie pas (Naser et al. 2005).

3.6.4.3. Gènes plasmidiques

Levin and Bergstrom (2000) ont suggéré que la principale source de variation et la force motrice de l'évolution adaptative chez les bactéries est le transfert horizontal de gènes qui se trouvent principalement sur des éléments génétiques accessoires. Les bactéries sont souvent porteurs d'éléments génétiques accessoires actifs et inactifs (plasmides, prophages, transposons et intégrons), dont la composition varie beaucoup entre les membres de la même espèce bactérienne.

Ces îlots génomiques représentent des zones bien définies du chromosome bactérien qui possèdent des propriétés différentes de celles qui caractérisent et définissent l'espèce bactérienne en question : % G+C, taux préférentiel d'usage des codons par exemple sont différents. Ils représentent donc une information génétique d'origine étrangère, acquise au

cours d'échanges génétiques par transformation, transduction et/ou conjugaison, et intégrée de manière plus ou moins stable dans le chromosome bactérien, ou sur un plasmide. Certains îlots génomiques sont cryptiques, c'est à dire ne codent pour aucun phénotype reconnu à ce jour, mais la plupart codent pour des informations de nature biochimique, de virulence (îlots de pathogénicité) ou de résistance (intégrons).

Ainsi, l'acquisition et la perte de plasmides²⁰, qui est un processus continu et dynamique, semblent jouer un rôle majeur dans l'évolution et les performances symbiotiques des rhizobiums (Downie and Young 2001; Zhang et al. 2001). L'échange de plasmide ne se limite pas seulement aux rhizobiums. Une comparaison de la séquence du génome entier d'*Agrobacterium tumefaciens* à celle du génome de *E. meliloti* a montré que de longs fragments d'ADN sont généralement les mêmes dans les deux (Sullivan and Ronson 1998; Wood et al. 2001). Des souches d'une même espèce peuvent posséder des contenus plasmidiques différents en nombre et en taille, qu'il est possible de comparer après extraction et séparation par électrophorèse sur gel, éventuellement après une restriction (= profil plasmidique). Ces plasmides fournissent donc un outil de typage moléculaire complémentaire.

Certains auteurs ont récemment, suggéré que l'ANI (*Average Nucleotide Identity*) des gènes communs à deux génomes bactériens peut valablement remplacer les valeurs d'hybridation ADN-ADN pour les souches bactériennes dont les séquences génomiques sont disponibles (Goris et al. 2007; Konstantinidis and Tiedje 2005a). L'ANI offre une résolution au niveau sous-espèce (Konstantinidis and Tiedje 2005a). C'est un indice robuste qui permet d'évaluer les distances génétique et évolutive entre deux génomes, car il est fortement corrélé à la similarité des séquences du gène de l'ARNr 16S et le taux de mutation du génome. Il n'est pas affecté par le transfert latéral ou le taux de recombinaison variable d'un (ou quelques) gène (s).

²⁰ Plasmide: Molécule d'ADN non-chromosomique, circulaire et s'autorépliquant, présente chez plusieurs bactéries et capable de se transférer entre les cellules bactériennes de la même espèce et occasionnellement d'espèces différentes. Des gènes de résistance aux antibiotiques sont fréquemment situés sur les plasmides.

4. Diversité génétique des rhizobiums d'Acacia

À l'origine, les genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* ont été caractérisés comme des souches à croissance rapide et des souches à croissance lente, respectivement. Certains *Acacia* spp. ont été décrits comme nodulant exclusivement avec des rhizobiums à croissance rapide, tandis que d'autres nodulaient seulement avec des rhizobiums à croissance lente (Dreyfus and Dommergues 1981a). Ces auteurs avaient également découvert que dans de rares cas, certaines espèces d'*Acacia* nodulaient à la fois avec des rhizobiums à croissance rapide et des rhizobiums à croissance lente. De nombreux travaux de caractérisation des populations naturelles de rhizobiums d'*Acacia* spp. ont par la suite mis en évidence une grande diversité de leurs caractéristiques génétiques, physiologiques, symbiotiques et biochimiques. Plusieurs nouvelles espèces de bactéries symbiotiques, pour l'essentiel autochtones d'Afrique ont été décrites.

La majorité des microsymbiotes d'*Acacia* spp. sont actuellement regroupés au sein de cinq genres de la classe des α -protéobactéries: *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum* et *Rhizobium* (de Lajudie et al. 1998b; de Lajudie et al. 1994; Diouf et al. 2007; Dupuy et al. 1994; Fall et al. 2008; Lafay and Burdon 2001; Ngom et al. 2004; Nick et al. 1999; Sarr et al. 2005; Zhang et al. 1991). Toutefois, de nombreuses souches de *Ensifer* autochtones d'Afrique peuvent également noduler efficacement un grand nombre d'*Acacia* spp. natives d'Amérique (Haukka et al. 1998; Räsänen et al. 2001). Des souches d'*Ensifer* et de *Mesorhizobium* ont depuis été isolées de ces *Acacia* spp. autochtones d'Amérique. *E. americanus* isolée chez plusieurs de ces espèces peut aussi noduler *L. leucocephala* ; ce qui suggère que les souches Américaines de *Ensifer* sont liées au groupe d'inoculation *Acacia-Prosopis-Leuceana* (Toledo et al. 2003).

Bien que les gènes pour la nodulation et la fixation de l'azote (*nodA* et *nifH*) des rhizobiums aient été jugés variables entre les souches de *Ensifer* d'Afrique et Amérique, ces gènes sont identiques chez des souches de *Mesorhizobium* géographiquement diverses (Haukka et al. 1998; Räsänen et al. 2001). En Australie, *Bradyrhizobium* spp. est le microsymbiote dominant pour les *Acacia* spp. (Lafay and Burdon 2001; Marsudi et al. 1999). Ainsi, la plupart des *Acacia* spp. Australiens nodulent avec des *Bradyrhizobium* spp. (Dreyfus and Dommergues 1981b; Galiana et al. 1990; Lafay and Burdon 2001; Marsudi et al. 1999).

Plusieurs études phylogénétiques montrent une étroite relation entre le subg. *Phyllodineae* et la tribu des *Ingeae*, tandis que le subg. *Acacia* est corrélé à la tribu des *Mimoseae* (Miller et al. 2003; Miller and Bayer 2003; Robinson and Harris 2000). Par ailleurs, plusieurs membres du subg. *Phyllodineae* et de la tribu des *Ingeae* (i.e. *Albizzia* spp.) nodulent avec *Bradyrhizobium*, tandis que les membres du subg. *Acacia* et de la tribu des *Mimoseae* (i.e. *Prosopis* spp. et *Leuceana* spp.) nodulent avec *Mesorhizobium* et *Ensifer* (Doignon-Bourcier et al. 1999; Haukka and Lindström 1994; Moreira et al. 1998; Zhang et al. 1991). Ainsi, il semble y avoir une concordance symbiotique entre la compatibilité avec des rhizobiums et la relation phylogénétique entre les sous-genres (Leary et al. 2006).

5. Etablissement de la symbiose fixatrice d'azote Légumineuse-Rhizobium

Au cours des étapes précoces de la symbiose fixatrice d'azote, un véritable dialogue moléculaire s'établit entre les deux partenaires symbiotiques (Parniske and Downie 2003; Spaink 2000; Torto-Alalibo et al. 2009). Ce dialogue moléculaire fait intervenir un grand nombre de gènes bactériens impliqués dans l'établissement et le fonctionnement de la symbiose depuis l'étape de reconnaissance des deux partenaires jusqu'à la fixation d'azote (Denarie et al. 1996; Lerouge et al. 1996; Schultze and Kondorosi 1998).

5.1. Dialogue Moléculaire

La reconnaissance mutuelle spécifique entre les deux partenaires symbiotiques se fait *via* un échange de signaux moléculaires ou dialogue moléculaire (Figure 9) (Debelle et al. 2007; Spaink 2000). Dans un premier temps, la plante libère dans ses exsudats racinaires des composés chimiques (Fauvert and Michiels 2008; Peters and Verma 1990). Les rhizobiums présents à l'état saprophytique dans la rhizosphère, répondent par un chimiotactisme positif aux exsudats racinaires (majoritairement des flavonoïdes) de la plante (Barbour et al. 1991). Ils se déplacent vers des sites localisés sur les racines des légumineuses. Apparemment, le chimiotactisme n'est pas indispensable pour la nodulation, car les mutants dépourvus de flagelle sont encore capables de noduler normalement (Napoli and Albersheim 1980). En revanche, il a une influence sur l'efficacité de l'initiation des nodules et l'augmentation du taux d'infection (Caetano-Anolles et al. 1988).

Les flavonoïdes activent chez les bactéries l'expression de certains gènes, les gènes de nodulation appelés opéron *nod* (Long 1996). Les gènes de nodulation désignés sous le terme de gènes *nod* ou *nol* sont groupés en trois classes: les gènes *nod* communs (*nodA*, *B*, *C*), les gènes spécifiques (*nodH*) et les gènes régulateurs (*nodD*) (Schultze and Kondorosi 1998).

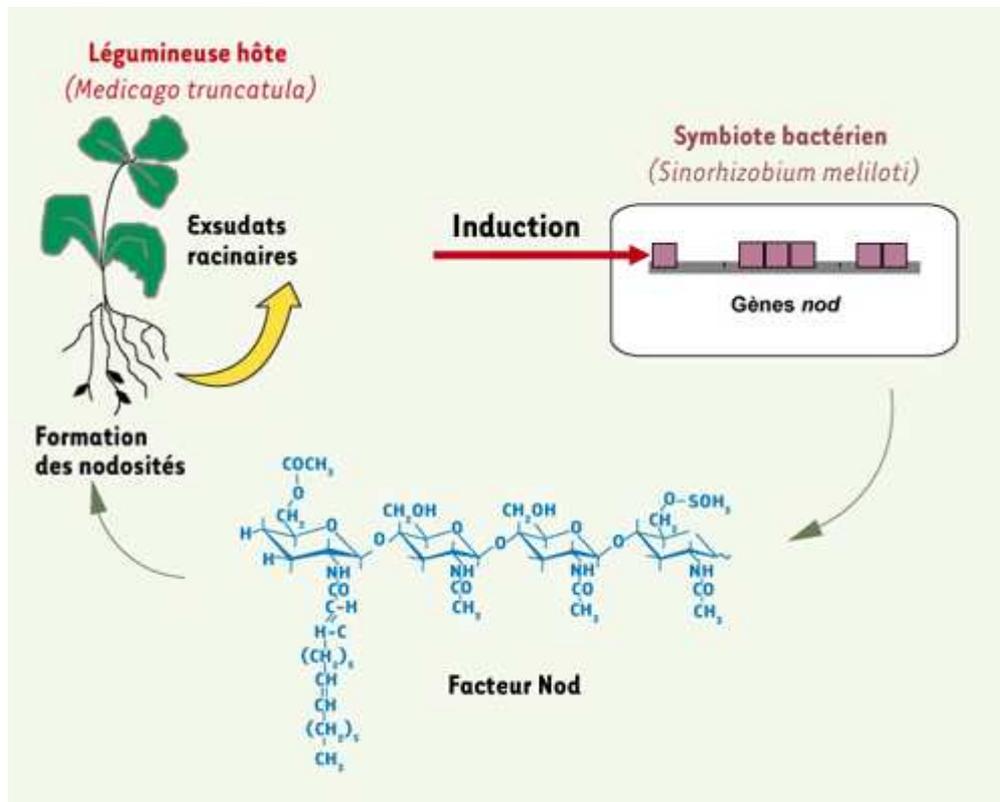


Figure 9: La symbiose Rhizobium/légumineuses : un dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie (Debelle et al. 2007).

5.1.1. Gènes symbiotiques rhizobiens

Ils comprennent les gènes de nodulation et les gènes de fixation de l'azote. Chez la plupart des espèces de *Rhizobium* (Gonzalez et al. 2003; Young et al. 2006) et de *Ensifer* (Galibert et al. 2001), les gènes symbiotiques sont généralement localisés sur des plasmides de grande taille appelés plasmides symbiotiques ou pSym. En revanche, chez les espèces de *Bradyrhizobium*, d'*Azorhizobium* et la plupart des espèces de *Mesorhizobium*, les gènes codant pour des facteurs Nod et la nitrogénase sont situés sur des régions du chromosome dénommées «*symbiosis islands*» (Gottfert et al. 2001; Jarvis et al. 1997; Sawada et al. 2003; Sullivan et al. 2002).

5.1.1.1. Gènes de nodulation

5.1.1.1. Gènes *nod* communs

Les gènes *nod* communs (ou gènes *nodABC*), ont été les premiers à être caractérisés et séquencés. Ces gènes ont été appelés gènes *nod* communs, parce qu'ils sont structurellement et fonctionnellement conservés et interchangeable entre espèces de *Rhizobium*, *Azorhizobium* et *Bradyrhizobium* sans modifier le spectre d'hôtes. Cependant, une mutation de l'un de ces gènes entraîne une perte de toutes les propriétés symbiotiques (Denarie et al. 1996; Denarie et al. 1992). Il est probable que les gènes *nodA*, *nodB* et *nodC* soient acquis par les rhizobiums par transferts horizontaux de gènes. En effet, comme la plupart des gènes de la nodulation et de la fixation de l'azote, elles ont un contenu en G + C nettement inférieur à la moyenne du contenu en G + C des rhizobiums. De plus, ils ont un biais d'usage du code²¹ différent de la plupart des gènes chromosomiques (Galibert et al. 2001). Ceci explique l'interaction entre des espèces de bactéries évolutivement éloignées et des plantes hôtes proches, et inversement. Les gènes *nod* codent pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse des lipooligosaccharides ou facteurs Nod (Debelle et al. 2001; Perret et al. 2000). La protéine NodA est responsable de la N-acétylation de la chaîne oligosaccharidique (Atkinson et al. 1994). Quant à la protéine NodB, c'est une déacétylase qui agit sur l'extrémité non-réductrice du squelette oligosaccharidique (John et al. 1993). La protéine NodC à activité N-acétylglucosaminyltransférase, débute la synthèse des facteurs Nod (Geremia et al. 1994). Il existerait une relation évolutive entre la chitine et les mécanismes de perception des facteurs Nod en raison des similitudes entre leurs récepteurs potentiels et entre les signaux moléculaires (Radutoiu et al. 2003).

²¹ Le **biais d'usage du code (RSCU, pour Relative Synonymous Codon Usage** en anglais) désigne l'utilisation préférentielle d'un des triplets de nucléotides ou codons possibles pour coder un acide aminé. En effet, il existe en général plusieurs combinaisons de trois nucléotides codant le même acide-aminé (sauf pour la méthionine et le tryptophane), appelés **codons synonymes**, mais certaines de ces combinaisons sont en général utilisées préférentiellement par la cellule. Cette préférence dépend à la fois de l'organisme, du génome (nucléaire, mitochondrial, chloroplastique, ...), de la région génique et même du gène considéré. L'existence de ce biais d'usage du code permet de repérer les transferts horizontaux de matériel génétique.

5.1.1.1.2. Gènes spécifiques

Contrairement aux gènes *nod* communs, les gènes spécifiques ne sont pas présents chez tous les rhizobiums. Ils interviennent dans la spécificité d'hôte et codent pour des enzymes qui sont impliquées dans le greffage de diverses décorations chimiques (acétylation, carbamylation, fucosylation, méthylation, méthyl-fucosylation et sulfatation) sur les extrémités réductrices et non réductrices du squelette de la chitine des facteurs Nod (Ardourel et al. 1994; Debelle et al. 2001). *E. meliloti* porte six gènes *nod* spécifiques avec des fonctions distinctes dans la modification des extrémités réductrices et non réductrices du squelette lipo-chitooligosaccharidique des facteurs Nod : *nodF*, *nodE*, *nodL*, *nodP*, *nodQ* et *nodH* (Wais et al. 2002). La mutation d'un de ces gènes peut modifier le spectre d'hôte de la souche (Debelle et al. 2001; Oldroyd and Downie 2004; Perret et al. 2000; Radutoiu et al. 2007).

5.1.1.1.3. Gènes régulateurs *nodD*

L'expression des gènes *nod* communs et spécifiques est sous le contrôle de gènes régulateurs appelés gènes *nodD* (Broughton et al. 2000; van Rhijn and Vanderleyden 1995). Ces derniers sont impliqués dans les étapes précoces de la symbiose (Perret et al. 2000). Les protéines NodD sont des activateurs transcriptionnels des gènes *nod* (Limpens et al. 2003; Radutoiu et al. 2003) mais n'exercent ce rôle qu'en présence de flavonoïdes dans les exsudats racinaires des plantes hôtes. Cette reconnaissance entre une protéine NodD et un flavonoïde donné détermine un premier niveau de spécificité dans l'interaction symbiotique (Kondorosi et al. 1991; Maillet et al. 1990; Schultze et al. 1994). Toutefois, cette spécificité n'est pas stricte, une protéine NodD est généralement capable de reconnaître plusieurs flavonoïdes, et une espèce de légumineuses produit un mélange de flavonoïdes. Par ailleurs, une même souche de *Rhizobium* peut posséder plusieurs copies de gène *nodD*, présentant ainsi des spécificités différentes (Kondorosi et al. 1991; Schlaman et al. 1992; Spaink et al. 1987). L'expression des gènes *nodD* et *nodABC* de *Rhizobium leguminosarum* n'est pas régulée par l'apport d'azote combiné (Nedelcho et al. 1992).

Les protéines NodD sont ainsi activées et induisent l'expression des gènes communs (*nodA*, *B*, *C*) et spécifiques (*nodH*) (Perret et al. 2000). L'expression des gènes structuraux conduit à la production de signaux bactériens extracellulaires, les facteurs de nodulation (appelés

facteurs Nod). Les facteurs Nod sont des lipo-chitoooligosaccharides synthétisés grâce aux enzymes des gènes communs, puis modifiés par les enzymes des gènes spécifiques, qui introduisent des fonctions ou des molécules sur le squelette oligosaccharidique. Ces facteurs Nod déclenchent le programme de nodogenèse chez la plante hôte (Debelle et al. 2001; Denarie et al. 1996; Denarie et al. 1992; Hirsch et al. 2001; Parniske and Downie 2003). Ainsi, à partir d'un même squelette, chaque diazotrophe va le modifier pour se l'approprier et le rendre spécifique. Aussi, ils jouent un rôle fondamental dans la reconnaissance, l'infection de la plante hôte et la formation des nodules (Mylona et al. 1995). Cependant, il a été montré que les substitutions d'acides gras de même que la concentration des facteurs Nod de la souche d'*Azorhizobium* ORS 571 ont peu d'impact sur la formation des nodules. Toutefois, elles déterminent l'efficacité de la nodulation de *Sesbania rostrata* (D'Haeze et al. 2000). De récentes études ont par ailleurs montré que les deux souches photosynthétiques de *Bradyrhizobium* BTAi1 et ORS 278 sont dépourvues de gènes *Nod* peuvent induire la nodulation (Giraud et al. 2007).

5.1.1.2. Gènes de fixation de l'azote

Les bactéries fixatrices d'azote convertissent l'azote moléculaire en ammoniacque grâce à un complexe enzymatique, appelé nitrogénase, formé de deux métalloprotéines. Ces dernières sont le plus souvent appelées Protéine I et Protéine II qui comportent trois groupements prosthétiques différents. La synthèse et le fonctionnement du complexe nitrogénase sont codés par plus de 20 gènes différents, appelés gènes *nif* (Pedrosa et al. 2001; Triplett 2000). Ces derniers sont présents chez les bactéries libres fixatrices d'azote comme *Klebsiella pneumoniae* ou des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote (Elmerich 1991; Fischer 1994). Les gènes *nifHDK* sont les gènes de structure du complexe nitrogénase. La plupart des autres gènes jouent un rôle dans la synthèse et la maturation des groupements prosthétiques. Certains gènes sont requis pour la synthèse des transporteurs d'électrons et pour la synthèse des protéines de régulation. Alors que la structure des gènes *nif* est similaire entre les bactéries fixatrices d'azote, leur organisation et leur régulation varie entre diazotrophes. Le gène *nifH* des rhizobiums, qui codent pour la dinitrogénase réductase (Protéine I) est souvent corrélé à leurs gènes 16S (Young 1992), *nodA* (Haukka et al. 1998) et *nodC* (Laguerre et al. 2001). Cependant, il est montré qu'à la différence de la phylogénie du gène *nodA*, les phylogénies des gènes *nodC* et *nifH* n'étaient pas corrélées à celle du 16S des rhizobiums

(Laguerre et al. 2001; Suominen et al. 2001; Ueda et al. 1999; Wernegreen and Riley 1999). Les séquences des gènes *nodC* et *nifH* sont étroitement apparentées chez les souches nodulant les mêmes espèces de légumineuses (Laguerre et al. 2001; Rivas et al. 2007).

A coté des gènes *nif* qui sont des gènes de structure, existent des gènes de la fixation de l'azote *in planta* notés gènes *fix* qui ne se retrouvent pas chez *K. pneumoniae* et dont les fonctions sont moins bien connues (Cabanès et al. 2000).

5.1.2. Flavonoïdes inducteurs de la symbiose des Acacia

Les profils des flavonoïdes varient selon les espèces d'*Acacia* spp. ; en particulier entre celles qui nodulent avec des espèces de *Mesorhizobium*, *Rhizobium* et *Ensifer* et celles qui nodulent avec des espèces de *Bradyrhizobium* (Ferro et al. 2000). En effet, les flavonoïdes apigénine, butéine, lutéoline, kaempférol et naringénine induisent une importante expression des gènes *nod* chez des souches de *Ensifer* et *Mesorhizobium* qui nodulent *A. nilotica*, *A. senegal*, *A. seyal* et *A. tortilis*. Tandis que les isoflavonoïdes, diadzéine et génistéine induisent peu ou pas d'expression de gènes *nod* chez ces souches (Ba et al. 2002; Lortet et al. 1996). Ces mêmes isoflavonoïdes induisent la synthèse de facteurs Nod chez des souches de *Bradyrhizobium*, isolées de *A. albida* (syn. *Faidherbia albida*) (Ferro et al. 2000) et incapables de noduler les plantes hôtes du groupe d'inoculation croisée *Acacia-Prosopis-Leuceana*. Cependant, bien que phylogénétiquement éloignées, des souches d'*Ensifer* et de *Mesorhizobium* isolées d'*Acacia* spp. ou de *Prosopis* spp. présentent des facteurs Nod chimiquement similaires (Ba et al. 2002; Lorquin et al. 1997; Nowak et al. 2004).

Des flavonoïdes inducteurs de facteurs Nod ont également été découverts dans des feuilles, des phyllodes et des cosses des graines de nombreuses espèces d'*Acacia* spp. (Ba et al. 2002; Lortet et al. 1996; Muhaisen et al. 2002; Novak et al. 2002). Les flavonoïdes présents dans la litière d'*Acacia* spp. pourraient ainsi jouer un rôle important dans les interactions symbiotiques *Acacia-rhizobium* (Leary et al. 2004).

5.2. La spécificité d'hôte

La spécificité d'hôte est une des caractéristiques majeures de la symbiose légumineuses-rhizobium (Young and Johnston 1989). C'est la capacité d'une souche à entrer en symbiose avec certains genres ou même certaines espèces de légumineuses. Cependant, elle s'applique aussi bien aux rhizobiums qu'aux plantes hôtes. La spécificité d'une souche peut être qualifiée de large à plus ou moins étroite selon le nombre d'espèces de plantes hôtes. Comprendre les mécanismes de contrôle génétique de l'hôte et des rhizobiums impliqués dans la détermination de la spécificité d'hôte permettrait d'améliorer la fixation de l'azote chez les légumineuses et contribuerait à l'étude de l'écologie moléculaire de la symbiose fixatrice d'azote.

Chez les légumineuses, les espèces du genre *Galega* ne peuvent former de nodules qu'avec les souches de *Rhizobium galegae* (Lindstrom 1989; Terefework et al. 1998). A l'inverse, des espèces comme Siratro (*Macroptilium atropurpureum*) et Niébé (*Vigna unguiculata*) peuvent être nodulées par différentes espèces de rhizobiums (Somasegaran and Hoben 1994).

La littérature traite pour l'essentiel des spécificités d'hôtes des bactéries des genres *Rhizobium* et *Ensifer* et, dans une moindre mesure, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Mesorhizobium*. Un exemple classique de souche caractérisée par sa non-spécificité est *Ensifer* sp. NRG 234, isolée de *Lablab purpureus* (Stanley and Cervantes 1991) qui peut noduler 232 espèces de légumineuses réparties dans 112 genres et même la non-légumineuse *Parasponia andersonii* de la famille des Ulmacées (Pueppke and Broughton 1999). En revanche, d'autres souches très spécifiques comme *Azorhizobium caulinodans* ne semblent noduler efficacement qu'une seule espèce, *Sesbania rostrata* (Boivin et al. 1997).

La spécificité d'hôte est donc très variable. Elle est contrôlée à plusieurs niveaux impliquant à la fois les gènes du rhizobium et ceux de la plante hôte. Chez les rhizobiums, elle est le fait d'un certain nombre de gènes ; dont les gènes de spécificité, qui en sont les déterminants majeurs (Denarie et al. 1992; Spaink 2000). Cependant, il a été montré que les gènes communs *nodA* et *nodC* participent également à la détermination du spectre d'hôtes (Debelle et al. 2001; Perret et al. 2000). Les gènes Nod sont portés par des éléments potentiellement transmissibles (Sawada et al. 2003; Wei et al. 2009). Des transferts horizontaux de gènes peuvent alors s'effectuer entre espèces bactériennes, ce qui transfère

également les spectres d'hôtes (Bailly et al. 2007; Barcellos et al. 2007; Hirsch et al. 2001; Laguerre et al. 2001; Vinuesa et al. 2005; Wei et al. 2009; Zhang et al. 2000). Ceci explique l'interaction entre des espèces de bactéries évolutivement éloignées et des plantes hôtes proches, et inversement (Sawada et al. 2003; Wei et al. 2009). Ainsi, il y aurait une coévolution entre les gènes de la symbiose et les plantes hôtes, et non entre les rhizobiacées et les plantes hôtes.

5.3. Coévolution en symbiose légumineuses-rhizobium

Les nodules des légumineuses, des structures spécialisées pour la fixation de l'azote, sont probablement le résultat de la coévolution des plantes et des rhizobiums ancestraux. La coévolution légumineuses-rhizobium serait ainsi parmi les processus évolutifs menant à la diffusion et à la divergence de légumineuses (Martinez-Romero 2009). Elle est considérée comme une explication de la spécificité dans les interactions légumineuses-rhizobium (Aguilar et al. 2004; Lie et al. 1987).

Les phylogénies de gènes Nod semblent suivre celles des légumineuses (Suominen et al. 2001). La diversité des facteurs Nod produits peut être une bonne indication d'adaptation de rhizobiums à la variabilité des plantes. Bien qu'il n'y ait pas de corrélation stricte entre le type de facteur Nod et la spécificité des plantes, il existe des préférences (Denarie et al. 1996; Roche et al. 1996). Il est remarquable de noter que les plantes comme *Aeschynomene* spp. n'ont pas besoin de facteurs Nod pour la nodulation (Giraud et al. 2007), suggérant que les facteurs Nod sont des acquisitions tardives dans la formation de nodules. La sélection de plantes pourrait conduire à terme à la spéciation bactérienne (Terefework et al. 2001). Certains auteurs estiment que chez *Mesorhizobium huakuii*, l'évolution des sous-espèces pourrait être liée à la spécificité d'hôte et à l'isolement géographique (Nuswantara et al. 1999).

Le fait que les gènes *nif* seraient antérieurs aux gènes *nod* (Hennecke et al. 1985; Hernandez-Lucas et al. 1995) suggère que la capacité de fixation de l'azote est une ancienne propriété qui prédisposait des ancêtres de bactéries qui les portaient à la coévolution avec des légumineuses hôtes (Provorov et al. 2008; Provorov 1998).

L'environnement, les conditions biotiques et abiotiques peuvent influencer fortement la sélection de souches ou des espèces bactériennes présentes dans le sol. La plante sélectionne des souches particulières pour former des nodules à partir de la flore bactérienne du sol (Martinez-Romero et al. 1991; Mnasri et al. 2007; Rangin et al. 2008). La diversité des plantes influence la structure génétique de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* nodulant le pois (Depret and Laguerre 2008). Les bactéries les plus adaptées à un hôte sont plus compétitives pour la formation de nodules et deviennent les occupants dominants du nodule (Elliott et al. 2009; Martinez-Romero et al. 1991; Rangin et al. 2008). Lors de la sénescence des nodules la population bactérienne du sol la plus favorisée et plus compétitive peut être enrichie (Aguilar et al. 2004).

Cependant, pour expliquer la co-existence des légumineuses et leurs affinités, une autre hypothèse différente de la co-évolution a été proposée; pour laquelle les plantes sélectionnent des bactéries ayant des protéines NodD avec des affinités pour leurs flavonoïdes (les flavonoïdes sont aussi des composantes clé dans les réactions de défense). Elles produisent des facteurs Nod appropriés qui ne provoquent pas de réactions de défense de la part de la plante hôte (Gonzalez-Pasayo and Martinez-Romero 2000; Marie et al. 2001).

L'évolution des plantes serait également liée aux contraintes géographiques, environnementales et de reproduction (Laine 2009). Il devrait aussi y avoir une plus forte pression de sélection par des agents pathogènes et des facteurs autres que les rhizobiums (Parker 1999). Toutefois, les plantes devraient exercer une constante sélection pour noduler de préférence avec des bactéries qui sont particulièrement bénéfiques (Parker 1999). Il est possible d'imaginer un scénario où l'évolution écologique des légumineuses serait survenue lorsque les plantes auraient colonisé de nouveaux environnements, en particulier pauvres en azote et de diversité rhizobienne faible. Selon Simms et Taylor (2002), les plantes survivantes auraient été les variantes de la population les plus compatibles avec les rhizobiums disponibles. La plasticité des rhizobiums à son tour fournit de nouvelles variantes qui pourraient être de nouveau sélectionnées par une nouvelle génération de plantes qui ont des propriétés symbiotiques plus appropriées pour les bactéries sélectionnées, et ainsi de suite (Simms and Taylor 2002). Des études ont montré que l'abondance des rhizobiums dans les sols est fortement corrélée à la variation de la nodulation et à la croissance de

l'hôte, ce qui indique que l'abondance des rhizobiums est un bon indicateur de l'efficacité relative des populations de rhizobium (Thrall et al. 2007).

5.4. Mécanismes d'infection et de nodulation

L'infection des racines par les bactéries et la formation de nodules comportent plusieurs étapes impliquant la multiplication des bactéries dans la rhizosphère, la reconnaissance de la plante hôte, l'infection des poils absorbants et la croissance bactérienne à l'intérieur d'un réseau de tubes issus de la paroi des cellules végétales, appelé cordon d'infection.

5.4.1. Mécanismes d'infection

La formation des nodules sur les racines mais également sur les tiges des légumineuses a été bien étudiée (Jones et al. 2007; Oldroyd and Downie 2008). Elle peut se faire de différentes manières suivant le mode d'infection.

L'infection *via* les poils absorbants de la racine hôte est la plus répandue (Sprent 2007). Sous l'effet des facteurs Nod produits par la bactérie, les poils absorbants en croissance subissent des courbures caractéristiques dites «en crosse de berger» (Perret et al. 2000). L'infection se fait par l'intermédiaire d'un cordon d'infection, structure tubulaire d'origine végétale, à l'intérieur duquel se trouvent les bactéries. Ce cordon se développe dans la lumière du poil, progresse vers la base et atteint les cellules du cortex racinaire ; où il se ramifie (Pawlowski and Bisseling 1996). La formation de cordons d'infection, qui permettent l'invasion des bactéries dans le cortex racinaire, implique le facteur Nod ; mais nécessite également la présence du rhizobium, suggérant le rôle éventuel d'autres signaux moléculaires des bactéries (Oldroyd 2001).

Dans d'autres cas, l'infection ne fait pas intervenir les poils absorbants et la pénétration des bactéries se fait au niveau des blessures physiques causées par l'éclatement de l'épiderme «*crack entry*» lors de l'apparition des jeunes racines latérales ou des racines adventives. Ce mode d'infection alternatif a été décrit chez les légumineuses subtropicales, comme *Arachis hypogaea* (Chandler 1978), *Stylosanthes* (Chandler et al. 1982) et *Aeschynomene* (Alazard and Duhoux 1990) ; où aucun cordon d'infection n'est observé et les rhizobiums envahissent les cellules corticales à travers les parois cellulaires structurellement modifiées. Chez *Sesbania rostrata* (Dreyfus and Dommergues 1981a; Ndoye et al. 1994; Tsien et al. 1983) et

Neptunia (Subba-Rao et al. 1995), l'infection entraîne la formation de poches d'infection intercellulaire.

Un troisième mode d'infection a été décrit chez *Mimosa scabrella* (Sprent 1989). Les rhizobiums pénètrent directement à la jonction de deux cellules épidermiques intactes (infection intercellulaire) par la dissolution de la lamelle moyenne des parois radiales (González-Sama et al. 2004; Vega-Hernández et al. 2001) et envahissent les cellules hôtes (de Faria et al. 1988).

5.4.2. Formation du nodule

La forme extérieure, l'anatomie et l'histologie des nodules sont caractéristiques de l'espèce végétale. En général, les nodules sont divisés en deux principaux groupes, appelés type déterminé et type indéterminé. Cette distinction est basée sur la forme des nodules matures, l'activité méristématique ainsi que leur mode de transport de l'azote fixé (Brewin 1991; Brewin 2004; Ndoye et al. 1994; Sprent 2001).

Les nodules de type déterminé se forment sur certaines légumineuses tropicales et subtropicales (par exemple, *Phaseolus*, *Glycine*, *Lotus* ou *Vigna*). L'initiation des primordia des nodules a lieu dans le cortex externe (hypoderme) et l'activité du méristème disparaît peu de temps après l'initiation des nodules et la croissance ultérieure est assurée par l'expansion cellulaire. Il en résulte des nodules de forme sphérique (Patriarca et al. 2004).

Les légumineuses tempérées (*Pisum*, *Medicago*, *Trifolium* et *Vicia*) développent généralement des nodules de type indéterminé de forme cylindrique (Figure 10), qui sont initiés dans le cortex interne de la racine (Mathesius et al. 2000; Timmers et al. 1999; Timmers et al. 2000). Ils maintiennent un méristème apical persistant et continuent à s'allonger au cours du temps. Ces différentes activités cellulaires conduisent rapidement au développement d'une structure complexe dans laquelle on peut discerner un tissu central constitué d'un certain nombre de zones distinctes (Denarie et al. 1992; Timmers et al. 2000). Le méristème est la zone la plus distale (zone I). La zone de différenciation et d'infection est adjacente (zone II). Ces deux zones ont une taille constante durant la vie de la nodosité. La troisième zone est la zone de fixation d'azote. Finalement, chez les nodules âgés, les cellules végétales proximales à la racine et les bactéries dégèrent et forment une zone de

sénescence (zone IV). Les types déterminé et indéterminé ont été observés chez *Sesbania rostrata* (Ndoye et al. 1994).

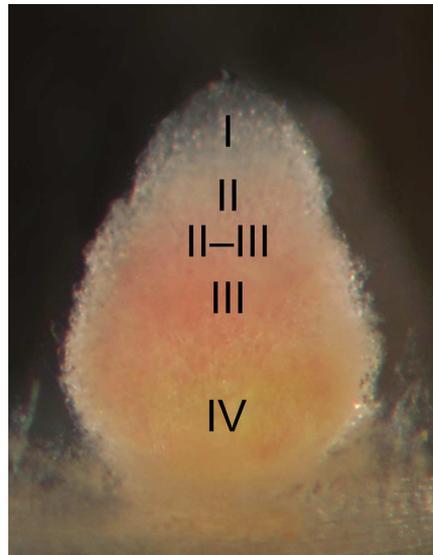


Figure 10 : Gros plan d'un nodule racinaire sur un plant de *Medicago*, inoculés avec une souche de *E. meliloti*. La coupe longitudinale du nodule montre les quatre zones d'un nodule de type indéterminé. ©Ninjatacoshell. Zone I, méristèmes ; zone II, zone d'infection ; zone II-III, zone intermédiaire entre zones d'infection et de fixation de l'azote ; zone III, zone de fixation d'azote; zone IV, zone de sénescence.
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e7/Indeterminate_Nodule_Zonation_%28labeled%29.png/469px-Indeterminate_Nodule_Zonation_%28labeled%29.png (consulté le 30 juillet 2010)

6. La nodulation des *Acacia* spp.

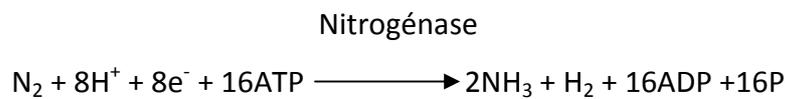
La nodulation a été rapportée chez 90% des *Mimosoideae* (Allen and Allen 1981; de Faria et al. 1989). La morphologie des nodules d'espèces d'*Acacia* spp. a été décrite comme un type «*Mimosoideae*» pérenne multilobé avec des inclusions périphériques de tanin, de multiples méristèmes apicaux et des tissus vasculaires bien développés (Allen and Allen 1936; Allen and Allen 1981). La nodulation se manifeste généralement le long des racines latérales avec des distributions inégales des grappes de nodules (Allen and Allen 1936).

Dans la plupart des cas, les *Acacia* spp. qui nodulent à la fois avec des rhizobiums à croissance rapide et des rhizobiums à croissance lente, ne peuvent développer une symbiose efficace qu'avec un seul type de symbiote (Assefa and Kleiner 1998; Frioni et al. 1998; Marsudi et al. 1999; Njiti and Galiana 1996; Räsänen et al. 2001). Des études ont montré que des souches d'un même genre de rhizobium peuvent présenter des différences d'effectivité symbiotique (Galiana et al. 1990; Murray et al. 2001; Thrall et al. 2008). Ainsi, de nombreux

Acacia spp. n'ont pas de spécificité symbiotique pour la nodulation, mais semblent présenter une spécificité pour la fixation d'azote (Leary et al. 2006).

7. Mécanisme de fixation de l'azote atmosphérique

Les organismes procaryotes produisent la nitrogénase (Blondeau 1980; Rai et al. 2000), un complexe enzymatique qui catalyse la séquence complète des réactions de réduction du diazote N_2 (azote moléculaire) en azote ammoniacal, ou ammoniac (NH_3) par une réaction fortement endothermique :



La nitrogénase est un complexe oligomérique composé de deux types de protéines bien différenciés. La ferro-protéine, un dimère qui enrobe un centre Fe_4S_4 et possède deux sites de fixation pour l'ATP (Dean et al. 1993). L'autre, la ferro-molybdo-protéine est un tétramère de stœchiométrie $\alpha_2\beta_2$ (Hageman and Burris 1978). Elle renferme deux atomes de molybdène, de 28 à 32 atomes de fer et de 28 à 32 atomes de soufre. Très sensible à l'oxygène, la nitrogénase est protégée chez les légumineuses par la leghémoglobine qui contrôle le transport de l'oxygène et permet la respiration des bactéroïdes au sein du nodule (Halverson and Stacey 1986). C'est à travers cette structure particulière que se font les échanges de matériaux carbonés et azotés entre les deux partenaires symbiotiques.

8. Importance de la fixation symbiotique de l'azote

C'est le processus biologique le plus important sur terre après l'assimilation du gaz carbonique (CO_2) durant la photosynthèse (Dixon and Wheeler 1986). L'importance agricole de la fixation de l'azote n'est pas seulement de fournir de l'ammonium aux cultures, c'est également l'indépendance par rapport à l'utilisation d'engrais azotés, qui minimise la pollution des nappes phréatiques des lacs et des rivières. La symbiose légumineuses-Rhizobium et les adaptations physiologiques correspondantes fournissent également un modèle d'étude commode des interactions plante-microbe et de l'évolution (Provorov 1994).

Les légumineuses, particulièrement les espèces ligneuses tropicales, sont importantes pour maintenir la fertilité des écosystèmes et sont utilisées dans la stabilisation des sols et les programmes de végétalisation. Les légumineuses nodulent avec divers types de bactéries, contribuant ainsi à la réussite de la colonisation des légumineuses dans un large spectre d'environnements (Bala and Giller 2007; Zou et al. 1995).

Les rhizobiums isolés jusqu'à présent appartenait tous au groupe des alpha-protéobactéries. Cependant, les récentes découvertes de souches bactériennes formant des nodules racinaires sur des légumineuses qui font partie d'un autre groupe, les bêta-protéobactéries (Chen et al. 2007; Elliott et al. 2007; Moulin et al. 2001) montrent que la fixation de l'azote en symbiose avec les légumineuses est beaucoup plus répandue chez les bactéries qu'on ne le supposait jusqu'à présent. Ce résultat pourrait également ouvrir d'intéressantes perspectives sur le plan appliqué : les souches bactériennes appartiennent au genre *Burkholderia*, bactéries connues pour leur capacité à dégrader certains agents polluants. Les légumineuses formant une association avec des *Burkholderia* pourraient être utilisées pour revégétaliser des sols appauvris et/ou réhabiliter des environnements contaminés.

Par ailleurs, bien que beaucoup de légumineuses constituent d'importantes cultures alimentaires pour la consommation humaine et animale, le blé et le riz sont les principales cultures vivrières du monde. Ainsi, un des enjeux les plus importants de la recherche sur la fixation biologique de l'azote c'est d'étendre la symbiose fixatrice d'azote à ces plantes céréalières non-nodulantes (Gleason et al. 2006). Une connaissance détaillée des symbioses légumineuses-rhizobiums aiderait à formuler des stratégies pour le développement des symbioses non-légumineuses-Rhizobium (Berge et al. 2009) ou d'autres associations endophytiques (Boddey et al. 2003; Sprent et al. 2009; Zhang et al. 2008). Gutierrez-Zamora et Martinez-Romero (2001) ont montré l'existence d'associations naturelles entre endophytes de maïs (*Zea mays*) et *Rhizobium etli*. Plusieurs diazotrophes appartenant aux genres *Enterobacter* (Peng et al. 2009), *Phytobacter* (Zhang et al. 2008) et *Rhizobium* (Peng et al. 2008) ont été isolées à partir de racines de riz (*Oryza* spp.). D'autres études ont montré des associations entre des souches de bactéries fixatrices d'azote et diverses autres graminées, dont des céréales (James 2000; Jha and Kumar 2009). Une compréhension

approfondie de la fixation de l'azote des symbiotes et de leurs hôtes à un niveau moléculaire pourrait avoir une implication capitale dans l'agriculture, car l'utilisation actuelle des engrais azotés entraîne des coûts élevés à la fois sur l'économie et l'environnement.

9. Contraintes environnementales de la fixation biologique de l'azote

L'un des problèmes les plus cruciaux que doit relever l'industrie agricole est la dégradation de la qualité du sol due à la dessiccation et à la salinité. En fait, près de 40% des terres émergées de la planète sont touchées par la salinité (Zahran 1999). Ces deux sévères conditions environnementales peuvent avoir un impact dramatique sur la flore microbienne du sol (Fierer et al. 2003; Griffiths et al. 2003). De plus, la dessiccation et la salinité affectent négativement les interactions entre les Rhizobiums et les plantes et limitent la fixation d'azote (Zahran 1999).

Les souches de rhizobium diffèrent dans leur capacité à répondre à une augmentation de la pression osmotique et au stress salin. Un modèle généralisé peut être tiré de plusieurs études et est similaire à la réponse des bactéries entériques (Welsh 2000). Le métabolisme général ralentit la réponse à un stress osmotique (Dominguez-Ferreras et al. 2006). Certaines études ont montré que les gènes impliqués dans le cycle de Krebs, dans le métabolisme carboné, dans les chaînes respiratoires et les gènes ribosomiques sont réprimés. Fait intéressant, 25% de tous les gènes spécifiquement inhibés par NaCl codent pour des protéines ribosomiques.

10. Influence de facteurs environnementaux sur la symbiose *Acacia*-rhizobium

Les facteurs qui influencent la symbiose d'*Acacia* sont la sécheresse, la température du sol, la salinité et le pH acide (Ashwath et al. 1995; Craig et al. 1991; Kumar et al. 2003; Lesueur et al. 1993; Lippi et al. 2000; Mohamed et al. 2000; Zerhari et al. 2000; Zhang et al. 1991). Le stress osmotique et la dessiccation sont très différents. Le stress osmotique étant l'abondance de solutés, tandis que la dessiccation est le résultat du stress par manque d'eau. Toutefois, des données indiquent une relation entre ces deux contraintes.

Les adaptations naturelles à des environnements extrêmes font jouer aux *Acacia* un rôle important en agroforesterie et la restauration des terres dans ces environnements. Les

niveaux de tolérance au sel sont variables pour les plantes hôtes et leurs symbiotes ; la nodulation d'*Acacia* nécessite une plus faible concentration de sel que les niveaux de tolérance affichés par le *Rhizobium*. Par conséquent, la sélection pour la tolérance au sel des deux partenaires est une stratégie appropriée pour le reboisement forestier dans des environnements salins (Ruiz-Diez et al. 2009). En outre, les tolérances au sel varient suivant les espèces d'*Acacia*. Dans une expérience d'inoculation contrôlée utilisant la même souche de rhizobium, Kumar et al. (1999) ont montré qu'*A. catechu* pouvait noduler en présence de 150 mM NaCl, alors qu'*A. nilotica* ne pouvait noduler qu'à 100 mM seulement. Les variations intraspécifiques de tolérance au sel ont également été observées chez les *Acacia* spp. La nodulation d'*A. redolens* en conditions de salinité varie en fonction des provenances (Craig et al. 1991).

Les niveaux de tolérance aux stress environnementaux varient suivant les espèces de rhizobiums. Plusieurs rapports décrivent des souches de rhizobiums africaines, autochtones des climats tropicaux chauds, qui survivent à températures supérieures à 40°C (Mohamed et al. 2000; Zerhari et al. 2000; Zhang et al. 1991). Toutefois, les températures élevées peuvent encore avoir un effet négatif sur la symbiose. Odee et al. (1995) ont montré que les *Acacia* spp. autochtones du Kenya ne nodulaient pas durant les périodes les plus chaudes de l'année ; quand les températures atteignent 40°C. Par ailleurs, les espèces de *Rhizobium* et de *Ensifer* sont plus tolérantes au stress salin que les espèces de *Bradyrhizobium* (Boscari et al. 2004; Marsudi et al. 1999; Zou et al. 1995). Ainsi, des souches de rhizobium isolées de *A. farnesiana* peuvent tolérer des concentrations de NaCl de l'ordre de 5% (Surange et al. 1997). Au Soudan, Zhang et al. (1991) ont montré que des rhizobiums symbiotiques pouvaient croître normalement à 3% de NaCl et présentaient une tolérance au sel plus élevée que celle de leur plante hôte *Acacia*. *Bradyrhizobium* est plus tolérante à l'acidité du sol que les autres genres qui nodulent avec les *Acacia* (Marsudi et al. 1999). Les souches de *Bradyrhizobium* isolées d'*A. mangium* et *Faidherbia albida* se développent bien à pH 4,5 et sont tolérants à 100 µM Al (Lesueur et al. 1993). En outre, ces espèces d'*Acacia* pourraient également noduler à la même concentration d'Al, mais seulement lorsqu'ils sont inoculés avec ces souches résistantes à l'acidité. Cependant, la fixation symbiotique d'azote est plus sensible à l'acidité du sol que la croissance des plantes elles mêmes (Ashwath et al. 1995).

11. Mécanismes d'adaptation des bactéries aux stress osmotiques

Dans leur habitat naturel les microorganismes sont exposés à d'importantes fluctuations des facteurs biotiques et abiotiques. Parmi les différents facteurs environnementaux, les stress hydrique et salin sont ceux qui posent le plus de problèmes. Ainsi, les bactéries fixatrices d'azote sont très sensibles à des concentrations salines élevées qui affectent leur survie, leur croissance, les premiers stades de la symbiose et l'efficacité de la fixation biologique de l'azote (Abdelmoumen et al. 1999; Zahran 1999). Les rhizobiums présentent une importante diversité dans leur niveau de tolérance au sel. La croissance d'un certain nombre de rhizobiums est inhibée par 100 mM de sel (Zhang et al. 1991). Cependant, des croissances à des concentrations en sel supérieures à 300 mM ont été rapportées par Graham (Graham 1992). Quelques souches de rhizobiums associées à des espèces d'*Acacia*, de *Leucaena* et de *Prosopis* tolèrent jusqu'à 500 mM de NaCl (Zahran 1999; Zhang et al. 1991).

La capacité des microorganismes à s'adapter aux variations de l'osmolarité du milieu extérieur est d'une importance capitale pour leur survie. Les fluctuations de l'osmolarité du milieu imposent des mouvements d'eau selon le gradient osmotique, conduisant à la turgescence, voire à la lyse des cellules en milieu hypo-osmotique, ou à la plasmolyse et à la déshydratation en milieu hyper-osmotique (Booth et al. 1988). Les cellules s'adaptent à ces variations de pression osmotique par des réponses physiologiques variées leur permettant de maintenir un niveau d'eau satisfaisant dans le cytoplasme et donc d'ajuster la pression de turgescence par rapport à la pression osmotique externe. Pour les *Rhizobiaceae*, les mécanismes qui règlent la restauration de la pression de turgescence en conditions hyper-osmotiques ont fait l'objet de nombreuses études et ont été partiellement élucidés chez *E. meliloti* (Boncompagni et al. 2000; Boscari et al. 2002; Boscari et al. 2004; Mandon et al. 2003). L'adaptation à un choc hyper-osmotique est le plus souvent réalisée par accumulation de solutés compatibles, obtenue *via* la biosynthèse *de novo* de certains composés et/ou le transport de molécules disponibles dans le milieu extérieur, et nommées osmoprotectants ou solutés compatibles. Ces derniers jouent un rôle important dans le maintien et la stabilisation de la structure des macromolécules soumises à des fortes osmolarités (Santoro et al. 1992). La composition des principaux solutés compatibles rencontrés chez les bactéries varie d'une espèce à une autre. Ces molécules osmotiquement actives maintiennent une pression de turgescence positive nécessaire à la division cellulaire. Les solutés compatibles

sont généralement de petites molécules organiques comme les acides aminés ou leurs dérivés, des hydrates de carbone ou leurs dérivés. Certains sont largement répandus dans la nature alors que d'autres semblent être exclusivement présents dans les groupes spécifiques d'organismes (Empadinhas and da Costa 2008).

Les solutés compatibles comprennent des acides aminés comme la proline et le glutamate, des glucides comme le tréhalose et des dérivés N-méthylés d'acides aminés comme les bêtaïnes (Kempf and Bremer 1995). Les molécules osmoprotectrices les plus efficaces et utilisées par la quasi-totalité des bactéries font partie de la famille des bêtaïnes. Deux composés, la glycine bêtaïne (dérivée de la glycine) et la proline bêtaïne (dérivée de la proline), ont particulièrement été étudiés chez les bactéries, comme chez les plantes supérieures. Chez la majorité des rhizobiacées, comme *E. meliloti*, la glycine bêtaïne est une molécule osmoprotectrice majeure, dont l'accumulation est fortement stimulée lors d'un stress osmotique (Boncompagni et al. 2000; Boscari et al. 2002; Boscari et al. 2004; Mandon et al. 2003).

Par ailleurs, de nombreuses bactéries, comme *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ou *E. meliloti*, ont la capacité de synthétiser la glycine bêtaïne en utilisant la choline comme précurseur (Boch et al. 1994).

Les systèmes de transport d'osmoprotectants décrits dans la littérature peuvent être regroupés en quatre grands groupes :

- le premier, auquel appartient le système ProP, correspond à la famille des MFS, *Major Facilitator Superfamily* ;
- le second constitué par les SSSS, *Sodium/Solute Symporter Superfamily* (Saier 1994), dans lequel on trouve le système PutP d'*E. coli* ;
- le troisième représente la famille des BCCT, *Betaine Choline Carnitine Transporters*, qui constitue un sous groupe de transporteurs SSSS, avec notamment le symport BetP de *Corynebacterium glutamicum* ;
- le quatrième comprend les systèmes de type ABC (*ATP Binding Cassette*) comme ProU d'*E. coli* ou OpuA de *Lactococcus lactis* (van Der Heide and Poolman 2000) et *Bacillus subtilis* (Horn et al. 2005).

Des études menées avec ProP d'*E. coli* (Racher et al. 2001), BetP de *C. glutanicum* (Rubenhagen et al. 2000) et OpuA de *L. lactis* (Guillot et al. 2000; van Der Heide and Poolman 2000), ont démontré que l'activité des systèmes était directement régulée en fonction de l'osmolarité, ces systèmes pouvant jouer un rôle à la fois dans la perception «osmosenseur» et dans la réponse au stress osmotique «osmorégulateur». Les microorganismes possèdent habituellement plusieurs systèmes de transport d'affinité différente pour chaque soluté compatible. De plus, ces systèmes présentent une spécificité étroite ou large vis-à-vis du substrat ce qui favorise une utilisation maximale de ces osmoprotectants présents dans des habitats variés. Ainsi, *E. coli* possède deux systèmes de transport pour la glycine bêtaïne, ProU, un système protéine-dépendant, et ProP, un système de transport secondaire (Culham et al. 1993). De même, deux systèmes de transport pour la glycine bêtaïne ont été caractérisés chez *E. meliloti* : le système Hut, un système de type ABC, transporteur d'histidine également impliqué dans le transport à faible affinité de la glycine bêtaïne (Boncompagni et al. 2000) et le système BetS, un transporteur de bêtaïne choline carnitine (BCCT) nécessaire pour les ajustements osmotiques précoces (Boscari et al. 2002).

12. Présentation d'*Acacia seyal* Delile

12.1. Taxonomie

Acacia seyal Delile est l'une des plus de 60 espèces d'acacias africains, du sous-genre *Acacia*, du groupe des *Uniseriae* et de la sous-famille des *Mimosoideae*. Selon Harrier et al. (1997), cette sous-famille des *Mimosoideae* comprend trois tribus : les *Acacieae*, les *Mimoseae* et les *Ingeae* (Miller and Bayer 2001).

Une analyse de l'ADN chloroplastique de la tribu des *Acacieae* montre que le genre *Acacia* n'est pas monophylétique (Robinson and Harris 2000). Au contraire, c'est un genre cosmopolite de plus de 1350 espèces qui forme avec le genre monospécifique *Faidherbia* Chev. la tribu des *Acacieae* au sein de la sous-famille des *Mimosoideae* (Maslin et al. 2003). Le genre *Acacia* compte de nombreuses espèces adaptées à une large gamme de conditions environnementales extrêmes (Doran and Turnbull 1997; Maslin et al. 2003; Robinson and Harris 2000). La classification actuelle du genre *Acacia* distingue trois grands sous-genres :

les sous-genres *Acacia* et *Aculeiferum* Vassal qui comptent respectivement 161 et 235 espèces pantropicales ; alors que le sous-genre *Phyllodineae* (DC.) Seringe (syn. sous-genre *Heterophyllum* Vassal) compte 960 espèces, largement confinées en Australie (Maslin et al. 2003).

Synonymes: *Acacia fistula* Schweinf, *Acacia flava* (Forssk.) Schweinf. var. *seyal* (Delile) Roberty, *Acacia stenocarpa* A. Rich.

Noms vernaculaires: **Anglais:** red Acacia; **Arabe:** soffia ; **Bambara:** zayee; **Français:** mimosa épineux; **Haoussa:** Eréhi, Fara kaya; **Peul:** bulbi; **Serer:** ndoob; **Swahili:** mgunga ; **tamahaq :** Ouref ; **Wolof:** suruur; **Zarma:** sakirey ;

Classification classique d'*Acacia seyal*:

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Rosidae*

Ordre : *Fabales*

Famille : *Leguminosae*

Sous-famille : *Mimosoideae*

Tribu: *Acacieae*

Genre : *Acacia*

Sous-genre : *Acacia*

Espèce : *seyal*

12.2. Description botanique

Acacia seyal est une légumineuse ligneuse pérenne de 10 à 12 m de hauteur et 35 à 60 cm de diamètre à maturité. Elle a un fût droit et cylindrique, à cime étalée ouverte, qui peut atteindre occasionnellement plus de 17 m de hauteur (von Maydell 1983). Il existe deux variétés, qui diffèrent principalement par la présence ou non de pseudo-galles «galle à fourmis» et la couleur de l'écorce. Pour la variété *seyal*, il n'ya pas de pseudo-galles et l'écorce est de couleur rougeâtre, même si l'exfoliation périodique de l'écorce expose une

surface poudreuse pâle qui fonce lentement. La variété *fistula* présente des pseudo-galles et l'écorce poudreuse reste généralement blanchâtre ou jaune verdâtre. Les deux variétés ont des épines stipulaires droites fortes de couleur pâle, jumelées et disposées à la base des feuilles, atteignant 8 cm de long (Figure 11). Pour la var. *fistula*, les épines gris-clairs sont souvent fusionnées à la base par des pseudo-galles gonflées.



Figure 11 : Epines d'*Acacia seyal* Del. var. *fistula* (Schweinf.) Oliv. © Chris W. Fagg. <http://herbaria.plants.ox.ac.uk/VFH/image/index.php?item=2073>

Les feuilles sont alternes, bipennées de 3 à 10 cm de long et 1 à 15 mm de large, généralement avec 4-8 paires de pinnules et 10 à 20 paires de foliolules par pinnule. Les foliolules sont glabres et oblongues. Le pétiole, de 1,5 à 9 cm de long, porte souvent une glande avant la première paire de pinnules et une à la base des deux dernières.

Les inflorescences sont des fascicules de couleur jaune vif, disposées à la base des feuilles et composées de 2 à 5 capitules sphériques (Figure 12). Chaque inflorescence est portée sur un pédoncule de 34 mm de long et de 12 à 15 mm de diamètre. Les gousses de couleur brune sont déhiscentes, plates, légèrement incurvées et rétrécies entre les graines. Elles contiennent 6 à 10 graines et peuvent atteindre 20 cm de long et 5 à 10 mm de large à maturité. Elles sont pubescentes devenant glabres, brunes rougeâtres à maturité. Les graines sont brunes, assez plates et rondes. Elles mesurent 6 à 9 mm de long, 4 à 5 mm de

large et environ 2 mm d'épaisseur. Un kilogramme de graines compte 20000-25000 graines. Comme la plupart des accessions du subg. *Acacia*, *A. seyal* est tétraploïde avec un nombre de chromosomes $2n = 52$ (Bukhari 1997).



Figure 12 : Fleurs d'*Acacia seyal* Del. var. *seyal*

© CIRAD. http://fleurs.cirad.fr/var/fleurs/storage/images/fleurs_d_afrique_tropicale/a/acacia_seyal/5819-5-fre-FR/acacia_seyal_reference.jpg

12.3. Aire de répartition géographique et écologie

L'aire de répartition d'*A. seyal* s'étend du Sénégal à l'ouest jusqu'en Somalie et à l'est de la mer Rouge ; et de la vallée du Nil, au sud de l'Égypte, jusqu'au sud de la Zambie (Hall and McAllan 1993; von Maydell 1983). Les deux variétés diffèrent sensiblement dans leurs aires de répartition. La variété *seyal* s'étend vers l'ouest du Soudan central et au nord de la latitude 18°N. La variété *fistula* s'étend au sud de la latitude 10°S. Les aires de répartition se chevauchent dans le bassin supérieur du Nil, le bassin du lac Victoria et la vallée du Rift éthiopien et en Afrique orientale. La présence en dehors de l'aire de répartition naturelle est limitée aux arboretums (par exemple, en Iraq ou au Portugal) et des études expérimentales (par exemple, en Inde).

Sa répartition est irrégulière ; cependant *A. seyal* peut parfois se retrouver en peuplement pur, mais qui laisse passer une lumière suffisante pour faire pousser l'herbe dans le sous-bois. *A. seyal* est une espèce sahélo-soudanienne qu'on rencontre entre les isohyètes 400 mm et 800 mm. Son optimum écologique se situe sur les sols alluviaux à texture moyenne à

fine entre les isohyètes 500 mm et 700 mm (Mallet et al. 2003). Les gammes de température varient à travers son aire de répartition, en particulier pour la variété *seyal* qui est soumise à des températures annuelles moyennes de 18-25°C. La variété *fistula* survit principalement là où les températures annuelles moyennes sont de 20-25°C, mais aussi dans des climats plus frais en Éthiopie, à une altitude de 1700-2000 m. Dans certaines régions d'Afrique de l'Ouest où la variété *seyal* est présente, les maxima absolus de température sont de 50-55°C. Les minima absolus à travers l'aire de répartition des espèces sont en général 5-10°C, mais inférieure à 5°C, à la limite nord et à une altitude >1800 m.

L'espèce *A. seyal* se retrouve en bas de pente et les bas-fonds sur sols argileux et lourds ou sur les sols pierreux (pH 6-8), en général sur les rives près des rivières et mares. L'épithète "seyal" dérive d'un mot arabe pour "torrent" utilisées pour les espèces en Egypte, et désigne l'association avec des cours d'eau. Elle supporte les inondations temporaires suivies de sécheresses périodiques. Dans les communautés qui renferment les deux variétés, la variété *fistula* présente une plus grande tolérance à l'engorgement. Au Sénégal, il est plus fréquent dans les régions du Nord le long de la vallée du fleuve Sénégal et celles du Centre (Bassin arachidier et Sénégal Oriental) parfois sur des sols salins.

12.4. Phénologie

Le cycle phénologique est étroitement lié au régime des précipitations. En cas de régimes de précipitations unimodales bien définis, la chute des feuilles a lieu en milieu de période sèche et les arbres restent sans feuilles pendant 4-7 mois. Les périodes sans feuilles sont plus courtes dans les régimes de précipitations bimodales équatoriales. La floraison est concentrée en milieu de saison sèche et les fruits sont mûrs environ 4 mois plus tard.

12.5. Importance de l'espèce

La variété *seyal*, en particulier, est une importante source d'énergie en milieu rural à la fois comme bois de chauffe et de charbon de bois. Le bois est très diversement apprécié comme combustible. Dans certains pays (Mali, Tchad et Soudan) c'est le meilleur. Au Sénégal et au Burkina Faso, *A. seyal* occupe une position marginale pour son utilisation comme bois de chauffe. En effet, il est très rapidement attaqué par la pourriture qui réduit ainsi son pouvoir calorifique. Les fleurs servent en apiculture (miel blanc).

Le feuillage et les gousses d'*A. seyal* sont un excellent fourrage, recherché des ovins, des bovins, des caprins (Figure 13) et de nombreux animaux sauvages (Le Houérou 1980). Le contenu énergétique net de la matière sèche des deux variétés est élevé : 6-8 kg MJ⁻¹ (feuillage) et 4-7 kg MJ⁻¹ (fruits). La teneur en protéines digestibles est de 8-12% dans les feuilles et 13-15% dans les fruits (Dorthe 2000).



Figure 13 : Un arbre d'*A. seyal* brouté par une chèvre en saison sèche à Koutal (Région de Kaolack – Sénégal). © D. Diouf

Plus d'une trentaine d'espèces produisent des gommés en Afrique, mais parmi les arbres producteurs de gomme, on distingue principalement ceux qui produisent de la gomme dure (gomme dure de 1^{ère} qualité sur le marché mondial s'identifiant au Kordofan soudanais et nigérian) : *Acacia senegal* et marginalement, *Acacia polyacantha* ; et ceux qui produisent de la gomme friable : *Acacia seyal* et, marginalement, *Acacia sieberianna* et *Sterculia setigera*. D'après la définition du Codex alimentaire, seules les gommés produites par l'*Acacia senegal* et l'*Acacia seyal* ont la dénomination officielle de « gomme arabique ». L'analyse toxicologique de la gomme Talha n'a pas été évaluée et cette gomme n'est pas répertoriée comme un additif alimentaire autorisé. Elle contraste avec la gomme arabique à plusieurs égards importants, notamment pour son poids moléculaire élevé et faible en azote (0,06-0,24%) et sa teneur en rhamnose (<4% de sucre composition). Les contenus en cendres du cobalt, du cuivre, du fer, du nickel et, surtout, l'aluminium (>6000 ppm) sont élevés et le

tanin est présent (2%), limitant l'utilisation acceptable pour des applications comme un liant pour le moulage de fonderie et d'encollage dans l'industrie textile.

Toutes les parties de l'arbre ont une teneur en tanin jusqu'à 18-20% (Wickens et al. 1995). L'écorce est utilisée pour traiter la dysenterie et les infections bactériennes de la peau, telles que la lèpre. L'écorce est aussi utilisée comme un stimulant. La gomme est utilisée comme un aphrodisiaque, comme un émollient, pour traiter la diarrhée, les hémorragies, l'inflammation de l'œil, des affections de l'intestin et la rhinite.

Comme la plupart des légumineuses, il participe aussi à la conservation et à l'amélioration de la fertilité du sol grâce à sa capacité à former une symbiose fixatrice d'azote avec les rhizobiums (Dommergues et al. 1999).

CHAPITRE I : DIVERSITE GENETIQUE DES RHIZOBIUMS AUTOCHTONES DES SOLS DES BASSES VALLEES DU SINE ET DU SALOUM ASSOCIES A A. SEYAL

I. INTRODUCTION

Le bassin arachidier du Sénégal, ainsi appelée en raison de la principale culture de rente du pays, est situé entre les longitudes 14° 15' O et 17° 15' O et les latitudes 13° 60 'N et 16° 15' N (Figure 14).

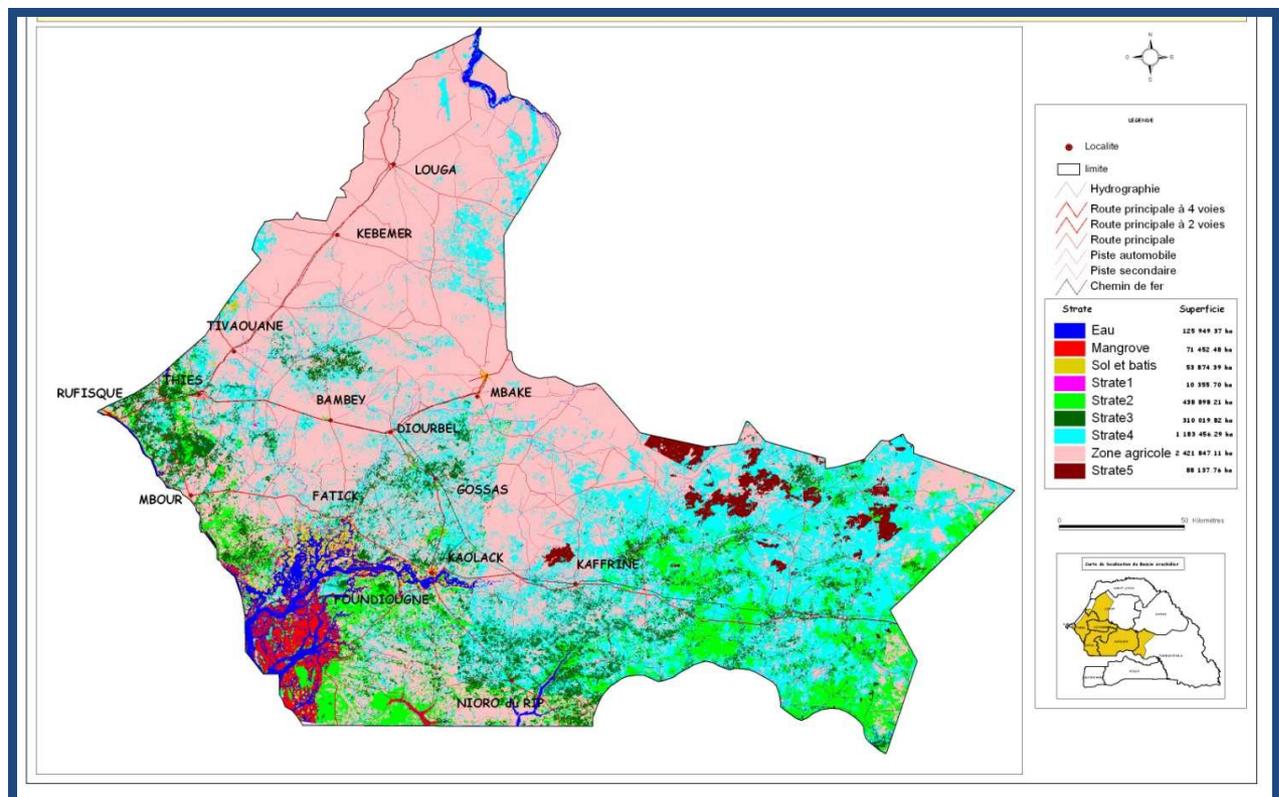


Figure 14 : Carte d'occupation des sols du Bassin arachidier (Source : Scientific Study on Land Degradation/PROGERT/ICA, 2005)

Depuis les années 1960, le bassin arachidier du Sénégal, à l'image de la zone semi-aride du Sahel, a connu une grave sécheresse liée au changement climatique (Zeng 2003). La salinisation des terres dans le Sine-Saloum, à la suite de l'intrusion d'eau de mer des fleuves Sine et Saloum, est devenue très préoccupante (Boivin and Le Brusq 1985). Cette situation a aggravé la perte de terres boisées, contribuant ainsi à la baisse de la fertilité des sols et à la

réduction des rendements agricoles. Une approche possible pour améliorer les programmes de réhabilitation des sites dégradés est d'inoculer les plantes avec des microsymbiotes sélectionnés (Dommergues 1995; Requena et al. 2001; Sutherland et al. 2000). La régénération de sols salés grâce à des espèces de légumineuses ligneuses à usages multiples, modérément tolérantes au sel, tels que les *Acacia* spp., est une pratique couramment utilisée pour surmonter les problèmes de stress salin (Giri et al. 2003; Midgley and Bond 2001). Dès lors, la récupération des terres salées dans cette zone pédoclimatique ouvre des perspectives avantageuses dans un processus de séquestration du carbone²² par la biomasse terrestre.

L'efficacité de la fixation biologique de l'azote chez les légumineuses peut être optimisée par l'inoculation des plantes avec des souches de rhizobium performantes (Bordeleau and Prévost 1994; Diouf et al. 2005; Dommergues 1995; Requena et al. 2001; Sutherland et al. 2000). Cependant, les stress environnementaux comme la sécheresse, les températures élevées du sol, la salinité et les valeurs élevées ou trop faibles du pH du sol peuvent nuire à la survie, à la croissance et à l'efficacité de la fixation de l'azote des souches de rhizobium (Bordeleau and Prévost 1994; Carter et al. 1994). Certains auteurs ont montré que les sols tropicaux peuvent contenir des souches adaptées à des contraintes environnementales extrêmes (Mpepereki et al. 1997; Zahran 1999; Zerhari et al. 2000; Zhang et al. 1991). Une meilleure connaissance de la diversité des rhizobiums qui forment des symbioses avec *A. seyal* devrait faciliter la sélection de souches efficaces pour la fixation biologique de N₂ et fournir une source de diversité génétique pour améliorer la mise en place de cette espèce dans le bassin arachidier du Sénégal.

Dans cette étude, nous avons examiné le polymorphisme génétique des populations de rhizobiums associés à *A. seyal* dans le bassin arachidier du Sénégal. Les souches de bactéries ont pendant longtemps été classées sur la base des caractéristiques phénotypiques telles que la nodulation, la pathogénicité et les propriétés physiologiques. Cependant, ces caractéristiques sont devenues moins adaptées à une discrimination taxonomique (Kwon et al. 2005). Contrairement au gène de l'ARNr 16S, qui est remarquablement bien conservé au cours de l'évolution de la plupart des espèces bactériennes, L'espace inter génique (*Inter*

²² La séquestration du carbone consiste à capter et emmagasiner du carbone émis par des sources diffuses ou ponctuelles.

Genic Spacer, IGS) entre l'ADNr 16S et 23S de l'ADN ribosomique (ADNr) est variable aussi bien en longueur qu'en séquence. La forte variabilité de la séquence de la région IGS s'est révélée plus instructive pour la caractérisation taxonomique des souches de *Bradyrhizobium* spp. (van Berkum and Fuhrmann 2000; Willems et al. 2001).

L'extraction de l'ADN à partir de broyats de nodules et son amplification par PCR ont été utilisées antérieurement pour étudier les relations phylogénétiques entre les souches de référence *Frankia* et des souches de *Frankia* dans les nodules de plants de *Casuarinaceae* (Rouvier et al. 1996) et la caractérisation de la diversité des rhizobiums (Krasova-Wade et al. 2003; Romdhane et al. 2005; Thiao et al. 2004). Nous avons analysé la région intergénique 16S-23S, de l'ADNr extrait de nodules en utilisant la technique PCR-RFLP. La position phylogénétique des souches de rhizobium correspondant aux différents profils RFLP de l'IGS a été également déterminée par l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et de l'ADNr 16S-23S. Les corrélations entre la diversité des populations autochtones de rhizobiums identifiés et les conditions écologiques, en particulier le pH et la salinité des sols d'échantillonnage, ont été examinées par une analyse en composantes principales (ACP).

MATERIEL ET METHODES

1. Echantillonnage de sols

Les sols ont été prélevés en Novembre 2004, à la fin de la saison des pluies, de 17 sites d'échantillonnage représentatifs des sols et des zones de culture de toute la partie centrale du Sénégal et le long des fleuves Sine et Saloum (Tableau 3). Ces sites, où la pluviométrie annuelle varie entre 650 et 700 mm, sont couverts par les peuplements naturels d'*A. seyal*. Quarante-deux (42) échantillons de sols représentatifs des différentes situations locales (rhizosphère d'*A. seyal*, hors couvert végétal) ont été recueillis à l'horizon 0-25 cm de profondeur. Les échantillons de sols ont été tamisés (3 mm de maille) pour enlever les pierres et les gros morceaux de matière organique non décomposée, puis conservés à 4 °C dans des sacs en plastique propres. La conductivité électrique (CE) et le pH des échantillons de sol ont été mesurés par le laboratoire d'analyse des sols du CIRAD à Montpellier (France).

Tableau 3 : Caractéristiques des sites d'échantillonnage des sols ayant servi au piégeage des rhizobiums sur des racines de plants d'*A. seyal*

Référence de sol	Caractéristiques des sites d'échantillonnage des sols			
	Origine géographique des sols (Latitude, longitude)	Sites	pH	EC (μS/cm)
1	Ndiafate 1 (14°03 753'N, 16°11 239'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,37	698
2	Ndiafate 2 (14°03 914'N, 16°11 200'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,30	1160
3	Ndiafate 3 (14°03 965'N, 16°11 187'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,72	330
4	Vélor 1 (14°03 467'N, 16°11 243'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,14	220
5	Vélor 2 (14°03 466'N, 16°11 176'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,20	200
6	Vélor 3 (14°03 466'N, 16°11 195'W)	Sous <i>A. seyal</i>	5,99	13290
7	Koutal (14°05 208'N, 16°07 535'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,17	833
8	Nonane 1 (14°18 187'N, 16°21 340'W)	Sol sans végétation	5,83	4580
9	Nonane 2 (14°18 187'N, 16°21 340'W)	Sous <i>A. seyal</i>	5,74	4330
10	Nonane 3 (14°18 144'N, 16°21 163'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,29	951
11	Nonane 4 (14°18 173'N, 16°21 130'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,00	380
12	Foudiougne 1 (14°10 007'N, 16°27 880'W)	Sous <i>A. seyal</i>	5,52	235
13	Foudiougne 2 (14°10 578'N, 16°27 498'W)	Sous <i>A. seyal</i>	5,44	218
14	Foudiougne 3 (14°10 591'N, 16°27 528'W)	Sous <i>A. seyal</i>	5,84	830
15	Foudiougne 4 (14°11 907'N, 16°26 946'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,87	834
16	Foudiougne 5 (14°11 935'N, 16°26 836'W)	Sous <i>A. nilotica</i>	6,9	805
17	Djilass 1 (14°13 234'N, 16°39 081'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,15	758
18	Djilass 2 (14°13 035'N, 16°39 166'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,26	706
19	Djilass 3 (14°13 039'N, 16°39 155'W)	Sous <i>A. seyal</i>	7,01	1449
20	Ngallou 1 (14°05 381'N, 16°46 597'W)	Sous <i>A. nilotica</i>	8,16	940
21	Ngallou 2 (14°05 580'N, 16°45 526'W)	Sol sans végétation	8,53	17070
22	Ngallou 3 (14°05 580'N, 16°45 525'W)	Sous <i>A. seyal</i>	8,73	953
23	Ngallou 4 (14°06 597'N, 16°45 525'W)	Sous <i>A. seyal</i>	8,46	900
24	Ngallou 5 (14°06 598'N, 16°45 522'W)	Sous <i>A. seyal</i>	8,08	1480

Tableau 3 (Suite)

Référence de sol	Caractéristiques des sites d'échantillonnage des sols			
	Origine géographique des sols (Latitude, longitude)	Site	pH	EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
25	Ngallou 6 (14°06 798'N, 16°44 788'W)	Sous <i>A. seyal</i>	8,18	812
26	Samba dia (14°08 214'N, 16°46 300'W)	Sous <i>A. seyal</i>	7,95	1234
27	Mbissel 1 (14°09 748'N, 16°45 104'W)	Sous <i>A. seyal</i>	8,48	283
28	Mbissel 2 (14°09 753'N, 16°45 113'W)	Sous <i>A. seyal</i>	8,29	270
29	Ngohakob (14°10 797'N, 16°48 690'W)	Sous <i>A. seyal</i>	8,56	1740
30	Joal (14°11 355'N, 16°51 608'W)	Sous <i>A. seyal</i>	nd	1620
31	Mbodiène (15 km Sud de Joal)	Sous <i>A. seyal</i>	nd	1520
32	Projet Africare 1 (15 km Sud de Kaolack; 14°15N,16°10W)	Sous <i>Tamarix affila</i>	6,93	4040
33	Projet Africare 2 (15 km Sud de Kaolack)	Sol sans végétation	4,46	17350
34	Projet Africare 3 (15 km Sud to Kaolack)	Sous <i>A. seyal</i>	6,33	575
35	Projet Africare 4 (15 km Sud de Kaolack)	Sol sans végétation	4,47	1172
36	Ngane 1 (24 km Est de Fatick 14°35N, 16°42W)	Sol sans végétation	4,30	43900
37	Ngane 2 (24 km Est de Fatick)	Sol sans végétation	6,33	8180
38	Ngane 3 (24 km Est de Fatick)	Sous <i>A. seyal</i>	6,25	4090
39	Ngane 4 (24 km Est de Fatick)	Sol sans végétation	5,76	36700
40	Gamboul (22 km Est de Fatick)	Sous <i>A. seyal</i>	6,20	208
41	Keur Alfa (20 km Est de Fatick)	Sous <i>A. seyal</i>	6,10	713
42	Bambey (14°71N, 16°46W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,50	148

2. Piégeage des rhizobiums

Le piégeage des rhizobiums autochtones des sols collectés a été effectué avec des jeunes plants d'*A. seyal*. Ces plants sont obtenus à partir de graines provenant de la station expérimentale de Dahra, au Nord du Sénégal (lot de semences n° 95/5263 de l'Institut Sénégalais de Recherche Agricole/Direction de Recherche sur les Productions Forestières). La scarification et la désinfection superficielle des graines ont été réalisées par un trempage dans un bain d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré pendant 30 min, suivi d'un rinçage abondant à l'eau distillée stérile. Cette opération permet également une germination

homogène des graines. Ces dernières ont ensuite été placées sur des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée (1% ; p/v). Les boîtes scellées au parafilm ont par la suite été placées à l'étuve à 37°C pendant 24 h.

Pour les tests de nodulation *in vitro*, les semis ont été mis en culture aseptiquement sur un dispositif composé d'un tube à essai (220 x 22 mm) contenant 30 ml de milieu nutritif de Jensen (Vincent 1970) gélosé, stérile et incliné (Gibson 1980). Les tubes ont été recouverts avec du papier aluminium percé de deux orifices : l'un sert au repiquage de la graine par lequel descend la radicule de la plantule et l'autre fermé par un bouchon en caoutchouc permet l'arrosage et l'inoculation. Pour éviter le dessèchement des cotylédons et pour leur permettre de se libérer spontanément de l'enveloppe tégumentaire, les plants ont été recouverts par du papier buvard imbibé puis laissés en atmosphère humide dans un bac d'eau pendant 48 h. Les plants ont ensuite été maintenus en chambre de culture pendant 1 mois avec une photopériode de 16 h (jour) et 8 h (nuit), une température de 30 ± 1 °C (jour) et 28 ± 1 °C (nuit), une humidité relative de 70 ± 5 % et un rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) de $120 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Une semaine après repiquage, qui correspond à l'apparition des poils absorbants, les plants ont été inoculés avec une suspension de sol (1/10 ; p/v). Pour ce faire, 10 g de chaque sol ont été suspendus pendant 1 h dans 90 ml d'eau physiologique stérile pH 7 (NaCl : 8,77 g/l ; KH_2PO_4 : 0,27 g/l ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_2\text{O}$: 0,71 g/l ou Na_2HPO : 0,568 g/l). Pour chaque sol, 4 répétitions ont été effectuées à raison de 1 ml par plant et 4 plants non inoculés ont servi comme témoins. Enfin, la nodulation a été suivie et les nodules ont été récoltés au bout de 5 semaines après l'inoculation.

3. Caractérisation moléculaire de la diversité génétique des souches de rhizobium associées à *A. seyal*

3.1. Traitement des nodules et extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir de nodules d'*A. seyal* récoltés dans les différents tubes de culture ayant reçu les différentes dilutions de sol. Les nodules ont été aseptisés avec de l'hypochlorite de calcium saturé (CaCl_2 , O_2) et de l'alcool absolu (éthanol 96°). Ils ont ensuite été rincés abondamment à l'eau déminéralisée. Pour chaque échantillon de sol, deux plants ont été retenus. Pour chaque plant, 3 nodules ont été choisis au hasard, soit au total 6

nodules par échantillon de sol. Chaque nodule a été écrasé à 4 °C avec un pilon (homogénéisateur de type Potter) en plastique stérilisé, dans un tube Eppendorf contenant 150 µl de tampon d'extraction 2X [TrisHCl 100 mM, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) 2%, PolyVinyl PolyPyrrolidone (PVPP) 1%] et 150 µl d'eau ultra pure stérile. Un aliquote de 50 µl du broyat a été prélevé puis mélangé à 50 µl de glycérol 40% (v/v), puis le mélange a été conservé -20 °C en vue de l'isolement des souches.

L'extraction de l'ADN a été réalisée directement à partir des broyats de nodules selon la technique décrite par Krassova-Wade et al. (2003). Le broyat de nodules a été incubé à 65 °C pendant 60 min. Les débris de nodules ont été éliminés par centrifugation à 15000 tours/min pendant 10 min. Le surnageant a ensuite été extrait avec un volume égal (300 µl) de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1 ; v/v/v). Le mélange a été centrifugé à 15000 tours/min à 4 °C pendant 15 min (ultracentrifugeuse Modèle 3K15, SIGMA, Osterode am Harz, Allemagne). L'ADN de la phase aqueuse a été purifié du phénol avec 300 µl de chloroforme-alcool isoamylique (24:1 ; v/v) et centrifugé à 15000 tours/min pendant 15 min, puis recentrifugé pendant 5 min. L'ADN de la phase aqueuse a été précipité pendant toute une nuit à -20 °C dans 0,1 volume d'acétate de sodium et de 2,5 volumes d'éthanol absolu. Les échantillons ont été centrifugés pendant 30 min à 13000 tours/min à 4 °C. Le culot résultant de l'ADN a été lavé avec de l'éthanol à 70% (v/v) par centrifugation pendant 15 min à 13000 tours/min à 4 °C. L'ADN purifié a été séché sous vide et solubilisé dans 20 ml d'eau Milli-Q stérile. La pureté et la quantité d'ADN extrait ont été évaluées à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS (Modèle Ultrospec, Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, USA) dans une gamme de longueurs d'onde variant entre 200 nm et 340 nm.

3.2. Isolement, croissance et conditions de culture des souches des rhizobiums

Les souches de bactéries ont été isolées à partir de nodules écrasés, préalablement conservés à -20 °C dans du glycérol 40% (v/v), par stries d'épuisement sur milieu *yeast extract-mannitol agar* (YMA) (Vincent 1970) contenant du rouge Congo (0,00125% ; p/v). La pureté des colonies montrant les caractéristiques morphologiques des souches de rhizobium a été vérifiée par observation de croissance bactérienne sur boîte de Petri à l'oeil nu stries

répétées sur milieu YMA et par l'examen microscopique des cellules vivantes. Les cultures pures ont ensuite été conservées à -80 °C sur milieu liquide *yeast extract-mannitol medium* (YEM) ajusté à 20% (v/v) de glycérol. Un numéro « ORS » qui fait référence à la collection de culture du Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/ISRA/UCAD de Dakar au Sénégal a été affecté aux isolats après le test d'authentification qui permet de confirmer qu'il s'agit bien de rhizobium.

3.3. Analyse du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP) de l'IGS 16S-23S ADNr des souches de rhizobiums

L'espace inter génique (*Inter Genic Spacer*, IGS) entre l'ADNr 16S et 23S a été amplifié par PCR comme décrit par Sarr *et al.* (2005) avec les amorces FGPS1490-72 (5'-TGC GGC TGG ATC CCC TCC TT-3') (Normand *et al.* 1996) et FGPL132'-38 (5'-CCG GGT TTC CCC ATT CGG-3') (Ponsonnet and Nesme 1994). Les produits d'amplification obtenus ont été hydrolysés par deux enzymes de restriction ; *MspI* (5'-C/CGG-3') et *HaeIII* (5'-GG/CC-3'), comme décrit par le fabricant (Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, USA). Ces enzymes ont été choisies d'après les résultats d'études antérieures, sur l'analyse des régions IGS de rhizobiums par PCR-RFLP, qui ont montré qu'elles étaient les plus discriminantes (Laguerre *et al.* 1994). Suivant l'intensité des bandes obtenues sur le gel de contrôle après la PCR, 7 à 10 µl d'amplifiats ont été digérés pendant 2 h au minimum à raison de 10 U par 20 µl de volume réactionnel. Les fragments de restriction ont été séparés par électrophorèse horizontale à 80 V pendant 3 h sur un gel Metaphor® 3 % (FMC Bioproduct, Rockland, Maine, USA) dans du tampon TBE 1X et coloré au bromure d'éthidium (BET) à 0,5 µg/ml. Après migration, les gels ont été photographiés sous UV avec le logiciel Gel Doc (Bio-Rad). Les profils de restriction des deux enzymes ont été comparés par pair pour tous les extraits d'ADN. Enfin, les extraits qui présentent des profils identiques ont été regroupés en types IGS ou groupes électrophorétiques IGS-RFLP.

Pour étudier les relations entre les profils IGS PCR-RFLP, le pH et la salinité des échantillons de sols utilisés comme inoculum initial pour les tests de la nodulation, nous avons fait l'analyse en co-inertie basée sur l'analyse de la variance inter-groupes (*Between-Group Analysis*, BGA). Il s'agit d'une technique d'analyse multi-variée qui décrit les rapports entre deux tableaux de données (Dolédec and Chessel 1987; Oda and Ouchi 1989). Les calculs et

les représentations graphiques ont été réalisés avec le logiciel ADE-4 (Thioulouse et al. 1997).

4. Caractérisation phylogénétique des souches de rhizobium associées à *A. seyal*

4.1. Séquençage de l'ADNr 16S

L'ADNr 16S des isolats représentant les groupes électrophorétiques IGS-RFLP préalablement définis a été séquencé afin de déterminer leur position phylogénétique. L'ADN génomique a été extrait à partir de suspensions cellulaires en phase stationnaire de culture sur milieu YEM. La suspension bactérienne a été centrifugée à 12000 tours/min pendant 2 min puis mélangée dans un volume de tampon 1X CTAB/PVPP. L'ADN génomique total a été récupéré et purifié comme décrit plus haut (§ 4.1.). Les réactions de PCR de l'ADNr 16S ont été préparées en utilisant les amorces universelles de l'ADNr 16S des eubactéries FGPS6 (5'-GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA G-3') and FGPS1509 (5'-AAG GAG GGG ATC CAG CCG CA-3') (Normand et al. 1992). L'amplification par PCR a été réalisée comme décrit précédemment (Sy et al. 2001) : un premier cycle de dénaturation à 94 °C pendant 5 min, 35 cycles de dénaturation à 94 °C pendant 30 s, une hybridation à 55 °C pendant 30 s, et une polymérisation à 72 °C pendant 1 min ; puis une extension finale à 72 °C pendant 7 min. La migration des produits PCR a été effectuée sur un gel horizontal d'agarose à 1 % (p/v) dans du tampon TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8,3). Les bandes d'environ 1500 paires de bases (pb) nucléotidiques ont été excisées et l'ADN a été purifié avec un kit d'extraction QIAquick (Qiagen, Courtaboeuf, France). Pour le séquençage, les amorces FGPS6, FGPS1509 et 16S-1080r (Sy et al. 2001) ont été utilisées. Les réactions de séquence ont été effectuées à l'aide d'un Kit thermocycleur de séquence ABI Prism BigDye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, California 94404, USA) et les séquences ont été analysées avec un séquenceur de type Applied Biosystems ABI 310 DNA sequencer (GMI Inc., Minnesota 55303, USA). Les séquences obtenues ont été analysées et corrigées avec le logiciel Sequence Navigator (Parker 1997) et les séquences double brin ont été alignées en séquence consensus avec le programme Auto Assembler (Perkin Elmer, Nieuwerkerk a/c Ijssel, Pays-Bas). Les séquences consensus ont été comparées selon les procédés BlastN (Altschul et al. 1997) aux séquences contenues dans la base de données GenBank par l'intermédiaire du serveur NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) et les séquences proches ont été incluses dans l'analyse

phylogénétique réalisée à l'aide du logiciel ClustalX (Thompson et al. 1997). Les séquences ont été corrigées manuellement avec par le logiciel GeneDoc (Nicholas and Nicholas 1997). Les numéros d'accèsion GenBank de DQ859034 à DQ859045 et de EF054874 à EF054876 ont été attribués aux séquences de l'ADNr 16S des isolats représentant les groupes électrophorétiques IGS-RFLP. Les comparaisons par paires ont été corrigées pour les substitutions de bases multiples suivant la méthode des deux paramètres de Kimura (Kimura 1980). Un arbre phylogénétique a été construit en utilisant l'algorithme *Neighbor-Joining* (Saitou and Nei 1987). La souche d'*Azorhizobium caulinodans* ORS 571^T (D11342) a été utilisée comme une référence extérieure au groupe ou *outgroup*. Une analyse de bootstrap a été réalisée sur 1000 répétitions pour vérifier la stabilité des groupes en utilisant les programmes DNABOOT, DNADIST, NEIGHBOR et CONSENSE (Felsenstein 1985). La représentation graphique de l'arbre résultant a été obtenue avec le logiciel NJplot (Perriere and Gouy 1996).

4.2. Séquençage de l'ADNr 16S-23S

Les ARNr 16S et 23S restent les meilleurs marqueurs pour déterminer la phylogénie globale des procaryotes. Cependant, il convient de noter que l'utilisation du marqueur moléculaire 16S n'est pas appropriée pour séparer des espèces trop proches (Fox et al. 1992; Ludwig and Schleifer 1999). Outre le gène codant l'ARNr 16S, l'espace intergénique (IGS) localisé entre les gènes codant pour l'ARNr 16S et l'ARNr 23S a été également utilisé pour étudier la diversité et la structure des rhizobiums nodulant *A. seyal*. Cette région présente la particularité d'un polymorphisme de taille très important permettant de différencier des espèces. L'espace intergénique de la région 16S-23S ADNr de neuf isolats représentatifs des profils RFLP proches du genre *Mesorhizobium*, identifiés par séquençage de l'ADNr 16S a été amplifié en utilisant les amorces FGPS1490-72 (Normand et al. 1996) et FGPL132'-38 (Ponsonnet and Nesme 1994). Les isolats suivants ont été testés : ORS 3324, ORS 3355, ORS 3356, ORS 3357, ORS 3359, ORS 3365, ORS 3369, ORS 3397 et ORS 3404.

L'amplification a été réalisée dans un volume réactionnel de 25 µl contenant : 2 µl d'extrait d'ADN total (ajusté à 10 - 50 ng µl⁻¹), 2,5 µl de tampon 10X concentré (Eurogentec, Cologne, Allemagne), 0,75 µl de MgCl₂ (50 mM), 2 µl de dNTPs (2,5 mM chacun), 1 µl de chacune des amorces (20 pmol/µl), 1 U de Taq polymérase (Gibco-BRL, Carlsbad, California, USA) et la

quantité nécessaire d'eau ultra pure stérile pour compléter le volume à 25 µl par tube de PCR. Les amplifications ont été effectuées à l'aide d'un amplificateur Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, Nieuwerkerk a/c IJssel, Pays-Bas) selon le programme "Touchdown" PCR (Don et al. 1991). Ce programme regroupe deux séries de cycles, ce qui permet de tester une gamme de températures décroissantes (de 0,5 °C par cycle) pour l'hybridation des amorces lors d'une première série de cycles, puis une seconde série permet d'amplifier les fragments d'ADN obtenus lors de la première série. Dans un premier temps, le mélange a été incubé à 96 °C pendant 5 min, suivi par 20 cycles de dénaturation à 96 °C pendant 1 min, d'hybridation pendant 1 min entre 60 °C et 50 °C et de polymérisation à 72 °C pendant 1 min. La seconde série comprend 25 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 1 min, d'hybridation à 50°C pendant 1 min et de polymérisation à 72 °C pendant 90 s. Enfin, la PCR est terminée par 7 min d'élongation à 72 °C. La migration des produits PCR a été effectuée sur un gel horizontal d'agarose à 1 % (p/v) dans du tampon TAE (40 mM Tris acétate, 1 mM EDTA, pH 8,3), sous une tension de 100 V et une intensité de 35 mA. Le marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (Eurogentec, Cologne, Allemagne) a été utilisé afin de vérifier la taille et la concentration du fragment amplifié. Les bandes (environ 900 bp) ont été excisées et l'ADN a été purifié avec un kit d'extraction QIAquick (Qiagen, Courtaboeuf, France), conformément aux instructions du fabricant. Le séquençage partiel de la région IGS a été réalisée avec quatre amorces, FGPS1490-72, FGPL132'-38, les amorces BR1 et BR4 synthétisées par Willems *et al.* (2001). Les séquences ont été assemblées et alignées. Les numéros d'accession GenBank de DQ886908 à DQ886916 et de FJ848985 à FJ848986 ont été attribués aux séquences 16S-23S ADNr des souches. Un arbre phylogénétique a été construit comme décrit ci-dessus. La souche ORS 571^T (ou LMG 6465^T) (AF345253) d'*A. caulinodans* a été utilisée comme *outgroup*.

5. Infectivité et effectivité *in vitro* des souches de rhizobiums associées à *A. seyal*

L'infectivité des quinze souches de rhizobiums isolées de nodules d'*A. seyal* représentatifs des différents groupes IGS-RFLP identifiés par PCR-RFLP a été confirmée par l'inoculation des plants d'*A. seyal* cultivés comme décrit ci-dessus. En plus des quinze souches de rhizobiums isolées de nodules d'*A. seyal* la spécificité de nodulation et de fixation d'azote sur *A. seyal* a également été testée pour des représentants des genres *Allorhizobium*, *Azorhizobium*,

Bradyrhizobium, *Mesorhizobium*, *Ensifer* et *Rhizobium*. Une semaine après la germination, quatre plants ont été inoculés avec une suspension cellulaire d'environ 10^9 cellules de chaque isolat. Des plants non inoculés, mais cultivés dans les mêmes conditions ont été retenus comme témoins. La nodulation des plants a été suivie pendant 5 semaines après l'inoculation et l'effectivité des souches a été appréciée sur la base de la présence et la couleur des nodules, la vigueur des plants et la couleur du feuillage (Musiyiwa et al. 2005). L'efficacité symbiotique des isolats inoculés a été appréciée chez les plantes inoculées en donnant les notes ci-après :

(0) lorsque les plantes inoculées ne forment pas de nodules ; (i) inefficaces, lorsque les plants étaient nodulés, mais n'étaient pas plus verts que les plants non inoculés et avec des nodules blancs ; (e) souches moyennement efficaces, lorsque les plants étaient plus verts que les plants non inoculés et (E) souches efficaces, lorsque les plants étaient plus verts et avec une biomasse plus importante que celles des plants moyennement efficaces.

RESULTATS

1. Avant propos

Une partie de ce chapitre a fait l'objet d'un article et de 6 communications à des congrès internationaux.

1. **Diouf D**, Samba-Mbaye R, Lesueur D, Ba AT, Dreyfus B, de Lajudie P, Neyra M (2007). Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. rhizobial populations indigenous to Senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. *Microbial Ecology* 54: 553-566. URL : http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8252-8_47. **(Impact Factor 2009 : 3.251)**
2. de Lajudie P, Neyra M, Galiana A, Nzoue A, Sy A, Molouba F, Chaintreuil C, Moulin L, Le Roux C, Domergue O, Jourand P, Merabet C, Bekki A, Gueye M, Sylla S, Ndoye I, **Diouf D**, Wade T, Sow H, Houngnandan P, Zoubeirou AM, Yattara I, Sacko O, Atallah T, Zakhia F, Mars M, Mahdhi M, Jeder H, Filali-Maltouf A, Mohamed SH, Dreyfus B (2009). Investigating and promoting new local legume symbioses for development in West African and Mediterranean countries. Communication orale présentée au Congrès International MICROBIOD « Microbial Biotechnology for Development », Marrakech, Maroc, 02-05 Novembre 2009. pp. 47-48. MICROBIONA Edition. <http://www.ucam.ac.ma/microbiona/Ressources/Actes-congres-MICROBIOD-2009.pdf>
3. De Lajudie P, Neyra M, Galiana A, N'Zoué A, Sy A, Molouba F, Chaintreuil C, Moulin L, Le Roux C, Domergue O, Jourand P, Renier A, Méribet C, Bekki A, Gueye M, Sylla S, Ndoye I, **Diouf D**, Wade T, Sow H, Houngnandan P, Zoubeirou AM, Yattara I, Sacko O, Atallah T, Zakhia F, Mars M, Mahdhi M, Jeder H, Filali-Maltouf A, Mohamed SH, Dreyfus B (2008). Investigating and promoting new local legume symbioses for development in West African and Mediterranean countries. Communication orale présentée à la 8e Conférence Européenne pour la fixation de l'Azote, 30 Août-3 Septembre 2008, Ghent, Belgique. http://publications.cirad.fr/une_notice.php?dk=553559.
4. **Diouf D**, Samba-Mbaye R, Lesueur D, Ba AT, Dreyfus B, Neyra M (2007). Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. rhizobial populations indigenous to Senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. Poster et Communication orale présentés au 15^e Congrès International pour la Fixation Biologique de l'Azote & 12^e Congrès International de l'Association Africaine pour la fixation Biologique de l'Azote, 21-26 Janvier 2007, Cape Town, Afrique du Sud.
5. **Diouf D**, Samba-Mbaye R, Dreyfus B, Ba AT, Lesueur D, Avarre JC, Neyra M (2004). Genetic polymorphism and salt resistance of rhizobia associated with *Acacia seyal* isolated from different Senegalese soils. Poster présenté au 11^e Congrès International de l'Association Africaine pour la fixation Biologique de l'Azote, 22-27 Novembre 2004, Dakar, Sénégal.
6. **Diouf D**, Chaintreuil C, Ba AT, Lesueur D, Samba-Mbaye R, Dreyfus B, Benna G, Neyra M (2004). Genetic diversity and phylogeny of rhizobia associated with *Acacia seyal* isolated from Senegalese soils. Poster présenté à la 6^e Conférence Européenne pour la fixation de l'Azote, 24-27 Juillet 2004, Toulouse, France.
7. **Diouf D**, Lesueur D, Ba AT, Dreyfus B, De Lajudie P, Neyra M (2004). Diversité et structure des populations de rizobium symbiotes d'*Acacia seyal* de sols du Sénégal. Poster présenté à la 2e Conférence Méditerranéenne de Rhizobiologie, 23-25 Mai 2004, Oran, Algérie.

2. Piégeage des rhizobiums

Le potentiel infectieux rhizobien des sols échantillonnés a été évalué *in vitro* sur des plants d'*A. seyal*. La nodulation des plants a été suivie et les nodosités ont été récoltées au bout de 6 semaines après germination ; c'est à dire 5 semaines après l'application de la suspension de sol sur le système racinaire. Les échantillons de sol diffèrent dans leur capacité à induire la nodulation sur les racines des plants d'*A. seyal* (Tableau 4). Le niveau de salinité de l'échantillon de sol semble affecter la nodulation des plants. A l'exception du sol n° 8 de Nonane 1, recueilli sur un site dépourvu de végétation, les sols n'induisent pas de nodulation ou induisent une faible nodulation ; quand la salinité de l'échantillon de sol est supérieure à 4,3 mS/cm. De même, à l'exception du sol n° 35, une faible nodulation n'a été notée lorsque le pH de l'échantillon de sol est inférieur à 5,8. En revanche, la nodulation a eu lieu sur la plupart des sols alcalins (pH supérieur à 8) et les sols non salés.

Tableau 4 : Diversité des géotypes de rhizobiums associés à *Acacia seyal*, de diverses origines, caractérisée par analyse PCR-RFLP de l'IGS 16S-23S de l'ADNr (profil IGS-RFLP) de broyats de nodules. Les rhizobiums ont été piégés *in vitro* sur des racines de plants d'*A. seyal* inoculés avec des suspensions de sols représentatifs des différents milieux au Sénégal. Les profils de restriction ont été obtenues avec les enzymes *HaeIII* et *MspI*. ^a–: pas de nodulation; +---: un plant nodulé; ++-: deux plants nodulés; +++: trois plants nodulés; ++++: tous les quatre plants sont nodulés. ^bUn profil IGS-RFLP correspond à un groupe d'échantillons qui présentent les mêmes profils de restriction de l'ADNr avec les deux enzymes *HaeIII* et *MspI*. Les chiffres Romains indiquent les profils IGS-RFLP. Les chiffres arabes à l'intérieur du tableau indiquent le nombre de nodules de chaque sol qui présentent le même profil IGS-RFLP.

Référence sol	Caractéristiques des sites d'échantillonnage des sols				Nodulation ^a	Profils IGS-RFLP														
	Origine géographique des sols (Latitude, longitude)	Sites	pH	EC (μS.cm ⁻¹)		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
1	Ndiafate 1 (14°03 753'N, 16°11 239'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,37	698	++++	3	1	1											1	
2	Ndiafate 2 (14°03 914'N, 16°11 200'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,30	1160	+++	2			1						1	1				
3	Ndiafate 3 (14°03 965'N, 16°11 187'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,72	330	++++	3		1												
4	Vélor 1 (14°03 467'N, 16°11 243'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,14	220	++++	1							3						1	
5	Vélor 2 (14°03 466'N, 16°11 176'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,20	200	++++	3			1			2								
6	Vélor 3 (14°03 466'N, 16°11 195'W)	Sous <i>A. seyal</i>	5,99	13290	----															
7	Koutal (14°05 208'N, 16°07 535'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,17	833	+++									1					5	
8	Nonane 1 (14°18 187'N, 16°21 340'W)	Sol sans végétation	5,83	4580	++++				1		3								1	
9	Nonane 2 (14°18 187'N, 16°21 340'W)	Sous <i>A. seyal</i>	5,74	4330	+++	1				5										
10	Nonane 3 (14°18 144'N, 16°21 163'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,29	951	++++		4								1					
11	Nonane 4 (14°18 173'N, 16°21 130'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,00	380	++++										5					
12	Foudiougne 1 (14°10 007'N, 16°27 880'W)	Sous <i>A. seyal</i>	5,52	235	----															
13	Foudiougne 2 (14°10 578'N, 16°27 498'W)	Sous <i>A. seyal</i>	5,44	218	----															

Tableau 4 (suite)

Référence sol	Caractéristiques des sites d'échantillonnage des sols				Nodulation ^a	Profils IGS-RFLP														
	Origine géographique des sols (Latitude, longitude)	Sites	pH	EC (μS.cm ⁻¹)		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
14	Foudiougne 3 (14°10 591'N, 16°27 528'W)	Sous <i>A. seyal</i>	5,84	830	++++			5											1	
15	Foudiougne 4 (14°11 907'N, 16°26 946'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,87	834	++++	2				2	1									
16	Foudiougne 5 (14°11 935'N, 16°26 836'W)	Sous <i>A. nilotica</i>	6,9	805	++++						4		2							
17	Djilass 1 (14°13 234'N, 16°39 081'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,15	758	++++	4														
18	Djilass 2 (14°13 035'N, 16°39 166'W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,26	706	+++													1		
19	Djilass 3 (14°13 039'N, 16°39 155'W)	Sous <i>A. seyal</i>	7,01	1449	+++				6											
20	Ngallou 1 (14°05 381'N, 16°46 597'W)	Sous <i>A. nilotica</i>	8,16	940	+++													3		
21	Ngallou 2 (14°05 580'N, 16°45 526'W)	Sol sans végétation	8,53	17070	---															
22	Ngallou 3 (14°05 580'N, 16°45 525'W)	Sous <i>A. seyal</i>	8,73	953	++++					1									5	
23	Ngallou 4 (14°06 597'N, 16°45 525'W)	Sous <i>A. seyal</i>	8,46	900	+++						6									
24	Ngallou 5 (14°06 598'N, 16°45 522'W)	Sous <i>A. seyal</i>	8,08	1480	+++						6									
25	Ngallou 6 (14°06 798'N, 16°44 788'W)	Sous <i>A. seyal</i>	8,18	812	++++		1	1												
26	Samba dia (14°08 214'N, 16°46 300'W)	Sous <i>A. seyal</i>	7,95	1234	+++			5												
27	Mbissel 1 (14°09 748'N, 16°45 104'W)	Sous <i>A. seyal</i>	8,48	283	+++						2									
28	Mbissel 2 (14°09 753'N, 16°45 113'W)	Sous <i>A. seyal</i>	8,29	270	---															
29	Ngohakob (14°10 797'N, 16°48 690'W)	Sous <i>A. seyal</i>	8,56	1740	---															

Tableau 4 (suite)

Référence sol	Caractéristiques des sites d'échantillonnage des sols				Nodulat ion ^a	Profils IGS-RFLP														
	Origine géographique des sols (Latitude, longitude)	Sites	pH	EC (μS.cm ⁻¹)		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
30	Joal (14°11'355"N, 16°51'608"W)	Sous <i>A. seyal</i>	nd	1620	+++															4
31	Mbodiène (15 km Sud de Joal) Projet Africare 1	Sous <i>A. seyal</i>	nd	1520	+++					2										1
32	(15 km Sud de Kaolack; 14°15N,16°10W) Projet Africare 2	Sous <i>Tamarix affila</i>	6,93	4040	----															
33	(15 km Sud de Kaolack) Projet Africare 3	Sol sans végétation	4,46	17350	----															
34	(15 km Sud de Kaolack) Projet Africare 4	Sous <i>A. seyal</i>	6,33	575	++++	1														
35	(15 km Sud de Kaolack) Ngane 1	Sol sans végétation	4,47	1172	+++	2														
36	(24 km Est de Fatick 14°35N, 16°42W) Ngane 2	Sol sans végétation	4,30	43900	+++				3											
37	(24 km Est de Fatick) Ngane 3	Sol sans végétation	6,33	8180	----															
38	(24 km Est de Fatick) Ngane 4	Sous <i>A. seyal</i>	6,25	4090	++++															3
39	(24 km Est de Fatick) Gamboul	Sol sans végétation	5,76	36700	+++															
40	(22 km Est de Fatick) Keur Alfa (20 km Est de Fatick)	Sous <i>A. seyal</i>	6,20	208	+++					6										
41	Bambey (14°71N, 16°46W)	Sous <i>A. seyal</i>	6,10	713	+++					3										
42		Sous <i>A. seyal</i>	6,50	148	++++			1	1											

3. Analyse du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP) de l'IGS 16S-23S de l'ADNr

Sur l'ensemble des nodules traités, nous avons obtenu une amplification de l'ADN de 138 broyats. L'analyse électrophorétique des produits PCR non digérés de l'ADNr 16S-23S des 138 extraits d'ADN de nodules a révélé une seule bande de taille comprise entre 890 et 1000 pb. Les produits PCR de chaque extrait de nodule ont été digérés séparément par les enzymes de restriction et soumis à une électrophorèse. Les bandes obtenues ont ensuite été analysées.

Ainsi, quinze unités taxonomiques opérationnelles (ou OTU) correspondant à des profils électrophorétiques IGS-RFLP distincts ont été identifiés par l'analyse PCR-RFLP des extraits d'ADN des nodules (Tableau 5). Les profils IGS-RFLP I et V ont été dominants et représentaient respectivement 16% et 23%, des extraits d'ADN de nodules analysés. Ces données démontrent que les profils IGS-RFLP sont largement répandus dans les différents sites d'échantillonnage.

En revanche, la diversité génétique des rhizobiums n'est pas structurée. Aucune corrélation évidente n'a été notée entre les caractéristiques du sol d'origine qui a servi comme inoculum initial pour les tests de la nodulation et les populations de rhizobium issus de ces nodules. En effet, le regroupement des populations de rhizobium sur la base de l'analyse du polymorphisme des fragments de restriction de l'ADNr 16S-23S ne reflète pas leur origine géographique.

Tableau 5 : Profils IGS-RFLP obtenus par analyse PCR-RFLP de l'IGS 16S-23S de l'ADNr de broyats de nodules. Position taxonomique proposée, test de nodulation, numéros d'accension GenBank des séquences de l'ARNr 16S et la capacité de fixation de l'azote (NFA) des isolats représentatifs sur *A. seyal*.

Profil IGS-RFLP	Isolat représentatif	Origine des sols	Position taxonomique proposée	Numéro d'accension GenBank
I	ORS 3356	Velor 2	<i>Mesorhizobium plurifarium</i>	DQ859036
II	ORS 3359	Nonane 3	<i>Mesorhizobium plurifarium</i>	DQ859038
III	ORS 3324	Bambey	<i>Mesorhizobium plurifarium</i>	DQ859034
IV	ORS 3369	Velor 1	<i>Mesorhizobium plurifarium</i>	DQ859040
V	ORS 3410	Nonane 2	<i>Ensifer sp.</i>	DQ859042
VI	ORS 3357	Nonane 1	<i>Mesorhizobium plurifarium</i>	DQ859037
VII	ORS 3355	Velor 2	<i>Mesorhizobium plurifarium</i>	DQ859035
VIII	ORS 3404	Velor 1	<i>Mesorhizobium plurifarium</i>	DQ859045
IX	ORS 3365	Foundiougne 5	<i>Mesorhizobium plurifarium</i>	DQ859039
X	ORS 3411	Ndiagate 2	<i>Ensifer sp.</i>	DQ859043
XI	ORS 3397	Ndiagate 2	<i>Mesorhizobium plurifarium</i>	DQ859041
XII	ORS 3307	Djilass 2	<i>Burkholderia cepacia</i>	EF054874
XIII	ORS 3412	Ngane 3	<i>Ensifer sp.</i>	DQ859044
XIV	ORS 3405	Koutal	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	EF054875
XV	ORS 3520	Ngallou 3	<i>Ensifer teranga</i>	EF054876

La proposition de position taxonomique est basée sur l'analyse de séquences d'ADNr 16S. ORS ; Culture Collection du Laboratoire de Commun Microbiologie IRD/ISRA/UCAD Dakar, Sénégal. Les détails concernant les caractéristiques des sols d'origine des isolats représentatifs des profils IGS-RFLP figurent sur le tableau 4. Code d'effectivité : 0, pas de nodulation, i, ineffectif ; e, modérément effectif, E, effectif.

L'analyse inter groupes (*Between-Group Analysis*, BGA) a été réalisée pour déterminer les relations entre les profils IGS PCR-RFLP des extraits d'ADN de nodules analysés, le pH et la salinité des échantillons de sols utilisés comme inoculum initial pour les tests de la nodulation (Figure 15). Le premier axe (PC1) pourrait expliquer le gradient de salinité. Le long de cet axe, les sols salins (SA) dans les valeurs négatives sont opposés aux sols non salés (NS) dans les valeurs positives. Le deuxième axe semble caractériser les variations de pH. Le deuxième axe est lié aux sols acides (AC) dans les valeurs positives et aux sols alcalins (AI) dans les valeurs négatives. Les deux axes PC1 et PC2 représentent respectivement 10% et 9% de la variabilité totale des données. Les deux premiers axes (PC1 et PC2) n'expliquent que 19,20% de la variabilité totale des données.

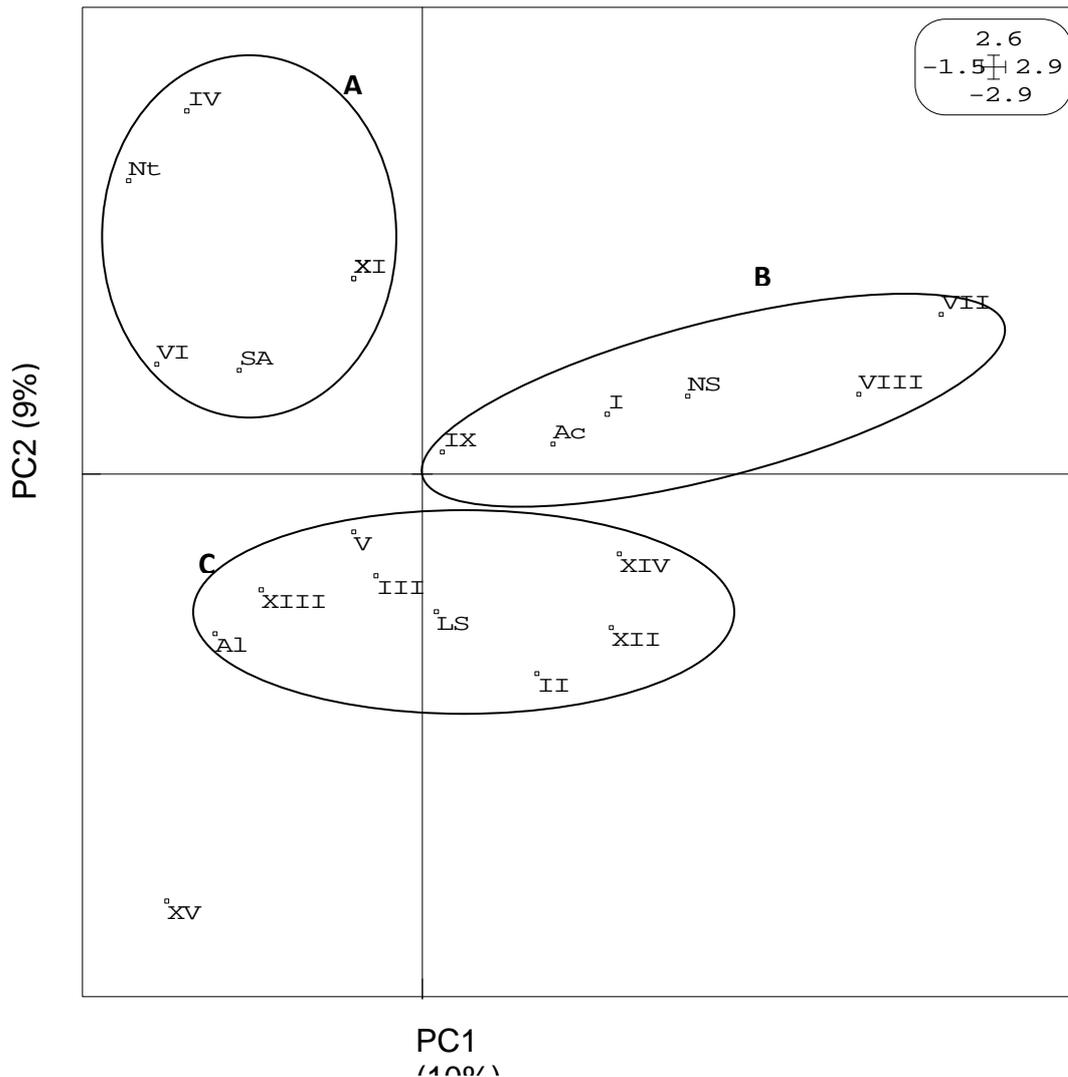


Figure 15 : Projection des profils IGS-RFLP représentant les différents isolats de Rhizobium, la salinité et le pH des échantillons de sol sur les deux premières composantes principales (PC1 X PC2) déterminé par l'analyse de correspondance.

Les pourcentages de la variance totale expliquée par les axes sont donnés entre parenthèses. Les chiffres Romains indiquent les types de profil de restriction indiqués dans le Tableau 4. Pour simplifier la présentation des données, les échantillons de sols ont été regroupés en groupes : sol non salé (NS), $E_c < 500 \mu\text{S}/\text{cm}$; légèrement salée du sol (LS), $500 < E_c < 1000 \mu\text{S}/\text{cm}$; sols salins (SA), $E_c > 1000 \mu\text{S}/\text{cm}$; acidité du sol (Ac), $\text{pH} < 6,75$; sol neutre (Nt), $6,75 < \text{pH} < 7,75$, et alcalin (Al), $\text{pH} > 7,75$.

Ces résultats montrent une faible influence des caractéristiques du sol (pH et salinité des sites d'échantillonnage) sur la répartition des populations de rhizobium. Ainsi, la répartition des populations de rhizobiums d'*A. seyal* n'est pas corrélée au pH et/ou la salinité des échantillons de sol utilisés comme inoculum pour les tests de la nodulation. Trois grands groupes ont été identifiés. Le premier groupe A (profils IGS-RFLP IV, VI, X et XI) est principalement composé par les rhizobiums issus des sols neutres et/ou salins. Le cluster B (profils IGS-RFLP I, VII, VIII et IX) se différencie du groupe A, et est dominé par les rhizobiums

des sols acides et non salins. Le groupe C avec les profils IGS-RFLP II, III, V, XII, XIII et XIV occupe une position intermédiaire.

4. Caractérisation phylogénétique des souches de rhizobium associées à *A. seyal*

4.1. Séquençage de l'ADNr 16S

Le séquençage partiel du gène codant pour l'ARNr 16S (environ 1500 nucléotides) a été réalisé pour 15 souches de rhizobium représentant les différents profils IGS-RFLP. La figure 16 montre l'arbre phylogénétique obtenu avec les séquences alignées de l'ARNr 16S des souches de bactéries, notamment les souches types et les souches de référence.

Quatre genres ont été identifiés par le séquençage de l'ARNr 16S parmi les souches représentatives des groupes IGS-RFLP identifiés. La majorité des souches isolées dans cette étude à partir de nodules d'*A. seyal* ont été classées parmi les genres *Mesorhizobium* et *Ensifer*, et représentent respectivement 64% et 29% des profils IGS-RFLP. Les souches ont été regroupées en six branches phylogénétiques. Neuf souches (ORS 3324, ORS 3355, ORS 3356, ORS 3357, ORS 3359, ORS 3365, ORS 3369, ORS 3397 et ORS 3404) forment un cluster avec la souche type de *Mesorhizobium plurifarum* LMG 11892^T (syn. ORS 1032^T) (Y14158). Les tests de robustesse qui déterminent le niveau de confiance des reconstructions phylogénétiques démontrent que cette branche est soutenue par une valeur de bootstrap de 94%. Les souches diffèrent de la souche type de moins de 0,8% des nucléotides. Cependant, la souche ORS 3324 occupe une position distincte dans ce cluster.

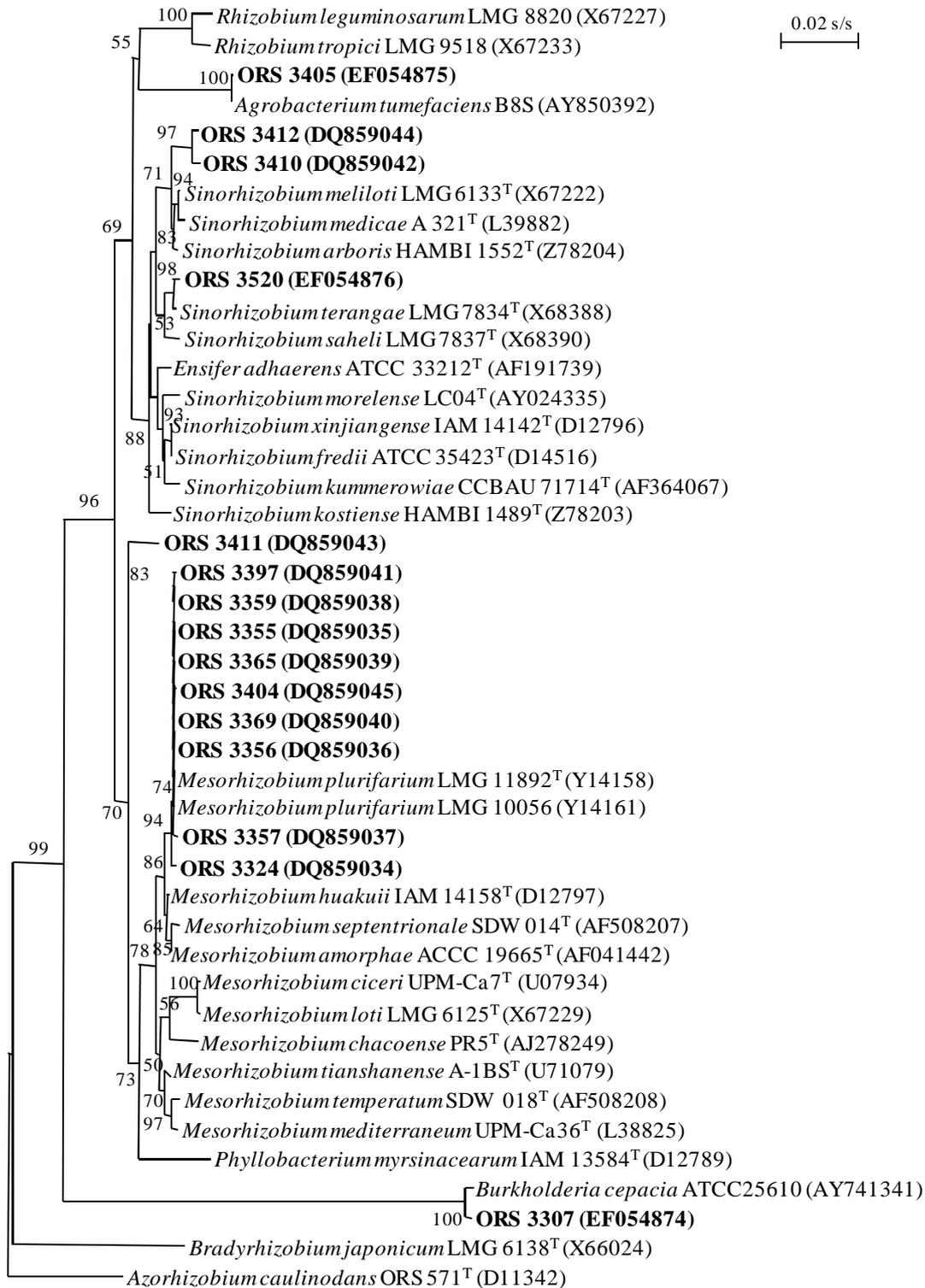


Figure 16 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences des gènes ARNr 16S des bactéries isolées des nodules de plants d'*A. seyal* (en gras) avec les souches de référence de la base de données GenBank.

Les séquences ont été alignées en utilisant le programme CLUSTAL X. Les valeurs de l'analyse bootstrap fondées sur Neighbor-Joining de 1000 répétitions données rééchantillonnées sont indiquées au niveau des nœuds (seules les valeurs supérieures à 50% sont représentées). Les numéros d'accèsion GenBank des souches ORS (voir Tableau 5) et des souches de type (T) sont indiqués entre parenthèses. Barre, 2% de substitution de nucléotides.

Deux souches, ORS 3410 et ORS 3412, et leurs groupes électrophorétiques respectifs ont été identifiées comme proches des espèces *Ensifer meliloti* et *Ensifer Arboris*. Toutefois, leurs séquences d'ADNr 16S présentent un niveau élevé d'homologie avec celle de la souche d'*Ensifer* sp. SEMIA 6161 (AY904763) isolée à partir de nodules de *Prosopis juliflora*. La souche ORS 3520 a montré plus de 99% d'homologie avec la souche type de *Ensifer teranga* LMG 7834^T (X68388), avec un nœud soutenu par une valeur de bootstrap de 98%. La souche ORS 3411 occupe une position périphérique dans une branche distincte entre les genres *Mesorhizobium* et *Ensifer*.

La souche ORS 3405 se retrouve dans le genre *Agrobacterium* et est fortement liée (100% de similitude) à l'isolat B8S d'*A. tumefaciens* (AY850392). Phylogénétiquement, la souche ORS 3307 est très proche de la souche de *Burkholderia cepacia* ATCC 25610 (AY741341).

4.2. Séquençage de l'ADNr 16S-23S

Le dendrogramme généré à partir des séquences de l'IGS 16S-23S des souches de référence de *Mesorhizobium* sp. et des neuf souches de rhizobiums isolées de nodules d'*A. seyal* proches du genre *Mesorhizobium* a révélé des topologies comparables à celles du dendrogramme généré avec les séquences du gène ARNr 16S. Les souches sont réunies en trois sous-groupes (Figure 17).

La séquence de l'ADNr 16S-23S de la souche ORS 3324, est très proche de celle de la souche *Mesorhizobium* sp. CIRADF 269 (AY458138) isolée des nodules d'*A. senegal*. Le nœud de la branche du sous-groupe C-1 est soutenu par une valeur de bootstrap de 100%.

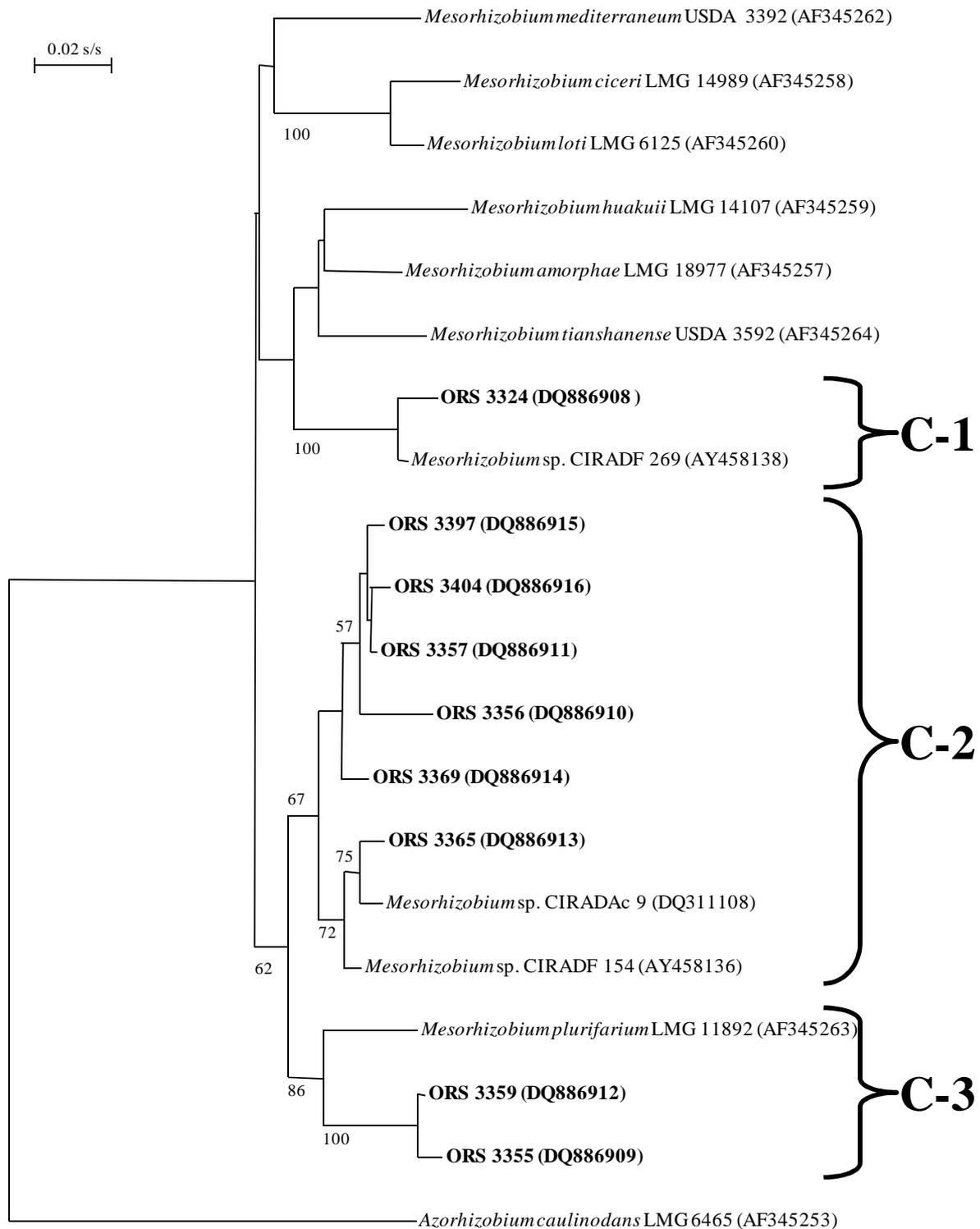


Figure 17 : Relation phylogénétique entre les séquences des régions IGS des souches ORS (en gras) et les souches de *Mesorhizobium* spp. basée sur des séquences alignées de gènes 16S-23S ADN_r, construite comme un arbre enraciné en utilisant l'algorithme Neighbor-Joining. Pour plus de détails voir la légende de la Figure 16.

Le sous-groupe C-2 comprend les souches ORS 3356, ORS 3357, ORS 3365, ORS 3369, ORS 3397 et ORS 3404. Elles montrent une grande similarité des nucléotides avec les souches de *Mesorhizobium* spp. CIRADc 9 (DQ311108) et CIRAD 154 (AY458136) isolées des nodules d'*A. senegal*. Les souches ORS 3355 et ORS 3359 forment avec la souche type de *M. plurifarum* LMG 11892^T (AF345263) le sous-groupe C-3, avec une valeur de bootstrap de 86% au nœud de la branche. L'analyse des séquences de l'IGS 16S-23S montre que les souches de sous-groupes C-2 et C-3 présentent une forte similitude avec celle de la souche type de *M. plurifarum*.

5. Infectivité et effectivité des souches de rhizobium sur *A. seyal*

Quinze souches de rhizobiums isolées de nodules d'*A. seyal* représentatifs des différents groupes IGS-RFLP identifiés par PCR-RFLP ont été testées pour leur infectivité et leur effectivité sur leur plante hôte d'origine. De plus, la spécificité de nodulation et de fixation d'azote sur *A. seyal* des représentants des genres *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* et *Rhizobium* a également été testée (Tableau 6). Parmi les souches testées, seules celles qui appartiennent aux genres *Ensifer* et *Mesorhizobium* ont effectivement nodulé *A. seyal*. En revanche, les autres espèces de rhizobium ne nodulent pas *A. seyal* ou forment des nodules inefficients. C'est le cas des souches ORS 3405 et ORS 3307 isolées de nodules d'*A. seyal* et apparentées, par leur séquence ARNr 16S, respectivement aux genres *Agrobacterium* et *Burkholderia*. Elles induisent des nodules blancs et inefficaces sur les racines des jeunes plants d'*A. seyal*.

Tableau 6 : Tests de nodulation et capacité de fixation d'azote sur *A. seyal* des souches types et des souches représentatives des genres *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* et *Rhizobium*

Souche ORS	Autre désignation	Plante hôte	Espèces d'affiliation	Nodulation et effectivité
ORS 571 ^T	LMG 6465 ^T	<i>Sesbania rostrata</i>	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	i
ORS 991	LMG 11874	<i>Neptunia natans</i>	<i>Allorhizobium undicola</i>	i
ORS 992 ^T	LMG 11875 ^T	<i>N. natans</i>	<i>A. undicola</i>	i
ORS 995	LMG 11876	<i>N. natans</i>	<i>A.undicola</i>	i
ORS 996	LMG 11877	<i>N. natans</i>	<i>A.undicola</i>	i
ORS 997	LMG 11878	<i>N. natans</i>	<i>A.undicola</i>	i
ORS 998	LMG 11879	<i>N. natans</i>	<i>A.undicola</i>	i
ORS 2800		<i>Glycine max</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	i
ORS 1357		<i>G. hispida</i>	<i>B. japonicum</i>	0
ORS 101		<i>Faidherbia albida</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	0
ORS 2738 ^T	LMG 17150 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	<i>M. ciceri</i>	e
ORS 1752 ^T	LMG 14107 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	<i>M. huakii</i>	0
ORS 664 ^T	LMG 6125 ^T	<i>Lotus tenuis</i>	<i>M. loti</i>	0
ORS 2739 ^T	LMG 17148 ^T Ca-36 ^T	<i>C. arietinum</i>	<i>M. mediterraneum</i>	E
ORS 654	LMG 10056	<i>Leucaena diversifolia</i>	<i>M. plurifarum</i>	i
ORS 1001	LMG 7836	<i>Acacia senegal</i>	<i>M. plurifarum</i>	e
ORS 1002	LMG 7854	<i>A. senegal</i>	<i>M. plurifarum</i>	e
ORS 1004	LMG 7848	<i>A. senegal</i>	<i>M. plurifarum</i>	i
ORS 1010	LMG 7853	<i>A. senegal</i>	<i>M. plurifarum</i>	E
ORS 1014t1	LMG 7849t1	<i>A. senegal</i>	<i>M. plurifarum</i>	e
ORS 1015	LMG 7839	<i>A. senegal</i>	<i>M. plurifarum</i>	i
ORS 1018	LMG 11881	<i>A. senegal</i>	<i>M. plurifarum</i>	i
ORS 1020	LMG 11883	<i>A. senegal</i>	<i>M. plurifarum</i>	E
ORS 1024	LMG 11884	<i>A. senegal</i>	<i>M. plurifarum</i>	e
ORS 1029	LMG 11889	<i>A. senegal</i>	<i>M. plurifarum</i>	i
ORS 1030	LMG 11890	<i>A. senegal</i>	<i>M. plurifarum</i>	i
ORS 1031	LMG 11891	<i>A. senegal</i>	<i>M. plurifarum</i>	i
ORS 1032 ^T	LMG 11892 ^T	<i>A. senegal</i>	<i>M. plurifarum</i>	i
ORS 1035	LMG 11893	<i>A. senegal</i>	<i>M. plurifarum</i>	e
ORS 1036	LMG 11894	<i>A. senegal</i>	<i>M. plurifarum</i>	E
ORS 1037	LMG 11895	<i>A. senegal</i>	<i>M. plurifarum</i>	E
ORS 1038	LMG 11896	<i>A. senegal</i>	<i>M. plurifarum</i>	e
ORS 1040	LMG 11898	<i>A. senegal</i>	<i>M. plurifarum</i>	e
ORS 1088	LMG 11880	<i>A. seyal</i>	<i>M. plurifarum</i>	E
ORS 2640T	LMG 15767 ^T	<i>Glycine pallidiflora</i>	<i>M. tianshanense</i>	e
ORS 668T	LMG 6214 ^T	<i>Galega orientalis</i>	<i>Rhizobium galegae</i>	e
ORS 662	LMG 8819T2	-	<i>R. leguminosarum</i> bv <i>phaseolii</i>	0
ORS 639	VF39SM	<i>Pisum sativum</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv <i>viciae</i>	i
ORS 651	LMG 9517, CFN 299	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>R. tropici</i> type <i>IIa</i>	i
ORS 625 ^T	LMG 9503 ^T , CIAT 899 ^T	<i>P. vulgaris</i>	<i>R. tropici</i> type <i>IIb</i>	e
ORS 645 ^T	LMG 11937 ^T , CFN 42 ^T	<i>P. vulgaris</i>	<i>R. etli</i>	E
ORS 17		<i>Alysicarpus ovalifolius</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	i
ORS 507		<i>Sesbania pachycarpa</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	i
ORS 606		<i>Sesbania cannabina</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	e
ORS 615		<i>S. rostrata</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	i
ORS 919		<i>A. senegal</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	e
ORS 921		<i>A. senegal</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	e
ORS 927		<i>A. senegal</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	e
ORS 930		<i>Acacia seyal</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	e
ORS 932		<i>A. seyal</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	e
ORS 944		<i>A. seyal</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	0

ORS 946		<i>A. seyal</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	0
ORS 953		<i>A. seyal</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	i
ORS 1019		<i>A. senegal</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	e
ORS 665 ^T	LMG 6133 ^T , NZP4027 ^T	<i>Medicago sativa</i>	<i>Ensifer melliloti</i>	E
ORS 1755 ^T	LMG 14919 ^T	<i>Prosopis chilensis</i>	<i>Ensifer arboris</i>	e
ORS 669 ^T	LMG 6217 ^T	<i>Glycine max</i>	<i>Ensifer fredii</i>	i
ORS 1763		<i>P. chilensis</i>	<i>Ensifer kostiense</i>	e
ORS12		<i>Proposis juliflora</i>	<i>Ensifer sahelii</i>	i
ORS 600		<i>Sesbania pachycarpa</i>	<i>E. sahelii</i>	i
ORS 609 ^T	LMG 7837 ^T	<i>Sesbania cannabina</i>	<i>E. sahelii</i>	e
ORS 611	LMG 8310	<i>Sesbania grandiflora</i>	<i>E. sahelii</i>	e
ORS 929		<i>A. sp.</i>	<i>Ensifer terangae</i>	e
ORS 1007	LMG 7847	<i>A. laeta</i>	<i>E. terangae</i>	i
ORS 1009 ^T	LMG 7834 ^T	<i>A. laeta</i>	<i>E. terangae</i>	e
ORS 1016		<i>A. laeta</i>	<i>E. terangae</i>	E
ORS 1045	LMG 11901	<i>A. raddiana</i>	<i>E. terangae</i>	i
ORS 1047		<i>A. horrida</i>	<i>E. terangae</i>	i
ORS 1057		<i>A. mollissima</i>	<i>E. terangae</i>	e
ORS 1058		<i>A. mollissima</i>	<i>E. terangae</i>	i
ORS 1071		<i>A. senegal</i>	<i>E. terangae</i>	E
ORS 1072		<i>A. senegal</i>	<i>E. terangae</i>	e
ORS 1073	LMG 11926	<i>A. senegal</i>	<i>E. terangae</i>	E
ORS 8		<i>S. rostrata</i>	<i>E. terangae</i> bv <i>sesbaniae</i>	e
ORS 15	LMG 7833	<i>Sesbania sp.</i>	<i>E. terangae</i> bv <i>sesbaniae</i>	e
ORS 19		<i>Sesbania cannabina</i>	<i>E. terangae</i> bv <i>sesbaniae</i>	e
ORS 22		<i>S. rostrata</i>	<i>E. terangae</i> bv <i>sesbaniae</i>	e
ORS 51	LMG 6464	<i>S. rostrata</i>	<i>E. terangae</i> bv <i>sesbaniae</i>	e
ORS 52		<i>S. rostrata</i>	<i>E. terangae</i> bv <i>sesbaniae</i>	i
ORS 53		<i>S. rostrata</i>	<i>E. terangae</i> bv <i>sesbaniae</i>	i
ORS 604	LMG 11865	<i>Sesbania aculeata</i>	<i>E. terangae</i> bv <i>sesbaniae</i>	i
ORS 613		<i>Sesbania sesban</i>	<i>E. terangae</i> bv <i>sesbaniae</i>	i
ORS 1013		<i>A. senegal</i>	<i>E. terangae</i> bv <i>sesbaniae</i>	i
ORS 644 ^T	NGR 234,	<i>Lablab purpureus</i>	<i>Ensifer sp.</i> NGR 234	E
Nouveaux isolats				
ORS 3307		<i>A. seyal</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	i
ORS 3324		<i>A. seyal</i>	<i>M. plurifarum</i>	E
ORS 3355		<i>A. seyal</i>	<i>M. plurifarum</i>	e
ORS 3356		<i>A. seyal</i>	<i>M. plurifarum</i>	E
ORS 3357		<i>A. seyal</i>	<i>M. plurifarum</i>	E
ORS 3359		<i>A. seyal</i>	<i>M. plurifarum</i>	E
ORS 3365		<i>A. seyal</i>	<i>M. plurifarum</i>	e
ORS 3369		<i>A. seyal</i>	<i>M. plurifarum</i>	e
ORS 3397		<i>A. seyal</i>	<i>M. plurifarum</i>	e
ORS 3404		<i>A. seyal</i>	<i>M. plurifarum</i>	e
ORS 3405		<i>A. seyal</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	i
ORS 3410		<i>A. seyal</i>	<i>Ensifer sp.</i>	e
ORS 3411		<i>A. seyal</i>	<i>Ensifer sp.</i>	e
ORS 3412		<i>A. seyal</i>	<i>Ensifer sp.</i>	e
ORS 3520		<i>A. seyal</i>	<i>E. terangae</i>	e

L'affiliation des espèces est basée sur la comparaison de l'homologie des séquences partielles du gène 16S rRNA. Codes d'effectivité : 0, pas de nodules formés ; i, ineffective ; e, modérément effective ; E, effective.

Abréviation : CIAT, Collection de rhizobium du Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Columbia; LMG, Collection de bactéries du Laboratorium voor Microbiologie, B-900 Ghent, Belgium; CFN, Centro de Investigacion Sobre Fijacion de Nitrogeno, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Cuernavaca, Mexico; ORS, Collection du Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/ISRA/UCAD Dakar, Sénégal.

DISCUSSION

L'évaluation du potentiel infectieux des sols échantillonnés met évidence une large distribution des populations de rhizobiums associées à *A. seyal*. Il est intéressant de noter que la nodulation a été notée à la fois sur les plants inoculés avec des suspension de sols très salés (sols n° 8, 9 et 38) ou des sols au pH inférieur à 5 (sols n° 35 et 36). En outre, nous avons enregistré une nodulation sur des sols alcalins. Le nombre des souches de rhizobium autochtones n'a pas été évalué dans les différents sites. Cependant, nos résultats suggèrent une importante adaptation des populations naturelles de rhizobiums à des stress environnementaux majeurs et leur capacité à établir des associations symbiotiques dans les sols de ces environnements. L'absence de nodulation pour sept échantillons de sol (sols n° 6, 12, 13, 21, 32, 33 et 37) pourrait être attribuée à l'absence de rhizobiums compatibles dans ces sols plutôt qu'à la taille des populations de rhizobium. L'échec de la symbiose en conditions de stress environnementaux pourrait être lié à une absence de rhizobiums dans la rhizosphère (Singleton et al. 1982). En effet, Diouf et al. (2003) ont montré, pour trois espèces de légumineuses ligneuses cultivées en pépinière, que la taille de l'inoculum utilisé n'est pas corrélée avec l'infectivité de la souche utilisée.

L'inoculation des légumineuses avec des rhizobiums, lorsqu'elle est utilisée judicieusement en fonction des besoins et réalisée correctement, est importante pour améliorer la fertilité des sols et la productivité des plantes dans les tropiques (Dommergues 1995). Cependant, Zakhia (2006) rapporte que l'étendue de la diversité des rhizobiums tropicale est mal documentée. Ainsi, les études de diversité génétique des diazotrophes est nécessaire pour la caractérisation et la sélection de souches adaptées à des contraintes environnementales extrêmes ; telles que la sécheresse, la température élevée du sol, la salinité et les valeurs élevées ou faibles de pH pour améliorer la performance de la plante hôte en conditions de stress environnementaux. Cette recherche est à notre connaissance la première étude réalisée sur la diversité des rhizobiums autochtones associés à *A. seyal* dans le bassin arachidier, une importante région agricole au Sénégal. Du fait qu'il n'ya pas d'antécédents connus de l'inoculation de rhizobiums dans les sites échantillonnés, les rhizobiums piégés sur

les racines des plants d'*A. seyal* peuvent être considérés comme des populations autochtones.

Pour déterminer la diversité des bactéries diazotrophiques nodulant *A. seyal* ; l'analyse PCR-RFLP de l'ADNr 16S-23S a été réalisée sur de l'ADN de rhizobium extrait de nodules obtenus par piégeage sur des racines de plants d'*A. seyal*, inoculés avec du sol provenant des sites d'échantillonnage du Bassin arachidier. L'analyse des polymorphismes des fragments de restriction de l'ADNr 16S-23S a révélé une grande diversité dans les profils de restriction des souches de rhizobium. Ainsi, quinze profils RFLP de l'IGS ont été obtenus parmi les populations de rhizobium nodulant *A. seyal* (Tableau 4).

Nos résultats ont montré une importante hétérogénéité et une très large distribution des souches de *Mesorhizobium* associés à *A. seyal* dans les sites d'échantillonnage (Figure 15). La plupart de ces souches sont assez proches de la souche type de *Mesorhizobium plurifarum* LMG 11892^T (Y14158). L'analyse *Blast* a également montré qu'elles sont étroitement liées à la souche de *M. plurifarum* LMG 10056 (Y14161), isolée au Brésil à partir de nodules de *Leucaena diversifolia* (Moreira et al. 1993). D'autre part, la souche ORS 3324 a montré de fortes similitudes avec la souche CIRADF 269 isolée en Mauritanie à partir de nodules racinaires d'*Acacia nilotica* var. *adansonii* (Sarr et al. 2005). Ces résultats confirment une large diffusion de l'espèce *Mesorhizobium plurifarum* à travers les tropiques (de Lajudie et al. 1998b).

Il est intéressant de noter que les souches ORS 3410 et ORS 3412 diffèrent des deux espèces *Ensifer meliloti* et *E. Arboris* mais ont une forte affinité avec la souche SEMIA 6161, isolée du Brésil à partir de nodules de *Prosopis juliflora* (Menna et al. 2006). De nombreuses études rapportent qu'une forte proportion de rhizobiums nodulant des arbres en Afrique, en particulier des *Acacia* spp., sont plus étroitement liés aux espèces du genre *Ensifer* (Ba et al. 2002; Khbaya et al. 1998; Romdhane et al. 2006).

Les premières études sur la nodulation des acacias indiquent qu'*A. seyal* est nodulée par divers rhizobiums, incluant à la fois des souches à croissance rapide et des souches à croissance lente (Dreyfus and Dommergues 1981b). Par contre, nos résultats sur l'étude des bactéries issus des sites d'échantillonnage de la partie centrale du Sénégal ont montré que

dans ces sols, *A. seyal* est nodulée par des rhizobiums à croissance rapide et moyenne. Nos résultats corroborent les données obtenues au Kenya par Odee et al. (1997).

En outre, l'authentification des bactéries isolées a montré que 7% des souches qui occupent les nodules d'*A. seyal* s'identifient au genre *Agrobacterium* et *Burkholderia*, et induisent la formation de nodules blancs et inefficients. Le fait que ces bactéries aient survécu à la désinfection superficielle des nodules, préalablement à l'extraction de l'ADN, indique que ces bactéries sont protégées contre les produits chimiques, et suggère que ces souches d'*A. tumefaciens* et de *Burkholderia* sp. coexistent avec les rhizobiums symbiotiques à l'intérieur des nodules. Des bactéries pathogènes de plantes non fixatrices d'azote ont été isolées à partir de nodules racinaires de nombreuses légumineuses en Afrique (Khbaya et al. 1998; Mhamdi et al. 2002; Mohamed et al. 2000; Zakhia et al. 2006). Cette coexistence dans le nodule a probablement augmenté les possibilités d'échange d'informations génomiques comme le montre un autre rapport (Bala and Giller 2001). La formation de nodules inefficients pourrait s'expliquer par plusieurs hypothèses: (i) les conditions de laboratoire pourraient ne pas être favorables à la symbiose (Mohamed et al. 2000; Sutherland et al. 2000); (ii) ces bactéries pourraient avoir acquis des gènes symbiotiques par transfert latéral de gènes, au cours de l'évolution; et qui auraient été perdus durant les expériences de laboratoire (Segovia et al. 1991; Sullivan et al. 1996); et (iii) elles pourraient infecter et coloniser les nodules après leur formation par d'autres rhizobiums (Mhamdi et al. 2005).

Nous avons utilisé une analyse statistique multi variée qui nous a permis d'évaluer simultanément tous les paramètres considérés (profils IGS PCR-RFLP, pH et salinité des échantillons de sols utilisés comme inoculum initial pour les tests de la nodulation) en les condensant sur deux composantes principales avec une perte mathématique minimale d'information. Ces composantes principales peuvent servir d'axes sur lesquels les données peuvent être projetées et visualisées (Oda and Ouchi 1989). La présente étude a montré que le regroupement des isolats de rhizobiums associés à *A. seyal*, basé sur l'analyse du polymorphisme des fragments de restriction de l'IGS 16S-23S et des séquences du gène 16S codant pour l'ARNr ne reflètent pas leur origine géographique. En effet, les résultats de l'analyse intergroupe a montré que les axes 1 et 2 n'expliquaient que 19% de la variance totale des données analysées. Les populations de rhizobiums sont réparties en trois groupes.

Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une faible influence des caractéristiques des sols des sites d'échantillonnage sur la répartition des populations de rhizobium. DES Conclusions similaires ont été tirées pour des rhizobiums nodulant des espèces d'*Acacia* sp. au Maroc (Khbaya et al. 1998) et en Tunisie (Romdhane et al. 2005). Mahler et Bezdicek (1978) ont montré que le microclimat du site d'échantillonnage, comme l'aération, l'humidité, la disponibilité des nutriments et la température favorisent une différenciation des sérotypes bactériens (Mahler and Bezdicek 1978). Cependant, les sols utilisés dans notre étude comme inoculum initial pour les piégeages sont des aliquotes d'échantillons composites de sols prélevés autour du tronc de chaque arbre. Les caractéristiques des microsites seraient ainsi homogénéisées par ce processus, réduisant du coup la variabilité du microclimat. Une prospection sur une aire plus étendue pourrait également favoriser la discrimination entre sites.

CHAPITRE II : ANALYSE PHYLOGENETIQUE DES GENES SYMBIOTIQUES ET CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES SOUCHES DE MESORHIZOBIUM SP. ASSOCIEES A A. SEYAL DEL.

INTRODUCTION

Compte tenu de la spécificité de la symbiose entre les rhizobiums et leurs plantes hôtes et l'adaptation de ces bactéries à leur environnement, la caractérisation des isolats autochtones est important pour optimiser l'exploitation de ces ressources microbiennes. Par conséquent, il est essentiel d'isoler les rhizobiums à partir des nodules qui les hébergent sur les plantes hôtes et de caractériser leur diversité phénotypique et génétique et leur spectre d'hôtes. Les rhizobiums nodulant des espèces d'arbres tropicaux présentent une grande diversité (Bala and Giller 2001; Zakhia et al. 2006). Ainsi, les tropiques, considérés comme centre de diversité florale et faunique, pourraient également être un important centre de diversité des rhizobiums (Odee et al. 2002).

Une approche polyphasique a été proposée afin de définir avec précision les groupes taxonomiques entre les rhizobiums (de Lajudie et al. 1998b; Vandamme et al. 1996). Parmi les méthodes actuellement disponibles, le séquençage du gène de l'ARNr 16S est la plus fiable pour l'identification du genre. Toutefois, l'identification des espèces devraient normalement se fonder sur les comparaisons à la fois génétique ou génomique et la caractérisation phénotypique. Des études physiologiques et biochimiques sont nécessaires pour la caractérisation et la sélection des isolats de rhizobiums adaptés à des conditions édapho-climatiques marginales, telles que le stress salin ; et qui pourraient servir comme inoculum. Le spectre d'hôtes des rhizobiums est déterminé par plusieurs gènes qui leur confèrent leur spécificité pour la nodulation et la fixation d'azote avec certaines plantes hôtes. Il s'agit notamment des gènes de la nodulation (*nod*) qui codent pour la production de facteurs de nodulation (facteur Nod) et des gènes de la fixation d'azote (*nif*), qui codent pour des enzymes impliquées dans la fixation de l'azote (Perret et al. 2000). La première étape dans l'assemblage des facteurs Nod est effectuée par un N-acétylglucosaminyltransférase codé par le gène *nodC* (Geremia et al. 1994). La protéine NodA, déterminant pour la

spécificité d'hôte, est impliquée dans le transfert d'acides gras lors de la biosynthèse des facteurs Nod (Debelle et al. 2001).

Le gène *nifH* code pour la dinitrogénase réductase du complexe nitrogénase, et comme les gènes *nodA* et *nodC*, ce gène existe généralement en une seule copie chez les espèces de *Mesorhizobium* (Haukka et al. 1998). Les séquences des gènes *nodC* et *nifH* sont étroitement liées pour les symbiotes d'une même espèce de légumineuse (Laguerre et al. 2001; Rivas et al. 2007). Ainsi, ces auteurs ont rapporté la preuve de la corrélation entre la phylogénie du gène de l'ARNr 16S des rhizobiums et les gènes symbiotiques. Toutefois, d'autres études ont signalé des cas de discordances phylogénétiques entre les gènes symbiotiques et chromosomiques, ce qui suggère que des réarrangements génétiques seraient survenues au cours de l'évolution (Haukka et al. 1998; Moulin et al. 2004; Stepkowski et al. 2003). Par conséquent, les gènes *nifH* ou *nodC* peuvent être utilisés pour une caractérisation rapide des rhizobiums et une étude de la promiscuité des légumineuses qui ne serait pas fondée sur le statut taxonomique de leurs endosymbiotes (Laranjo et al. 2008).

Les tests de nodulation des plants d'*A. seyal* avec 42 échantillons de sol prélevés dans diverses zones agro-écologiques du Sénégal ont montré une importante capacité de nodulation à travers les différents sites indiquant la large répartition des rhizobiums compatibles avec à *A. seyal* dans ces sols. En outre, les séquençages du gène ARNr 16S et l'IGS 16S-23S de l'ADNr des rhizobiums ont montré la prédominance dans les nodules d'*A. seyal* des groupes génomiques étroitement liés à *Mesorhizobium plurifarium* (Diouf et al. 2007). La littérature traite pour l'essentiel des propriétés des bactéries des genres *Rhizobium* et *Ensifer* et, dans une moindre mesure celles des genres *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Mesorhizobium*. Ainsi, nous allons focaliser notre étude sur les souches de *Mesorhizobium* sp., qui sont prédominantes dans notre collection de rhizobiums associés à *A. seyal*.

L'objectif de cette étude est d'abord d'évaluer la diversité des gènes symbiotiques de neuf souches de rhizobiums, identifiées comme représentant des groupes génomiques de *Mesorhizobium* sp., isolées à partir de nodules d'*A. seyal*. Pour ce faire, nous avons exploré la diversité des gènes *nodA*, *nodC* et *nifH* comme des indicateurs de la nodulation et de la fixation de l'azote. Les souches de rhizobium diffèrent dans leur effectivité. Nous avons également comparé les souches par des tests de nodulation et des analyses phénotypiques.

En outre, une expérience en serre a été réalisée sur des sols non désinfectés, afin de déterminer l'efficacité de l'inoculation avec des souches de *Mesorhizobium* spp. isolées à partir des nodules d'*A. seyal* sur le développement précoce de leur hôte.

MATERIEL ET METHODES

1. Souches bactériennes et leurs conditions de culture

Dans les expériences suivantes, 21 souches ont été testées : 9 souches de *Mesorhizobium* sp. isolées de nodules d'*A. seyal* et 12 souches de type de *Mesorhizobium ciceri*, *M. huakuii*, *M. loti*, *M. mediterraneum*, *M. plurifarum*, *M. thianshanense*, *Ensifer (Sinorhizobium)* sp. NGR 234, *E. arboris*, *E. fredii*, *E. kostiense*, *E. meliloti* et *E. saheli*. Tous les tests ont été effectués en double sur boîtes de Pétri ou en culture liquide. L'incubation des souches a été effectuée dans une étuve à 37 °C et la croissance a été estimée par l'apparition de colonies sur milieu solide en boîte de Pétri ou la turbidité du milieu liquide en tube.

2. Propriétés phénotypiques des souches de *Mesorhizobium* sp.

La tolérance des souches à la salinité a été testée sur un milieu M9 solide (20 ml de mannitol 20% ; 1 ml $MgSO_4$ 1 M ; 1 ml $CaCl_2$ 0,25 M ; 1 ml biotine à 1 g/l) contenant diverses concentrations de chlorure de sodium (NaCl) : 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 5 % (p/v). La tolérance des souches aux différentes valeurs de pH a été étudiée sur milieu YMA [10 g de mannitol; 0,5 g de glutamate de sodium; 0,5 g/l de K_2HPO_4 ; 0,2 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,05 g/l de NaCl; 0,04 g/l de $CaCl_2$; 0,004 g/l de $FeCl_3$; 1 g/l d'extrait de levure (Difco, Detroit, Michigan, USA); 20 g/l d'agar (Difco, Detroit, Michigan, USA)]. Le pH a été ajusté aux valeurs suivantes : 4, 5, 7, 8, 9 et 10.

La résistance des souches à différents antibiotiques a été testée sur le milieu YMA, auquel des antibiotiques ont été ajoutés à des doses variables (10, 20, 50, 100 µg/ml). Les antibiotiques ont été stérilisés par filtration. Les antibiotiques utilisés sont : ampicilline ; chloramphénicol ; rifampicine ; streptomycine ; kanamycine et tétracycline.

L'utilisation des hydrates de carbone à 1% (p/v) comme la seule source de carbone a été étudiée sur un milieu YMA modifié où l'extrait de levure a été remplacé par NH_4Cl (0,1%, p/v) et du mannitol par l'un des sucres suivants : amidon, arabinose, galactose, glucose, glycérol, fructose, maltose, mannose, mannitol, raffinose, lactose, ribose, rhamnose, saccharose, salicine, sorbitol et xylose (Mohamed et al. 2000). Tous les glucides ont été stérilisés par filtration (0,22 µm) avant de les ajouter dans le milieu à 50 °C.

La résistance des souches aux métaux a été testée selon le protocole de Zhang *et al.* (1991) sur milieu *tryptone-yeast extract* (TY) (5 g/l de tryptone ; 0,91 g/l de CaCl₂, 2H₂O, 3 g/l d'extrait de levure ; 14 g/l d'agar) contenant les métaux lourds suivants (µg/ml) : CuSO₄, 5H₂O (500); HgCl₂ (5) ; CdSO₄ (50); ZnSO₄ (250); Pb-(CH₃COO)₂ (1000); FeCl₃, 6H₂O (750); MnCl₂, 4H₂O (1000); MnSO₄ (1000); MgSO₄ (1000); BaCl₂, 2H₂O (1000) et CoSO₄ (150). Le milieu TY normal a été utilisé comme témoin. Pour éviter la complexation des ions métalliques à l'agar et les composants des médias lors de la stérilisation, les solutions de métaux lourds ont été stérilisées séparément et ajoutées au milieu TY gélosé stérile à 50 °C (Lindström and Lehtomäki 1988). Pour chaque substrat évalué, un inoculateur multipoint pour boîtes de Pétri a été inoculé avec des cellules d'une suspension bactérienne physiologiquement fraîche contenant environ 10⁹ cellules/ml. Ces cellules ont ensuite été transférées sur le milieu de culture contenant le substrat à tester. Tous les milieux de culture ont été incubés pendant 7 jours à 28 °C. La détermination de la tolérance des souches a été basée sur la formation de colonies.

L'analyse de tests phénotypiques et physiologiques des différentes souches a été réalisée en utilisant l'algorithme *Unweighted Pair Group Method Average* (UPGMA) (Sneath and Sokal 1973). Les résultats ont été présentés sous forme de dendrogramme.

3. Recherche de gènes codant pour le système un transport de type BCCT parmi des souches de *Mesorhizobium* sp.

3.1. Définition des amorces

L'alignement des séquences polypeptidiques de symports appartenant à la famille des transporteurs de type BCCT (EctP de *Corynebacterium glutamicum*, CudT de *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus*, OpuD d'*Halobacterium salinarum*, CaiT d'*Escherichia coli*, COG1292: *Choline-glycine betaine transporter* de *Mesorhizobium* sp., BetP *Haemophilus influenzae*, BetP de *Ensifer meliloti*, BetT d'*Escherichia coli*, ButA de *Tetragenococcus halophilus*, BetL de *Listeria monocytogenes*, BetH d'*Halobacillus trueperi* et OpuD de *Bacillus licheniformis* disponibles, a permis de déterminer des régions conservées entre les différents polypeptides. Quatre zones consensus ont ainsi été retenues pour définir les séquences de quatre amorces oligonucléotidiques dégénérées BT1, BCCT-F, BT3R et BCCT-R (Tableau 7).

3.2. Amplification par PCR

L'ADN qui a servi de matrice a été obtenu par éclatement de cellules de 10 souches représentatives des 9 groupes électrophorétiques identifiés à *Mesorhizobium* sp. à partir de 30 µl d'une culture de 3 jours sur milieu YEM. Les souches suivantes ont été testées : ORS 3356 (IGS I), ORS 3359 (IGS II), ORS 3328 et ORS 3358 (IGS III), ORS 3369 (IV), ORS 3357 (VI), ORS 3355 (VII), ORS 3404 (VIII), ORS 3365 (IX) et ORS 3397 (XI). L'amplification a été réalisée avec les amorces oligonucléotidiques sens (BT1 et BCCT-F) et antisens (BT3R et BCCT-R) dans un volume réactionnel de 25 µl contenant: 1µl d'ADN (ajusté à 10 - 50 ng/µl), 5 µl de tampon 5X (Eurogentec), 100 pM de chaque dNTPs (dATP, dTTP, dGTP et dCTP), 50 pmol de chacune des amorces oligonucléotidiques, 0,2 U/µl de Taq polymérase (Gibco-BRL) et la quantité d'eau ultra pure stérile nécessaire pour compléter le volume à 25 µl par tube de PCR.

Le programme d'amplification " *Touchdown* " (Don et al. 1991) a été utilisé. Dans un premier temps, le mélange a été incubé à 95 °C pendant 5 min, suivi par 20 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 1 min, d'hybridation entre 60 °C et 50 °C pendant 1 min et de polymérisation à 72 °C pendant 1 min. La seconde série comprend 25 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 1 min, d'hybridation à 50 °C pendant 1 min et de polymérisation à 72 °C pendant 1 min. Enfin, la PCR est terminée par 10 min d'élongation à 72 °C.

Tableau 7 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR et le séquençage de gène codant pour le système de transport de type BCCT

Amorces	Séquences	Références
BT1	5'-TTY GCN GGN ATN GG- 3'	(Boscari et al. 2002)
BT3R	5'-CCA CCA NGC CCA RWA NA- 3'	(Boscari et al. 2002)
BCCT-F	5'-CAT GGG CAT YGG CCT CAT-3'	Cette étude
BCCT-R	5'-ARA TCC ACC AYG CCC AGT A-3'	Cette étude

3.3. Séquençage de gènes codant pour le système de transport de type BCCT

Les produits issus de la réaction d'amplification ont été extraits et purifiés à l'aide du kit de purification QIAquick (Qiagen) avant de procéder au séquençage selon le protocole décrit plus haut. Les séquençages ont été réalisés en utilisant les amorces BCCT-F et BCCT-R qui ont permis d'obtenir les meilleurs résultats d'amplification. La migration des produits PCR a été

effectuée sur un gel d'agarose à 1 % (p/v) dans du tampon TAE. Les bandes ont été excisées et l'ADN a été purifié avec un kit d'extraction (Qiagen, Courtaboeuf, France) comme décrit plus haut. Les produits PCR ont été séquencés sur les deux brins avec les amorces utilisées pour l'amplification PCR. Les séquences ont été assemblées en utilisant le programme Auto Assembler (Perkin Elmer, Nieuwerkerk a/c Ijssel, Pays-Bas). Les séquences consensus ont été comparées selon les procédés BlastN (Altschul et al. 1997) aux séquences contenues dans la base de données GenBank par l'intermédiaire du serveur NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Les séquences proches ont été incluses dans l'analyse phylogénétique. Les séquences ont été alignées à l'aide du logiciel CLUSTAL X 2.0.5 (Larkin et al. 2007). Les séquences alignées ont été vérifiées manuellement et éditées avec le programme GeneDoc. L'analyse phylogénétique a été effectuée avec le programme MEGA version 4.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Tamura et al. 2007) en utilisant l'algorithme *Neighbor-Joining* (Saitou and Nei 1987) et la méthode des deux paramètres de Kimura (Kimura 1980) en éliminant les positions de gap dans chaque séquence. Une analyse de bootstrap a été réalisée sur 1000 répétitions pour vérifier la stabilité des groupes. Une comparaison des séquences d'acides aminés du système potentiel de transport de solutés compatibles des *Mesorhizobium* sp. ORS 3355 et ORS 3359 avec ceux des systèmes de transport de glycine bêtaïne de quelques bactéries a été effectuée. Un alignement des séquences d'acides aminés a été réalisé avec le logiciel CLUSTAL W 1.82.

4. Cultures des plants

4.1. Spectre d'hôte des souches de *Mesorhizobium* sp.

Les souches de *Mesorhizobium* sp. isolées des nodules de plants d'*A. seyal* ont été testées pour leur aptitude à noduler leur plante hôte d'origine et d'autres légumineuses ligneuses : *Acacia auriculiformis*, *A. senegal*, *A. tortilis* subsp. *raddiana*, *Leucaena leucocephala* et *Prosopis juliflora*. Les semences ont été fournies par l'ISRA/CNRF. La scarification et la désinfection superficielle des graines ont été réalisées par un trempage dans un bain d'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré durant 14 min (*A. senegal*), 30 min (*A. seyal* et *L. leucocephala*), 60 min (*A. auriculiformis* et *P. juliflora*) et 90 min (*A. raddiana*), suivi d'un rinçage abondant à l'eau distillée stérile. Les graines ont ensuite été placées sur des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée (1 % ; p/v) et mises à germer à l'étuve à 37°C pendant 24 h. La culture des plants et les tests de nodulation ont été effectués en utilisant la méthode de Gibson

(Gibson 1980) sur des tubes (220 x 22 mm) contenant 30 ml de milieu nutritif Jensen modifié dépourvu d'azote (Vincent 1970) dans les conditions décrites plus haut. Sept jours après la germination, les plants ont été inoculés avec 100 µl de culture bactérienne de souches de *Mesorhizobium* sp. d'*A. seyal* (environ 10⁵ cellules sur milieu YEM). Quatre répétitions ont été effectuées pour chaque souche de rhizobium et 4 plants non inoculés ont servi comme témoins. Enfin, la nodulation a été suivie et les nodules ont été récoltés au bout de 4 semaines après inoculation.

4.2. Infectivité et effectivité en pépinière des souches de *Mesorhizobium* sp. vis-à-vis d'*A. seyal*

Le pouvoir symbiotique des souches de *Mesorhizobium* sp. nodulant *A. seyal* a été testé en pépinière sur du sol sableux de Sangalkam (50 km à l'Est de Dakar, Sénégal) pauvre en azote et en phosphore. Le sol a été broyé et passé à travers un tamis de 2 mm de maille. Les caractéristiques physico-chimiques de ce sol sont les suivantes : pH (H₂O) 6,5; argile (3,6 %); limon fin (7,4 %); limon grossier (25,4 %); sable fin (36,6%); sable grossier (21,55 %); C total (0,54 %); azote total (0,06 %) ; C/N, 8,5; P total (39 ppm), et Olsen P (4,8 ppm) (Olsen et al. 1954). La scarification, la désinfection superficielle et la germination des graines ont été réalisées comme décrit plus haut. Les graines prégermées d'*A. seyal* ont été semées dans des pots remplis avec 1 kg de sol de Sangalkam non désinfecté dans un dispositif en bloc complètement randomisé avec 9 répétitions par traitement. L'inoculation a été réalisée au moment du repiquage à raison de 5 ml par pot d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance cultivée à 28 °C sur milieu YEM pendant 2-3 jours ou de 5 ml du milieu YEM sans bactéries, dans le cas des traitements témoins. Les plants ont été placés dans une serre avec une lumière naturelle (30 °C le jour, 25 °C la nuit, avec une photopériode de 14 h). Ils ont été régulièrement arrosés à la capacité au champ avec de l'eau de robinet. Après 3 mois de culture, les paramètres morphométriques et écophysologiques ont été mesurés et analysés.

Les effets relatifs de l'inoculation sur la croissance des plants ont été comparés en mesurant la hauteur des plants. L'infectivité et l'effectivité des souches ont été appréciées par le nombre moyen de nodules et la biomasse sèche (racines, nodules et parties aériennes). Les résultats obtenus ont été soumis à une analyse de variance à l'aide du logiciel SuperANOVA™

(Abacus Concepts, Berkeley, Inc, en Californie, 1989) et les moyennes classées en groupes homogènes par le test de Newman-Keuls au seuil de 5 % (Dagnélie 1973).

5. Analyse moléculaire des séquences des gènes symbiotiques

Sur la base des résultats de la caractérisation physiologique et du séquençage de l'IGS 16S-23S ADNr du chapitre précédent, sept souches de *Mesorhizobium* sp. représentant à la fois les groupes électrophorétiques et les différents clusters (ORS 3324, ORS 3355, ORS 3356, ORS 3359, ORS 3365, ORS 3369 et ORS 3404) ont servi dans les analyses phylogénétiques des gènes *nodA*, *nodC* et *nifH*. Les séquences des gènes *nodA* et *nodC* de la souche type de *M. plurifarium* ORS 1032^T et les gènes *nodC* et *nifH* de la souche de *M. plurifarium* ORS 1096, phylogénétiquement proche de la souche type, qui n'étaient pas disponibles dans GenBank au moment de l'étude ont été séquencées. Des colonies obtenues des isolats ont été inoculées dans 10 ml de bouillon YEM et cultivées pendant 3-5 jours à 28-30 °C. L'ADN génomique de chaque souche a été préparé comme décrit précédemment par Chen and Kuo (1993).

Les régions des gènes *nodC* et *nifH* ont été amplifiées par PCR, comme décrit par Laguerre *et al.* (2001). Environ 900 pb du gène *nodC* a été amplifié en utilisant les amorces sens *nodCF* ou *nodCFn* et l'amorce antisens *nodCI*. Un fragment du gène *nifH* de 600 bp a été amplifié avec les amorces *nifHF* et *nifHI*. Un fragment d'environ 650 pb des gènes des cinq souches *nodA* a été amplifié en utilisant les amorces sens *NODA1F* (Sy *et al.* 2001) et *nodAf-ORS1001* (Moulin *et al.* 2001), and les amorces antisens *NODAB1R* (Sy *et al.* 2001) et *nodAr-ORS1001* (Moulin *et al.* 2001). Les réactions d'amplification par PCR des gènes *nodA*, *nodC* et *nifH* des souches ont été réalisées avec le programme PCR "Touchdown" en faisant passer la température d'hybridation de 65 °C à 55 °C en 20 cycles. L'amplification du gène *nifH* de la souche ORS 3324, a été réalisée en utilisant une PCR standard avec une température de recuit de 57 °C en 35 cycles. La migration des produits PCR a été effectuée sur un gel d'agarose de 1 % (p/v) dans du tampon TAE. Les bandes ont été excisées et l'ADN a été purifié avec un kit d'extraction (Qiagen, Courtaboeuf, France) comme décrit plus haut. Les produits PCR ont été séquencés sur les deux brins avec des amorces utilisées pour l'amplification PCR. Les réactions de séquence ont été effectuées à l'aide d'un séquenceur ABI Prism BigDye Terminator Cycle (Macrogen, Corea) et les séquences ont été analysées

avec un séquenceur de type Applied Biosystems modèle 310. Les séquences ont été assemblées en utilisant le programme Auto Assembler (Perkin Elmer, Nieuwerkerk a/c Ijssel, Pays-Bas). Les séquences consensus ont été comparées selon les procédés BlastN (Altschul et al. 1997) aux séquences contenues dans la base de données GenBank par l'intermédiaire du serveur NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) et les séquences proches ont été incluses dans l'analyse phylogénétique réalisée à l'aide du logiciel CLUSTAL X 2.0.5 (Larkin et al. 2007). Les séquences alignées ont été vérifiées manuellement et éditées avec le programme GeneDoc. L'analyse phylogénétique a été effectuée avec le programme MEGA version 4.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Tamura et al. 2007) en utilisant l'algorithme *Neighbor-Joining* (Saitou and Nei 1987) et la méthode des deux paramètres de Kimura (Kimura 1980) en éliminant les positions de gap dans chaque séquence. Une analyse de bootstrap a été réalisée sur 1000 répétitions pour vérifier la stabilité des groupes. Les séquences des gènes ont été déposés dans la base de données GenBank sous les numéros d'accèsion FJ745275 à FJ745282 pour les séquences *nodA*, FJ745283 à FJ745291 pour les séquences *nodC* et FJ745292 à FJ745298 pour les séquences *nifH*.

RESULTATS

1. Avant propos

Une partie de ce chapitre a fait l'objet de deux articles et d'une communication à des congrès internationaux.

1. **Diouf D**, Fall D, Chaintreuil C, Ba AT, Dreyfus B, Neyra M, Ndoye I, Moulin L (2010). Phylogenetic analyses of symbiotic genes and characterization of functional traits of *Mesorhizobium* spp. strains associated to a promiscuous species *Acacia seyal* Del. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 818-830. URL : <http://dx.doi.org.10.1111/j.1365-2672.2009.04500.x>. (**Impact Factor 2009 : 2.098**)
2. **Diouf D**, Ndoye I, Fall D, Kane A, Ba AT, Neyra M (2008). Caractérisation phénotypique et symbiotique de souches de *Mesorhizobium* spp. nodulant *Acacia seyal* Del. *Journal des Sciences et Technologies* 7: 1-10. URL : http://jst.ucad.sn/2008_vol7_1_full=1.htm.
3. **Diouf D**, Fall D, Ba AT, Dreyfus B, Neyra M, Ndoye I, Moulin L (2008). Phylogenetic analyses of symbiotic genes (*nodA*, *nodC*, and *nifH*) do not reflect the taxonomy of rhizobia that nodulate *Acacia seyal* in Senegal. Communication orale présentée au 13^e Congrès de l'Association Africaine pour la fixation Biologique de l'Azote, 15–18 Décembre 2008, Hammamet, Tunisie.

2. Propriétés phénotypiques des souches de *Mesorhizobium* sp.

Cette étude a été consacrée aux souches de *Mesorhizobium* sp., qui sont prédominantes dans notre collection de souches de rhizobium associées à *A. seyal*. L'analyse numérique de 42 traits phénotypiques et physiologiques de 21 souches de rhizobium (9 souches de *Mesorhizobium* sp. isolées de nodules d'*A. seyal* et 12 souches de type de *Mesorhizobium* spp. et d'*Ensifer* spp.) a montré qu'à un coefficient de similitude d'environ 96%, les souches de *Mesorhizobium* sp. associées à *A. seyal* sont hétérogènes et forment deux groupes distincts (Figure 18). Deux souches (ORS 3324 et ORS 3355) forment le Groupe I avec la souche de type de *M. plurifarum* ORS 1032^T. Un groupe de sept souches a été séparé de toutes les autres souches, formant ainsi un autre groupe sur le phénogramme (groupe II). Cinq souches (ORS 3357, ORS 3365, ORS 3369, ORS 3397 et ORS 3404) se retrouvent dans le même sous-groupe. Aucune relation significative n'a été observée entre la classification des souches et leur origine géographique.

Aucune des bactéries testées ne peut utiliser l'amidon ou la salicine comme seule source de carbone. Toutefois, elles ont pu pousser et former de grandes colonies avec des di-ou tri-saccharides (saccharose, lactose, maltose, tréhalose ou raffinose). Les polyols et les monosaccharides (glycérol, D-fructose, D-glucose, D-xylose, galactose, L-arabinose ou mannitol) sont aisément utilisés comme seule source de carbone par toutes les souches. Le D-ribose n'est pas assimilé par les souches ORS 3356, ORS 3365 et ORS 3369.

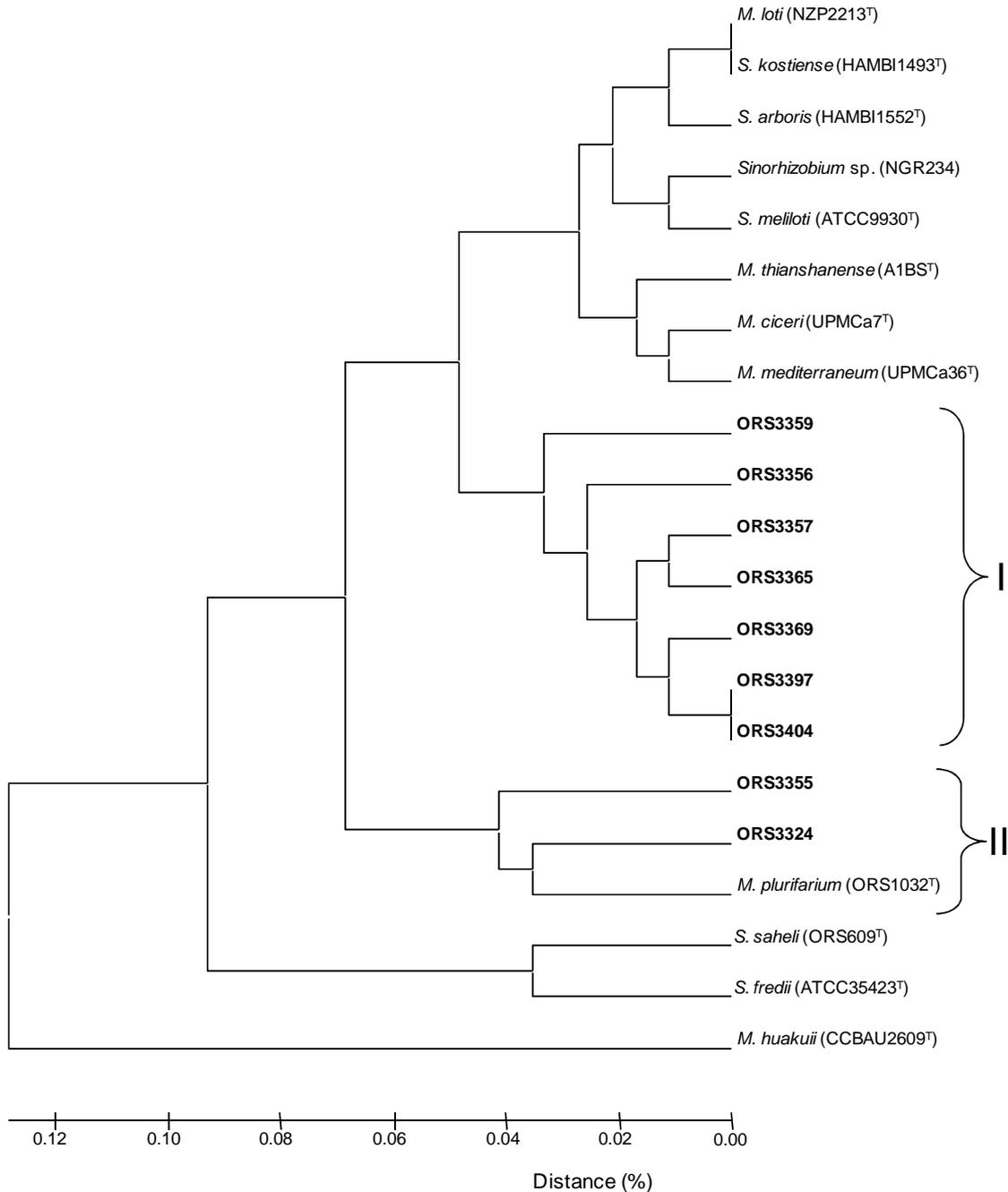


Figure 18 : Phénogramme construit avec la méthode UPGMA mettant en évidence la similitude phénotypique chez les isolats de rhizobiums d'*Acacia seyal* et des souches de référence basées sur les résultats de la taxonomie numérique de 42 caractères phénotypiques.

Les neuf souches peuvent utiliser tous les acides aminés testés, comme seule source d'azote. Les souches testées ont une sensibilité différente aux métaux. Toutes les souches sont sensibles au Cd, au Cu et au FeCl₃ (750 µg/ml). La souche ORS 3359 est résistante à HgCl₂ (5 µg/ml) et Pb (CH₃COO)₂ (1000 µg/ml). Nos résultats indiquent qu'à l'exception de la souche ORS 3324 ; toutes les souches de bactéries isolées des nodules d'*A. seyal*, peuvent croître

dans une gamme de pH de 5 à 10 et tolèrent plus de 1% (p/v) de chlorure de sodium (NaCl) dans le milieu de culture. Dans notre étude, la souche ORS 3359 a pu croître, même avec 3% de NaCl.

3. Recherche de gènes codant pour le système un transport de type BCCT parmi des souches de *Mesorhizobium* sp.

La stratégie PCR a été choisie pour identifier un système de transport de type BCCT sur 10 souches isolées de nodosités de plants d'*A. seyal* et représentant les groupes électrophorétiques majoritaires définis sur la base des profils RFLP.

Une amplification par PCR avec les amorces BT1 et BT3R définies par Boscari et al. (2002), en utilisant les extraits d'ADN génomique comme matrice, n'a été obtenue que pour quatre souches (ORS 3355, ORS 3356, ORS 3358 et ORS 3359). De plus la taille des bandes est variable d'une souche à l'autre (données non présentées). Cette variabilité dans la position des bandes pourrait s'expliquer par une faible spécificité des amorces BT1 et BT3R, liée certainement à leur forte dégénérescence. Ces amorces sont également de courte taille, en particulier pour BT1 (14 pb). Les meilleurs résultats d'amplification par PCR ont été obtenus avec les amorces BCCT-F et BCCT-R. Il en résulte un fragment amplifié d'environ 700 pb pour toutes les 10 souches (Figure 19) quel que soit leur niveau de tolérance au sel.

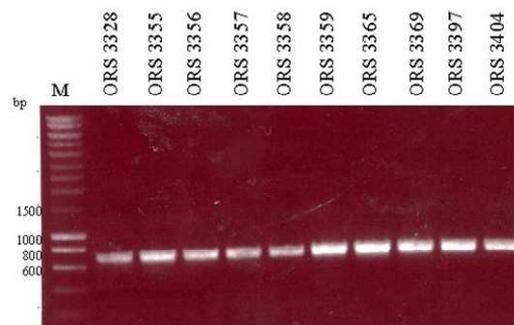


Figure 19 : Gel d'électrophorèse du produit d'amplification par PCR du gène codant pour le système de transport de type BCCT. M : marqueur de poids moléculaire, Smart ladder (Eurogentec).

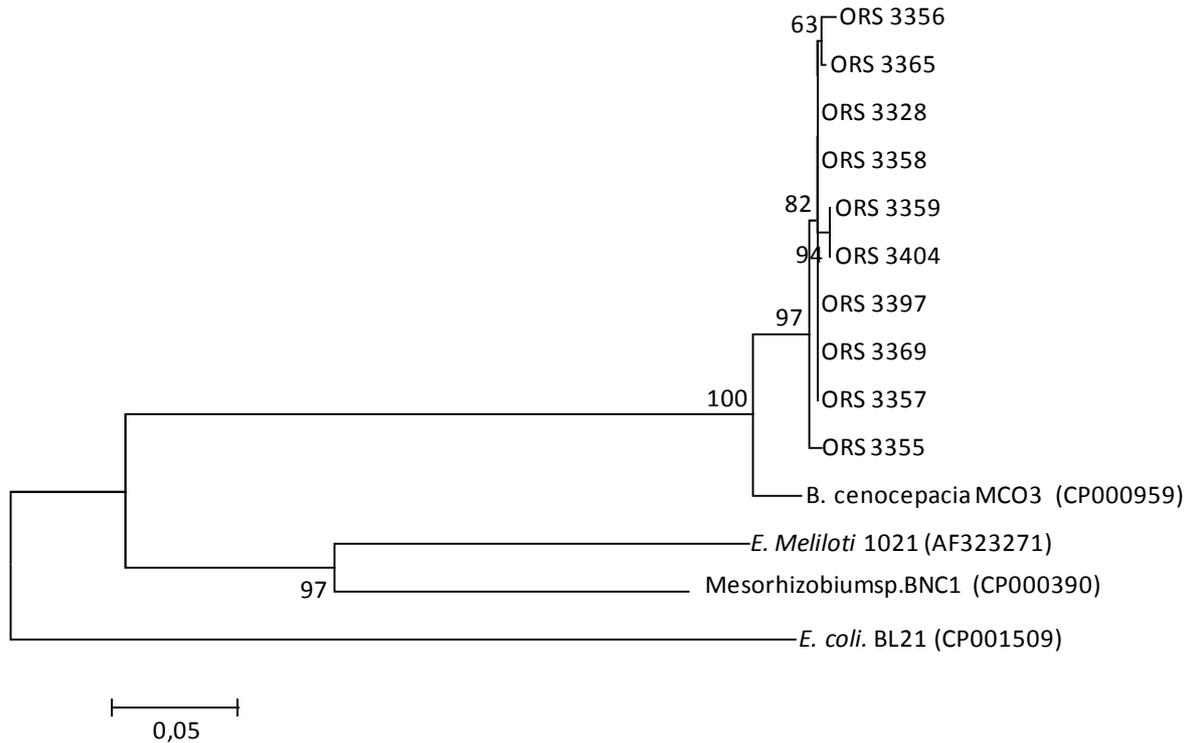


Figure 20 : Arbre phylogénétique (Neighbor-joining) basé sur les séquences alignées (577 pb) des gènes codant pour le système de transport de type BCCT en utilisant MEGA4. Les numéros d'accèsion des séquences sont indiqués entre parenthèses.

Le séquençage des fragments amplifiés et purifiés a été réalisé et l'alignement des séquences a montré que toutes les souches isolées des nodosités de plants d'*A. seyal* ont des séquences similaires (Figure 20). Le système de transport de type BCCT identifié par l'approche PCR avec les amorces dessinées comporte plus de 200 acides aminés. La recherche de protéines proches pour les souches ORS 3355 et ORS 3359 a montré des identités significatives de séquences avec les systèmes BCCT impliqués dans le transport de la glycine bêtaïne. Des scores d'identités assez élevés ont été obtenus pour les séquences de la souche ORS 3355 avec des séquences connues de transporteurs de glycine bêtaïne : 50% d'identité avec le COG1292 (BetT transporteur de Choline/carnitine/bétaïne) de *Mesorhizobium* sp. BNC1, 50% avec le transporteur de glycine/proline bêtaïne BetP de *Ensifer meliloti*, 47% avec le transporteur de choline BetT d'*Haemophilus influenzae*, 43% avec le transporteur de choline BetT d'*E. coli*. Considérant les scores d'identités élevés obtenus avec les séquences de gènes codant pour les transporteurs de type BCCT, il semble évident que les gènes décrits appartiennent à la famille des transporteurs de type BCCT. La

souche ORS 3355 dispose de 4 domaines conservés ; alors que la souche ORS 3359 dispose seulement d'un domaine.

Ce résultat a été confirmé par l'alignement, réalisé par CLUSTAL X, des séquences des gènes des extraits d'ADN des souches isolées de nodosités de plants d'*A. seyal* avec des séquences de gènes BCCT déposées dans GenBank. La Figure 20 est un dendrogramme montrant les relations phylogénétiques entre les séquences des systèmes de transport, identifiés par l'approche PCR des extraits d'ADN des souches isolées de nodosités d'*A. seyal* et celles de gènes codant pour un système de transporteurs de type BCCT connus de différentes espèces. Les séquences des gènes codant pour le système de transport de type BCCT des souches isolées de nodosités de plants d'*A. seyal* forment un groupe assez homogène avec les gènes *betP* de *E. meliloti* et de *Mesorhizobium* sp.

4. Spectre d'hôte des isolats de rhizobium d'*A. seyal*

Les résultats des expériences d'inoculation avec six plantes hôtes (*A. auriculiformis*, *A. senegal*, *A. seyal*, *A. tortilis* subsp. *raddiana*, *L. leucocephala* et *P. juliflora*) indiqués dans le tableau 8 indiquent que les neuf souches de *Mesorhizobium* sp. isolées des nodules d'*A. seyal* ont des spectres de nodulation différents. Toutes les souches utilisées dans cette étude nodulent leur hôte d'origine (*A. seyal*) et *A. senegal*. En revanche, aucune des souches de *Mesorhizobium* sp. ne nodule *A. auriculiformis*. A l'exception des souches ORS 3356 et ORS 3365, qui ne nodulent que deux des espèces testées (*A. senegal* et *A. seyal*), les souches de rhizobium sont promiscuites. En effet, elles ont pu noduler les légumineuses de différentes tribus et espèces. La souche ORS 3355 nodule toutes les espèces testées, à l'exception de *A. auriculiformis*. Les souches ORS 3355, ORS 3369 et ORS 3397 nodulent *L. leucocephala*. Quatre des neuf souches de *Mesorhizobium* spp. testées (ORS 3355, ORS 3357, ORS 3359 et ORS 3404) induisent des nodules sur *A. raddiana*. *P. juliflora* est nodulé par quatre souches (ORS 3324, ORS 3355, ORS 3357 et ORS 3359).

Tableau 8 : Tests de spécificité des souches de *Mesorhizobium* sp. basés sur la nodulation (+) de différentes légumineuses ligneuses, 28 jours après l'inoculation

Souche*	Origine des sols**			Plante hôte					
	Origine	pH	EC (μ S/cm)	<i>A.</i> <i>auriculiformis</i>	<i>A.</i> <i>raddiana</i>	<i>A.</i> <i>senegal</i>	<i>A. seyal</i>	<i>L.</i> <i>leucocephala</i>	<i>P.</i> <i>juliflora</i>
ORS 3324	Bambey	6,50	148	-	-	+	+	-	+
ORS 3355	Velor 2	6,20	200	-	+	+	+	+	+
ORS 3356	Velor 2	6,20	200	-	-	+	+	-	-
ORS 3357	Nonane 1	5,83	4580	-	+	+	+	-	+
ORS 3359	Nonane 3	6,29	951	-	+	+	+	-	+
ORS 3365	Foundiougne 5	6,90	805	-	-	+	+	-	-
ORS 3369	Velor 1	6,14	220	-	-	+	+	+	-
ORS 3397	Ndiafate 2	6,30	1160	-	-	+	+	+	-
ORS 3404	Velor 1	6,14	220	-	+	+	+	-	-

* Voir Tableau 4 pour plus de détail sur l'origine des souches ; ORS, collection de souches de rhizobium du Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/ISRA/UCAD Dakar, Sénégal. ** Caractéristiques des sols d'origine des souches.

5. Infectivité et effectivité en pépinière des souches de *Mesorhizobium* sp. vis-à-vis d'*A. seyal*

L'inoculation microbienne augmente le nombre de nodules après 3 mois de culture sur sol non désinfecté (Tableau 9). La nodulation notée sur les plants témoins non inoculés, indique que le sol utilisé dans cette expérience contient des souches de bactéries autochtones capables de former des nodules sur les racines d'*A.seyal*. Cependant, seulement trois des plants témoins non inoculés sur neuf ont été faiblement nodulés par les souches autochtones. En revanche, tous les plants d'*A. seyal* inoculés avec les neuf souches de *Mesorhizobium* sp. ont été nodulés avec un nombre moyen de nodules par plant variant entre 9 et 37 contre un nodule par plant chez les plants témoins non inoculés ; ce qui indique que les souches de rhizobiums autochtones sont moins infectives que les souches de *Mesorhizobium* sp. utilisées comme inoculum dans cette étude. Les souches ORS 3324 et ORS 3359 ont été les plus infectives sur ce sol non désinfecté. La hauteur et la biomasse totale varient en fonction de la souche. A l'exception des souches ORS 3357 et ORS 3365, la croissance des plants (en termes de hauteur de la plante) a été significativement améliorée par l'inoculation microbienne, de 38% à 69% par rapport aux plants témoins non inoculés (Figure 21).

Le poids de matière sèche des nodules est corrélé au nombre des nodules. L'inoculation avec trois des neuf souches de *Mesorhizobium* sp. testées (ORS 3357, ORS 3365 et ORS 3369) n'a eu aucun effet significatif sur le poids de matière sèche des racines et la biomasse totale des plants. A l'exception de la souche ORS 3355, la biomasse totale des plants inoculés avec les six autres souches est généralement de 2 fois supérieur à celui des plants témoins non inoculés ; ce qui reflète un rendement élevé des souches inoculées par rapport à celles des souches autochtones.

Tableau 9 : Effets de l'inoculation microbienne sur la croissance de plants d'*A. seyal* et le nombre total des nodules après 3 mois de culture en serre sur sol de Sangalkam non désinfecté

Traitement microbien	Hauteur (cm)	Biomasse aérienne (mg matière sèche)	Biomasse racinaire (mg matière sèche)	Biomasse totale (mg matière sèche)	Nombre de nodules par plant
Témoin	23,9 (2,2) ^{a**}	731 (45) ^a	852 (48) ^a	1585 (79) ^a	1 (1) ^a
ORS3365	32,9 (1,29) ^{bc}	960 (26) ^{bc}	876 (69) ^a	1844 (93) ^a	9 (2) ^b
ORS3355	33,9 (1,82) ^c	1066 (117) ^c	1357 (71) ^b	2439 (149) ^b	17 (3) ^c
ORS3369	27,8 (1,71) ^{ab}	822 (63) ^{ab}	690 (95) ^a	1519 (139) ^a	7 (2) ^b
ORS3357	29,4 (1,53) ^{ab}	807 (39) ^{ab}	834 (51) ^a	1647 (60) ^a	6 (1) ^b
ORS3397	38,0 (2,34) ^{cd}	1344 (101) ^{cd}	1759 (120) ^c	3130 (164) ^c	27 (5) ^d
ORS3324	38,3 (1,68) ^d	1514 (77) ^d	1899 (96) ^c	3444 (130) ^c	31 (2) ^d
ORS3359	39,0 (1,55) ^d	1630 (91) ^d	1774 (72) ^c	3441 (117) ^c	37 (9) ^d
ORS3356	40,3 (1,14) ^d	1587 (67) ^d	2017 (171) ^c	3631 (182) ^c	27 (3) ^d
ORS3404	39,0 (1,7) ^d	1346 (69) ^d	1789 (125) ^c	3151 (150) ^c	17 (4) ^c

* Erreur Standard. ** Les valeurs d'une même colonne, suivies par la même lettre ne diffèrent pas significativement selon le test de Newman-Keuls au seuil de 5%.



Figure 21 : Plants d'*A. seyal* témoins et inoculés avec la souche ORS 3324 après 3 mois de culture en serre sur sol de Sangalkam non désinfecté. © D. Diouf.

6. Analyse moléculaire des séquences de gènes symbiotiques des souches de *Mesorhizobium* sp. d'*A. seyal*

Les gènes *nodA* ont été amplifiés dans nos conditions expérimentales pour l'ensemble des sept souches testées (ORS 3324, ORS 3355, ORS 3356, ORS 3359, ORS 3365, ORS 3369 et ORS 3404). L'analyse *Blast* a montré une grande similarité (97-99%) des séquences d'ADN codant pour le gène *nodA* des rhizobiums d'*A. seyal* avec celle de la souche type de *M. plurifarum* ORS 1032^T (LMG 11892^T) et de la souche de *M. plurifarum* ORS 1096 (LMG 15298) isolées respectivement d'*A. senegal* et d'*A. tortilis* subsp. *raddiana*. Nos résultats montrent que la phylogénie du gène *nodA* est cohérente avec celle de l'ARNr 16S (Figure 22). L'analyse phylogénétique montre que les séquences *nodA* des rhizobiums d'*A. seyal* sont regroupés avec les gènes *nodA* des souches ORS 1096 (*M. plurifarum*). Elles forment un groupe avec la souche type de *M. plurifarum* ORS 1032^T, avec une valeur de bootstrap très élevée (100%).

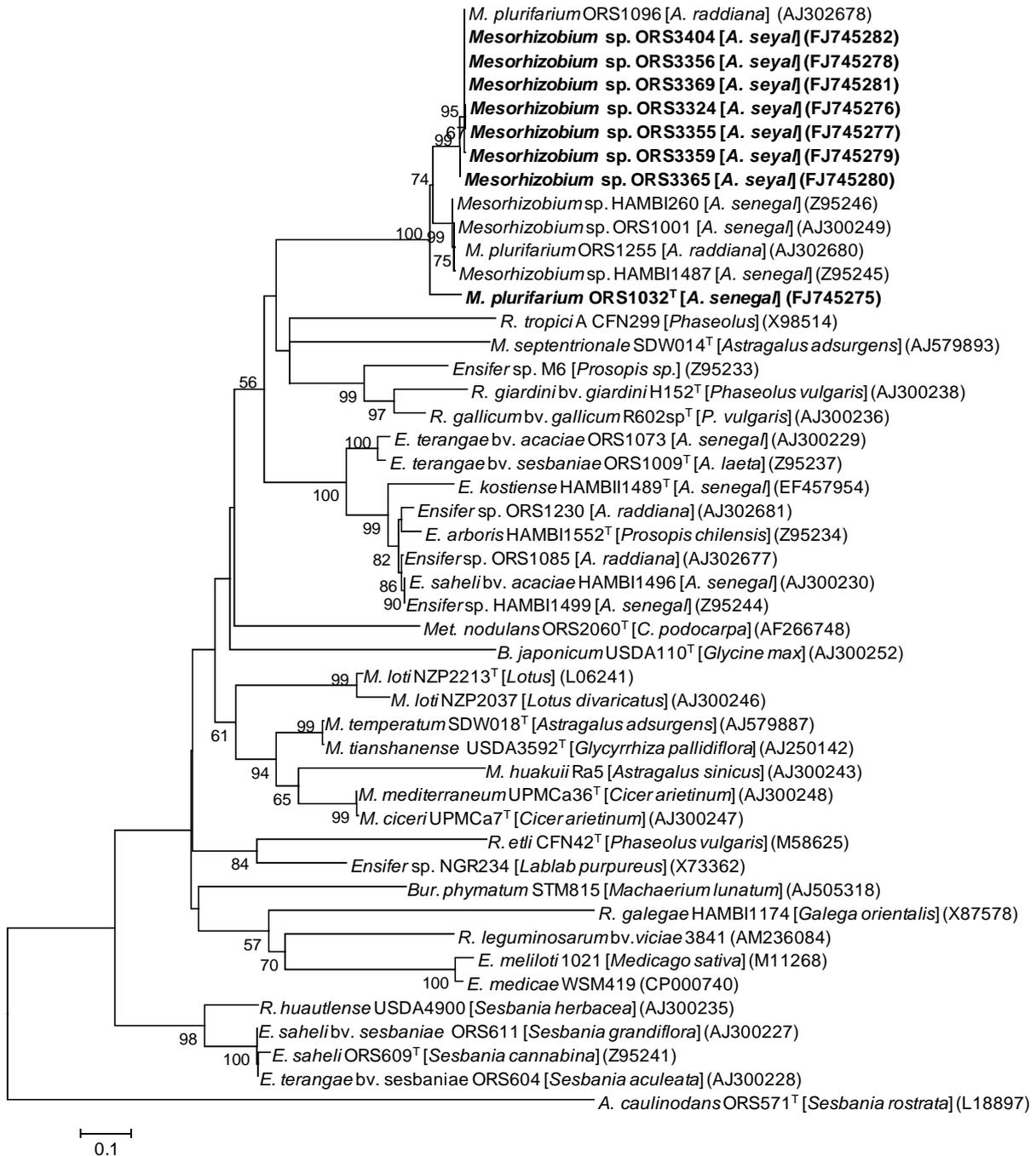


Figure 22 : Arbre phylogénétique (Neighbor-joining) de séquences alignées de 466 pb de gènes *nodA* utilisant l’algorithme MEGA4. Les plantes hôtes d’isolement sont indiquées entre crochets. Les numéros d’accession GenBank des séquences sont indiqués entre parenthèses. Les numéros obtenus au cours de ce travail sont indiqués en gras. Seules les valeurs supérieures à 50% (1000 répétitions) sont indiquées au nœud. Les branches horizontales sont établies au prorata du nombre de substitutions nucléotidiques par site. La souche d’*Azorhizobium* ORS 571 a été choisie comme *outgroup*. Le seuil de divergence des séquences est de 10%.

Les topologies des arbres phylogénétiques basées sur les séquences alignées de gènes *nodC* (Figure 23) et *nifH* (Figure 24) sont presque semblables. En dépit de leur appartenance à des groupes taxonomique connexes, des gènes symbiotiques (*nodC* et *nifH*) très dissemblables

ont été trouvés parmi les souches d'*A. seyal* et la souche de type de *M. plurifarium*. Dans les deux arbres, deux groupes distincts de rhizobiums d'*A. seyal* sont mis en évidence. Le gène *nodC* séquencé de six souches (ORS 3355, ORS 3356, ORS 3359, ORS 3365, ORS 3369 et ORS 3404) regroupées avec le même gène porté par la souche *M. plurifarium* ORS 1032^T montrant environ 99% des valeurs de bootstrap (Figure 23). En revanche, La séquence du gène *nodC* de la souche ORS 3324 est fortement divergente de celle du même gène porté par la souche type de *M. plurifarium*. Le fragment d'ADN *nodC* de la souche ORS 3324 présente 96% de similarité avec celle de la souche type d'*Ensifer arboris* LMG 14919^T (HAMBI 1552^T) isolée de nodules de *Prosopis chilensis* collectés au Soudan. Le gène *nifH* n'a pas pu être amplifié pour la souche ORS 3359 en utilisant les amorces *nifH* décrites dans cette étude. Les séquences *nifH* identifiées pour les cinq souches (ORS 3355, ORS 3356, ORS 3365, ORS 3369 et ORS 3404) forment un groupe avec celle décrite pour la souche type de *M. plurifarium* ORS 1032^T (Figure 24). La séquence du gène *nifH* de la souche ORS 3324 est nettement divergente des séquences *nifH* obtenues pour les autres souches de rhizobiums d'*A. seyal*. Elle est très proche des séquences *nifH* d'*E. Arboris* LMG 14919^T (HAMBI 1552^T) et regroupée avec *Ensifer saheli* bv. *sesbaniae* ORS 609^T et *Ensifer terangae* bv. *acaciae* ORS 1009^T avec une forte valeur de bootstrap (99%).

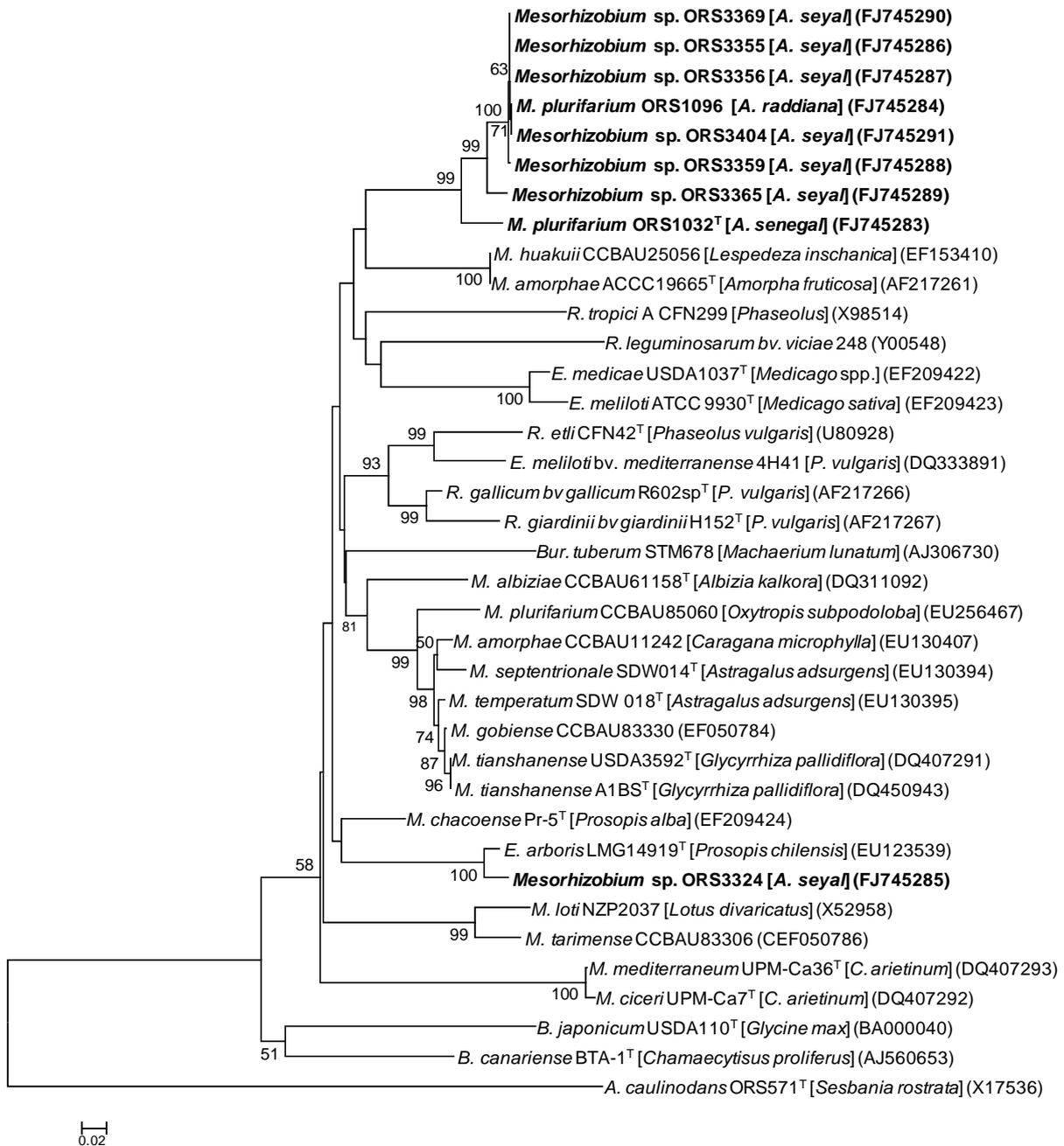


Figure 23 : Arbre phylogénétique (Neighbor-joining) de séquences alignées de 448 pb de gènes *nodC* utilisant l’algorithme MEGA4. Les plantes hôtes d’isolement sont indiquées entre crochets. Les numéros d’accèsion GenBank des séquences sont indiqués entre parenthèses. Les numéros obtenus au cours de ce travail sont indiqués en gras. Seules les valeurs supérieures à 50% (1000 répétitions) sont indiquées au nœud. Les branches horizontales sont établies au prorata du nombre de substitutions nucléotidiques par site. La souche d’*Azorhizobium* ORS 571 a été choisie comme *outgroup*. Le seuil de divergence des séquences est de 20%.

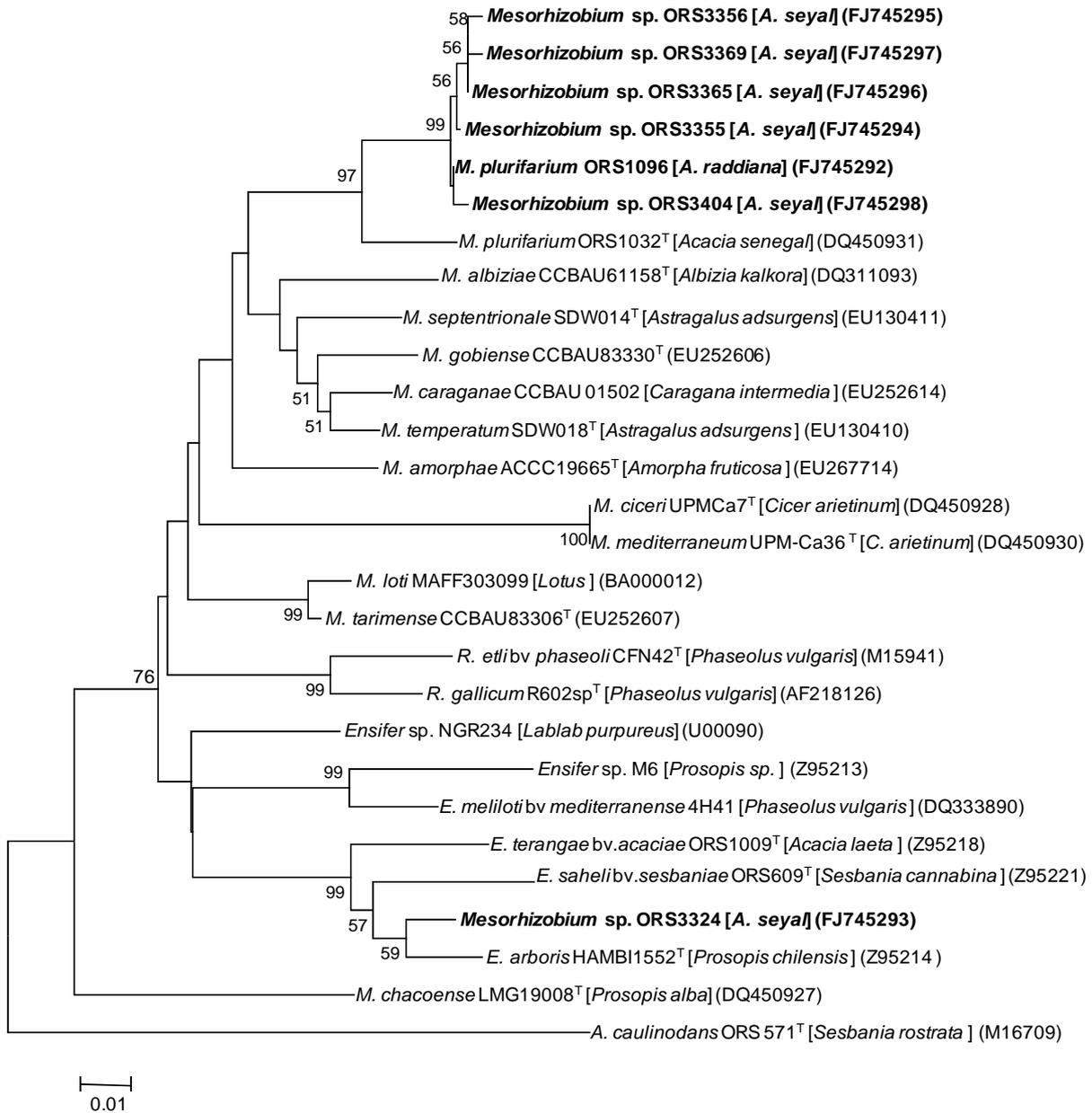


Figure 24 : Arbre phylogénétique (Neighbor-joining) de séquences alignées de 362 pb de gènes *nifH* utilisant l'algorithme MEGA4. Les plantes hôtes d'isolement sont indiquées entre crochets. Les numéros d'accèsion GenBank des séquences sont indiqués entre parenthèses. Les numéros obtenus au cours de ce travail sont indiqués en gras. Seules les valeurs supérieures à 50% (1000 répétitions) sont indiquées au nœud. Les branches horizontales sont établies au prorata du nombre de substitutions nucléotidiques par site. La souche d'*Azorhizobium* ORS 571 a été choisie comme *outgroup*. Le seuil de divergence des séquences est de 10%.

DISCUSSION

Les caractérisations symbiotiques, phénotypiques et génotypiques de neuf souches de rhizobium isolées de nodules d'*A. seyal*, et isolés. Ces nodules ont été obtenus par piégeage sur des racines de plants d'*A. seyal* inoculés avec des suspensions de sols des différentes zones agro-écologiques du Sénégal. Ces souches peuvent être considérées comme des souches à croissance rapide. Elles développent des colonies visibles entre 1 et 3 jours (Jordan 1984).

Les Acacias africains sont principalement nodulés par des souches des genres *Mesorhizobium*, *Rhizobium* et *Ensifer* (Ba et al. 2002; de Lajudie et al. 1998b; Diouf et al. 2007; Haukka et al. 1998; Khbaya et al. 1998; Sarr et al. 2005). Nos résultats de piégeage à partir de dilutions de sols montrent la prédominance des genres *Ensifer* et *Mesorhizobium* parmi les bactéries nodulant *A. seyal* (Diouf et al. 2007). Toutefois, ces résultats de piégeage à partir de dilutions du sol pourraient ne pas refléter la situation réelle sur le terrain ; étant donné les différences de compétitivité entre les souches pour la formation de nodules et l'influence potentielle de l'environnement du sol sur la nodulation et la gamme de génotypes rhizobiens échantillonnés. Des études ont montré une différence entre la diversité de souches obtenues par piégeage de celles isolées de nodules récoltés *in situ* (Bala et al. 2001; Duodu et al. 2006). Des rapports sur des tests d'inoculation présentent *A. seyal* comme une légumineuse promiscuite qui est nodulée par divers génotypes rhizobiens y compris des représentants des genres *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* et *Rhizobium* (Dreyfus and Dommergues 1981b; Odee et al. 2002).

Cependant, les résultats de l'expérience d'inoculation indiquent que les neuf souches de *Mesorhizobium* sp. ont des spectres de nodulation différents avec les six espèces de légumineuses représentants des trois groupes d'inoculation précédemment décrits par Dreyfus et al. (1981b) en fonction de leur capacité à être nodulées. Plusieurs souches testées dans cette étude sont promiscuites, comme ils ont pu noduler des légumineuses de différentes tribus et espèces. Toutes les souches testées dans cette étude nodulent *A. senegal* et *A. seyal*, qui appartiennent au même groupe d'inoculation croisée. En revanche, aucune des neuf souches de *Mesorhizobium* spp. ne nodule *A. auriculiformis*. Toutefois, ce

résultat n'est pas surprenant ; car *A. auriculiformis* est supposée noduler efficacement avec des souches de *Bradyrhizobium* spp. et *Rhizobium* spp. (Fremont et al. 1999; Galiana et al. 1990). Certains de nos souches de rhizobium nodulent *L. leucocephala*, qui est généralement nodulée par des souches du genre *Rhizobium*. Les rhizobiums isolés de nodules d'*Acacia* sp. sont capables de noduler des légumineuses phylogénétiquement éloignées. Une nodulation éparsée de plants de *L. leucocephala* par des souches de *Bradyrhizobium* spp. isolées d'*Acacia* spp. a été signalée (Swelim et al. 1997).

L'analyse numérique des caractéristiques phénotypiques distingue les souches de *Mesorhizobium* sp. d'*A. seyal* en deux groupes. Toutefois, l'origine géographique des souches a peu d'incidence sur leur classification phylogénétique et phénotypique. Les souches provenant de régions géographiques ou agro-écologiques distinctes ont des caractéristiques similaires. En ce qui concerne le métabolisme des acides aminés et des sucres, la majorité des souches sont capables d'utiliser un large éventail de sources de carbone et d'azote. La salinité affecte négativement la croissance de toutes les souches. Toutefois, à l'exception de la souche ORS 3324, incapable de croître à des concentrations en sel supérieure à 1% de NaCl, toutes les souches testées survivent dans une large gamme de pH et à une concentration en NaCl supérieure à 2% (p/v) (342 mM), confirmant ainsi le niveau élevé de tolérance au sel des souches de rhizobiums associées aux légumineuses des régions arides (Abdelmoumen et al. 1999; Essendoubi et al. 2007).

Cette adaptation pourrait s'expliquer par la présence de système de transport de solutés compatibles constitutif dans ces souches d'*A. seyal*. Le système de transport de type BCCT, identifié par PCR des extraits d'ADN des souches isolées de nodosités de plants d'*A. seyal*, est exprimé même en absence de stress salin et quel que soit le niveau de tolérance au sel des souches. Il semble que ce type de transporteur est exprimé de façon constitutive, comme c'est le cas pour le symport BetP de *Corynebacterium glutamicum* (Peter et al. 1996). Il serait, cependant intéressant de vérifier l'expression de ce gène en présence de différentes doses de NaCl.

L'expérience en serre a montré que la nodulation s'est produite sur des plants témoins non inoculés, indiquant que le sol contenait des souches autochtones capables de former des nodules sur les racines d'*A. seyal*. Toutefois, la faible nodulation et la faible croissance des

plants témoins non inoculés indiquent que les souches autochtones sont moins efficaces que les souches de *Mesorhizobium* sp. utilisées comme inoculum dans cette étude. Des résultats similaires ont été observés sur le sol même avec des plants d'*Acacia auriculiformis* et d'*A. mangium* inoculés avec des souches de *Bradyrhizobium* sp. (Diouf et al. 2005). Les trois souches les moins efficaces (ORS 3357, ORS 3365 et ORS 3369) sont très proches sur la phenograme. Il est intéressant de noter que la souche ORS 3359, qui présente la plus forte tolérance au NaCl et une tolérance à une large gamme de pH, est également la souche la plus efficace. Cette souche pourrait être utile pour l'inoculation et l'amélioration de la symbiose *A. seyal*-Rhizobium sur des sols affectés par la salinité. Cependant, d'autres études n'ont pas pu établir une corrélation entre la tolérance au sel des rhizobiums (mesurée au laboratoire) et l'impact sur les performances de croissance d'espèces d'*Acacia* spp. cultivées en présence ou non de NaCl. En d'autres termes, il n'a pas été prouvé que les souches tolérantes au sel soient les plus performantes dans des environnements plus salés (Thrall et al. 2008).

Le transfert horizontal de gènes est l'une des principales forces motrices dans l'évolution des génomes bactériens (Ochman et al. 2000). Bien que n'importe quel gène peut être transféré, il est de plus en plus documenté qu'il existe une classe distincte de gènes qui sont particulièrement sensibles aux transferts. Ces gènes constituent le génome accessoire, qui se distingue du génome de base par une composition en ADN (% G+C) particulière, une distribution irrégulière et une phylogénie discordante (Young et al. 2006). Les gènes *nod* font partie de ce génome accessoire, et leurs fréquentes pertes ou acquisitions, par transfert horizontal ont conduit à l'origine polyphylétique de Rhizobium (Wei et al. 2009). Par conséquent, la caractérisation et la classification phylogénétique de ces gènes pourraient contribuer à une meilleure compréhension de la symbiose légumineuses-Rhizobium (Laguerre et al. 2001). Compte tenu des différences des spectres de nodulation des souches testées, on s'attendait à la variabilité de leurs gènes symbiotiques. Nous avons utilisé un ensemble de trois gènes symbiotiques (*nodA*, *nodC* et *nifH*) pour confirmer si les souches de rhizobiums nodulant *A. seyal* portent des gènes symbiotiques différents et comprendre leur promiscuité. Nous avons séquencé et inclus dans l'analyse phylogénétique les séquences des gènes *nifH* et *nodC* de la souche type de *M. plurifarium* ORS 1032^T, qui n'étaient pas disponibles dans GenBank. Ces deux gènes, *nifH* et *nodC*, ont montré une bonne corrélation

entre les souches de rhizobium nodulant le même hôte et se présentent comme de bons outils pour l'étude de la promiscuité des légumineuses (Laguerre et al. 2001; Rivas et al. 2007). Il est intéressant de noter que les arbres phylogénétiques basées sur les séquences des gènes *nodC* et *nifH* ont montré une étroite corrélation entre la souche ORS 3324 et les souches d'*E. Arboris* LMG14919^T et d'*E. teranga* ORS 1009^T, isolées respectivement de nodules de plants d'*Acacia laeta* et de *Prosopis chilensis*; et qui nodulent *Prosopis* spp, tout comme la souche ORS 3324. Ces constatations concordent avec le fait qu'*A. seyal* et *Prosopis* spp. sont nodulées en Afrique par les mêmes endosymbiotes (de Lajudie et al. 1998b; Odee et al. 2002). En fait, les genres *Acacia* et *Prosopis* dériveraient d'un ancêtre commun, le sous-genre *Aculeiferum* (Bukhari 1997). Au Sénégal, ces espèces partagent les mêmes zones écologiques et géographiques. Des nodules fixateurs d'azote avec des souches d'*Ensifer adhaerens* portant des plasmides symbiotiques de souches de *Rhizobium tropici* ont été déjà rapportées (Rogel et al. 2001). Le transfert de gènes de nodulation a été démontré non seulement dans des conditions de laboratoire (Brom et al. 2004; Rogel et al. 2001; Tun-Garrido et al. 2003) mais aussi sur le terrain (Nandasena et al. 2007; Zhang et al. 2000). A cet égard, le transfert des îlots symbiotiques est bien documenté pour les bactéries du genre *Mesorhizobium* et plusieurs auteurs ont montré que de tels transferts peuvent se produire très rapidement entre espèces bactériennes (Nandasena et al. 2007; Zhang et al. 2000).

Nos résultats mettent en évidence que, contrairement à la phylogénie des gènes *nodA*, les phylogénies des gènes *nifH* et *nodC* de nos souches ne sont pas corrélées avec celle de l'ARNr 16S; suggérant des histoires évolutives différentes des gènes symbiotiques et chromosomiques (Barcellos et al. 2007; Haukka et al. 1998; Moulin et al. 2004; Stepkowski et al. 2003). Ce résultat concorde avec le fait que les gènes *nif* et *nod* sont souvent étroitement liés dans les rhizobiums, et peuvent être situés sur des éléments transmissibles tels que les plasmides chez de nombreuses espèces de rhizobiums ou à des éléments analogues à des transposons, ce qui facilite les réarrangements génétiques et les transferts de gènes (Sawada et al. 2003; Sullivan and Ronson 1998; Wei et al. 2009).

CHAPITRE III : INFLUENCE DES CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES SUR LA DIVERSITE FONCTIONNELLE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DES SOLS

INTRODUCTION

L'effet de phénomènes symbiotiques ne se limite pas à leur influence sur la croissance de la plante mais a aussi de profondes implications dans le fonctionnement des cycles biogéochimiques du sol. En conséquence, les communautés microbiennes du sol, notamment les champignons mycorhiziens et les bactéries fixatrices d'azote, sont des composantes essentielles du fonctionnement durable des écosystèmes (Amato and Ladd 1988; Hart et al. 2003; van der Heijden et al. 1998). Entre autres activités microbiennes du sol, l'établissement de la symbiose mycorhizienne modifie qualitativement et quantitativement l'exsudation racinaire ; ce qui entraîne des modifications importantes dans la structure et la diversité fonctionnelle de la microflore tellurique. Cet effet « mycorhizosphère » induit une compartimentation microbienne dans le sol en créant une juxtaposition de peuplements de microorganismes (rhizosphère, mycorhizosphère, hyphosphère) caractérisés par des diversités génétiques et fonctionnelles qui leur sont propres (Duponnois et al. 2005). Cet ensemble forme un complexe trophique dont le fonctionnement est assujéti à des interactions de type trophique (flux de nutriments) entre les différentes composantes du système qui optimisent le développement du couvert végétal (Frey-Klett et al. 2005). La diversité des fonctions de décomposition réalisées par les microorganismes hétérotrophes représente une des composantes de la diversité fonctionnelle microbienne. Dès lors, les mesures directes de la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes hétérotrophes du sol constituent des indicateurs pertinents de l'état de biofonctionnement du sol (Zak et al. 1994). Cette diversité fonctionnelle peut être analysée par la mesure du Profile de Réponse Catabolique (CRP) (Degens and Harris 1997). Dans un contexte de salinisation des terres, l'on pourrait alors se poser la question des modifications des relations entre la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes et les caractéristiques physico-chimiques des sols.

L'objectif général de cette étude est d'évaluer les impacts des paramètres physico-chimiques des sols sur la population et le fonctionnement des communautés microbiennes du sol ; afin d'évaluer la vulnérabilité mais aussi de formuler des prédictions sur les impacts populationnels, structurels et fonctionnels du scénario le plus probable de salinisation des terres.

MATERIEL ET METHODES

1. Echantillonnage et analyse des sols

Les sols ont été prélevés en octobre 2005, à la fin de la saison des pluies, à partir de 4 sites d'échantillonnage couverts par des peuplements naturels d'*A. seyal* au Sénégal (Foundiougne, Ndiafate, Palmarin Ngallou et Sarène). Les sites de Foundiougne et Ndiafate sont situés respectivement en bordure des fleuves Sine et Saloum. Alors que le site Ngallou est situé en bordure de l'Océan Atlantique. Quant au site de Sarène, il est situé en zone non salée sur des terres argileuses (entre Mbour et Joal).

Pour chaque site, quatre arbres choisis au hasard ont été échantillonnés. Pour chaque arbre, les sols ont été prélevés à l'aide de tarière selon les quatre directions (Est, Ouest, Nord et Sud) à partir du tronc de l'arbre. Pour chacune de ces directions, les sols ont été prélevés à une distance de 25 cm par rapport au tronc de l'arbre. En raison de la dureté du sol sur le site de Sarène, l'échantillonnage n'a été réalisé qu'à l'horizon 0-25 cm de profondeur. Pour les trois autres sites, les échantillons de sols ont été prélevés aux horizons 0-25, 25-50 et 50-75 cm de la rhizosphère de quatre arbres d'*A. seyal*. Ainsi, pour chaque site, seize (16) échantillons de sols ont été collectés par horizon, à raison de quatre échantillons par arbre (aux quatre points cardinaux). Les échantillons de sols des directions Est, Nord et Sud ont été tamisés sous un jet d'eau à travers un tamis grossier (3 mm de maille), puis les racines et les nodules ont été collectés et pesés après séchage l'étuve à 70°C pendant 72 h.

Pour chaque site, un échantillon composite de sol a été constitué en mélangeant les échantillons de sols du même horizon récoltés aux directions Ouest de l'ensemble des quatre arbres. Ces échantillons ont servi pour les analyses des activités microbiennes (MPN, biomasse microbienne, minéralisation de l'azote) et des caractéristiques physico-chimiques des sols. La caractérisation physico-chimique des sols (pH, conductivité électrique, granulométrie, teneur en éléments minéraux) a été réalisée au Laboratoire LAMA, ISO 9001-2000, Dakar, US IMAGO, IRD, www.lama.ird.sn.

2. Estimation du nombre de rhizobiums nodulant *A. seyal*

Le nombre de rhizobiums des sols récoltés capables d'induire une nodulation chez *A. seyal* a été évalué par la méthode MPN (*Most Probable Number*) selon le protocole décrit par

Brockwell (1980). Il s'agit de piéger sur des racines de jeunes plants les rhizobiums naturellement présents dans les échantillons de sols. Une semaine après repiquage, les plants ont été inoculés avec des suspensions de sols. Le protocole expérimental appliqué consiste en une première dilution : 10 g d'échantillon composite de sol introduits dans un erlenmeyer contenant 90 ml d'eau physiologique stérile, donnant ainsi une dilution au dixième (1/10). Après agitation de la solution de sol pendant une heure, six dilutions ont été effectuées : 1/50 ; 1/250 ; 1/1250 ; 1/6250, 1/31250 et 1/156250. Pour chaque niveau de dilution, quatre plants ont été inoculés avec 1 ml d'une suspension de sol par plant afin d'obtenir quatre répétitions par dilution. Le nombre de plants nodulés a été déterminé au bout de six semaines après inoculation. Les résultats obtenus pour les six niveaux de dilution ont été comparés à ceux d'un abaque (Brockwell 1980) permettant d'estimer le nombre de rhizobiums présents dans l'échantillon de sol non dilué. Les résultats ont été exprimés en nombre de rhizobiums par g de sol.

3. Détermination de la biomasse microbienne totale

La méthode de fumigation-extraction (Amato and Ladd 1988) a été utilisée pour déterminer la biomasse microbienne totale des sols prélevés. Cette méthode repose sur le dosage par colorimétrie de l'azote α -aminé contenu dans les microorganismes après la fumigation à l'aide d'une chaîne d'analyseur colorimétrique en flux continu segmenté («Evolution II» Alliance Instruments, France). La quantité de C présent dans la biomasse est calculée en multipliant le gain d'azote α -aminé libéré lors de l'incubation par un facteur 21 selon la formule de Amato et Ladd (1988). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g C/g sol sec}$.

4. Minéralisation de l'azote

La minéralisation de l'azote du sol a été étudiée en mesurant la teneur en azote minéral (NH_4^+ et NO_3^-) des sols récoltés. Cette mesure a été effectuée en utilisant la méthode de Bremner (1965).

5. Diversité fonctionnelle des communautés microbiennes des sols

La diversité fonctionnelle des communautés microbiennes hétérotrophes des échantillons de sols a été déterminée par l'approche physiologique développée par Degens et Harris (1997). La diversité fonctionnelle des échantillons a été évaluée par leur diversité catabolique.

Les mesures ont porté sur 25 substrats organiques et un témoin (eau stérilisée) et ont été exprimées en $\mu\text{g CO}_2 / \text{g de sol / h}$ comme décrit par Sall et al. (2006). Les substrats suivants ont été testés : trois hydrates de carbone (D-glucose, D-mannose, D-saccharose) ; deux amines (D-glucosamine, L-glutamine) ; six acides aminés (L-asparagine, L-sérine, L-histidine, L-arginine, L-glutamine, L-cystéine) ; onze acides carboxyliques (acide citrique, acide fumarique, DL-acide malique, L-acide ascorbique, acide malonique, D-acide quinique, acide succinique, acide tartrique, acide kétoglutarique, acide oxalique, acide gallique et acide pantothénique) ; un acide aromatique (acide gallique) et deux polymères (Tween 80 et Cyclodextrine).

6. Analyse statistique

Les résultats de diversité catabolique présentés sont les moyennes arithmétiques de trois répétitions. Les effets combinés des caractéristiques physico-chimiques des sols sur le nombre de rhizobiums capables de noduler *A. seyal* et les activités microbiennes ont été comparées par une analyse en composantes principales (ACP) en utilisant le logiciel R (GNU Package).

RESULTATS

1. Avant propos

Une partie de ce chapitre a fait l'objet d'une communication à des congrès internationaux.

1. **Diouf D**, Kane A, Dreyfus B, Ba AT, Sylla S, Duponnois R (2007). Investigation of the symbiotic associations of legume species and their potential for revegetation of salted area in Senegal. Poster présenté au Congrès International Rhizosphere 2, 25-31 Août 2007, Montpellier, France.

2. Analyse des caractéristiques physiques et chimiques des sols

L'analyse des données relatives aux caractéristiques physiques des sols prélevés à Ndiafate et Ngallou montre que ces sols sont essentiellement sablonneux et quel que soit l'horizon prospecté (Tableau 10). Quant aux sols de Foundiougne, ils présentent une texture limono-sablo-argileuse avec des taux équivalents en sables et argiles (d'environ 30%) quelle que soit la profondeur. Nos résultats révèlent un taux d'argile très élevé à Sarène d'environ 50% contre 24% et 21%, respectivement pour les sables et les limons.

Tableau 11 : Caractéristiques physico-chimiques des sols de Foundiougne, Ndiafate, Ngallou et Sarène

Caractéristiques	Sites									
	Foundiougne			Ndiafate			Ngallou			Sarène
	0-25	25-50	50-75	0-25	25-50	50-75	0-25	25-50	50-75	0-25
Sable (%)	32	32	34	06	72	71	82	78	82	21
Limon (%)	36	36	37	66	18	16	10	11	07	24
Argile (%)	27	31	27	28	9	12	07	10	10	50
pH	6,98	7,29	7,27	6,55	5,87	5,90	7,07	7,29	7,08	6,98
EC (mS cm ⁻¹)	1,71	1,83	2,07	0,29	0,22	0,44	0,47	0,48	0,48	0,11
C organique (%)	0,85	0,48	0,31	0,36	0,27	0,16	0,68	0,56	0,40	0,90
N total (%)	0,08	0,05	0,038	0,034	0,026	0,016	0,071	0,059	0,044	0,059
P total (mg/kg)	10	10	8	11	11	10	10	9	9	15
Teneur en ions (meq/100)										
Ca ²⁺	0,39	0,29	0,27	0,04	0,05	0,26	0,42	0,35	0,28	0,13
Cl ⁻	7,07	7,35	8,94	0,85	0,65	1,86	1,33	1,33	1,35	0,10
Mg ²⁺	0,41	0,42	0,42	0,02	0,02	0,25	0,07	0,02	0,02	0,09
Na ⁺	4,60	5,34	5,79	0,73	0,51	0,84	1,09	1,21	1,12	0,19
K ⁺	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SO ₄ ²⁻	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01	0,04	0,10	0,06	0,10	0,00

Concernant les caractéristiques chimiques, les sols sont neutres à légèrement acides avec des pH compris entre 5,9 et 7,3. Les sols de Ndiafate sont plus acides avec des valeurs de pH comprises entre 5,8 et 6,5. Les sols de Ngallou est par contre neutres. A l'exception des sols de Sarène, le rapport C/N des sols varie peu entre les différents sites (8 à 11) aux horizons 0-25 cm et 25-50 cm. Ce qui montre une bonne décomposition de la matière organique dans ces sols, contrairement au sol de Sarène ; où il est supérieur à 15. Les teneurs en phosphore total et en azote total sont globalement faibles sur les différents sites avec notamment des teneurs inversement proportionnelles à la profondeur. Les teneurs en azote total les plus élevées sont notées à Foundiougne et les plus faibles teneurs s'observent sur les sols de

Ndiafate, respectivement 0,08% et 0,03 à l'horizon de surface 0-25 cm. Les sols des sites prospectés sont des sols salins, caractérisés par la présence de sels solubles (chlorure, sulfate, calcium, magnésium et sodium) avec une dominance des ions chlorures, sodium et magnésium. La salinité des sols mesurée par la conductivité électrique a tendance à augmenter avec la profondeur. Les valeurs les plus élevées ont été notées sur le site de Foundiougne. Ce site présente, par ailleurs avec Ngallou, les plus fortes teneurs en ions, notamment Cl^- et Na^+ .

3. Evaluation de la biomasse racinaire et de la nodulation *in situ*

A l'inverse de la salinité, les biomasses racinaires et nodulaires sont inversement proportionnelles à la profondeur d'échantillonnage des sols quel que soit le site prospecté (Figure 25).

Les plus fortes valeurs ont été notées à l'horizon de surface tant pour les racines que pour les nodules. La nodulation *in situ* d'*A. seyal* ne semble pas être corrélée à la production de racines. En effet, la meilleure nodulation a été observée pour les arbres de Ndiafate ; alors que la plus importante biomasse racinaire a été notée à Foundiougne. D'ailleurs, c'est sur ce site que des racines ont été observées à plus de 50 cm de profondeur. La plus faible biomasse racinaire a été notée sur le site de Ngallou, quel que l'horizon de prospection. Les arbres du site de Sarène, malgré la nature argileuse et compacte du sol, produisent une importante biomasse racinaire. Par contre, aucune nodulation n'a été observée *in situ* sur les arbres de ce site. De même, aucun nodule n'a été observé au-delà de 25 cm de profondeur à Ngallou.

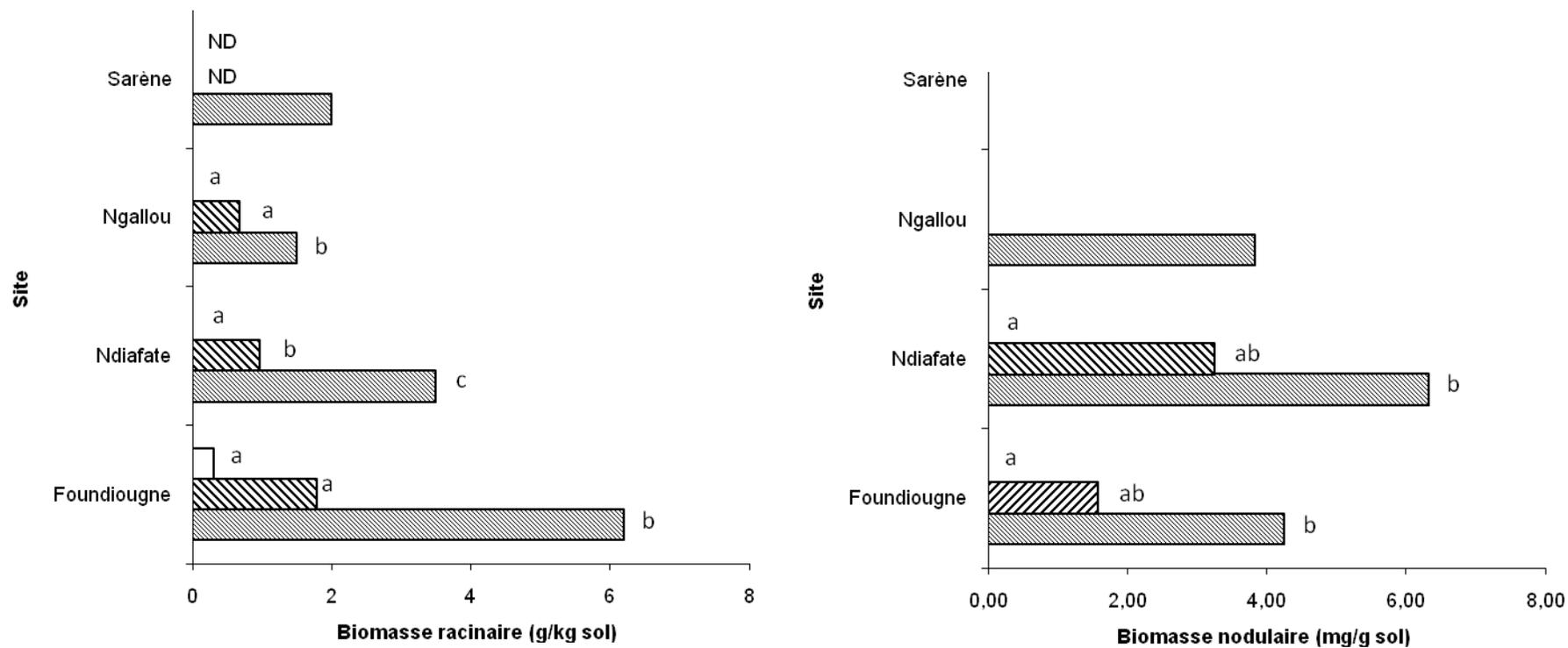


Figure 25 : Distribution des racines et des nodules en fonction de la profondeur d'échantillonnage des sols à Foundiougne, Ndiafate, Ngallou et Sarène. Les valeurs sont les moyennes de quatre arbres à raison de trois carottes plantes. Pour chaque site, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls tests ($P < 0,05$).

4. Estimation du nombre de rhizobiums nodulant *A. seyal* et de la biomasse microbienne

Quel que soit le site, le nombre de rhizobiums par gramme de sol capables de noduler *A. seyal* reste assez élevé (Tableau 11). Le nombre de bactéries nodulant *A. seyal* est inversement proportionnel à la profondeur de prélèvement des sols. Globalement, le site de Foundiougne présente le nombre de bactéries par gramme de sol à l’horizon 0-25 cm le plus faible comparativement aux sols des sites de Ndiafate, Ngallou et Sarène.

Nos résultats montrent que quel que soit le site d’étude, les valeurs de biomasse microbienne ($\mu\text{g C/g sol}$) sont inversement proportionnelles à la profondeur de prélèvement des sols. Les valeurs maximales correspondent à la couche superficielle de 25 cm de profondeur et les valeurs minimales à l’horizon 50-75 cm. Cependant, les sites présentent des variations de biomasses microbiennes, dont les valeurs varient entre 27 $\mu\text{g C/g sol}$ (à Ndiafate) et 76 $\mu\text{g C/g sol}$ (à Foundiougne). La baisse de la biomasse microbienne entre la couche superficielle (0-25 cm) et l’horizon 50-75 cm oscillent entre 38 % pour le site de Foundiougne et 57% pour les sites de Ndiafate et Ngallou.

Tableau 11 : Activités microbiennes des sols des sites de Foundiougne, Ndiafate, Ngallou et Sarène

Site	Horizon (cm)	Nombre de rhizobiums/g de sol	Biomasse Microbienne ($\mu\text{g C/g sol}$)	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ ($\mu\text{g N/g sol}$)	$\text{NO}_3^-\text{-N}$ ($\mu\text{g N/g sol}$)
Foundiougne	0-25	$50,5 \cdot 10^3$	76	2,95	1,45
	25-50	$41,1 \cdot 10^3$	58	2,08	0,00
	50-75	$14,3 \cdot 10^3$	36	2,15	0,00
Ndiafate	0-25	$25,2 \cdot 10^4$	27	1,78	0,10
	25-50	$41,1 \cdot 10^3$	14	1,65	0,00
	50-75	$54,4 \cdot 10^2$	6	0,85	0,00
Ngallou	0-25	$25,2 \cdot 10^4$	45	2,83	0,73
	25-50	$10,1 \cdot 10^4$	30	1,70	0,15
	50-75	$14,1 \cdot 10^3$	13	1,18	0,08
Sarène	0-25	$25,2 \cdot 10^4$	56	1,40	2,15

5. Variation spatiale de la minéralisation de l’azote

A l’image de la biomasse microbienne totale, le taux de minéralisation de l’azote diminue en fonction de la profondeur (Tableau 11). Quel que soit le site, le taux de minéralisation de l’azote est plus élevé à l’horizon 0-25 cm. Les plus fortes teneurs en azote minéral sont

notées à Foundiougne, quelle que soit la profondeur de prélèvement des échantillons. Il est à noter que l'essentiel de l'azote minéral est sous forme ammoniacal. A l'exception du site de Ngallou, le nitrate est limité aux couches superficielles du sol.

6. Analyse en composante principale des effets combinés des caractéristiques chimiques des sols sur leur fonctionnement microbien

La figure 26 présente la projection sur les deux premiers axes (F1 x F2) les des effets combinés des caractéristiques physico-chimiques des sols sur leur fonctionnement microbien. Ces deux axes expliquent 85 % de la variabilité totale. La première composante F1 explique la moitié de la variation et est corrélée à la conductivité électrique.

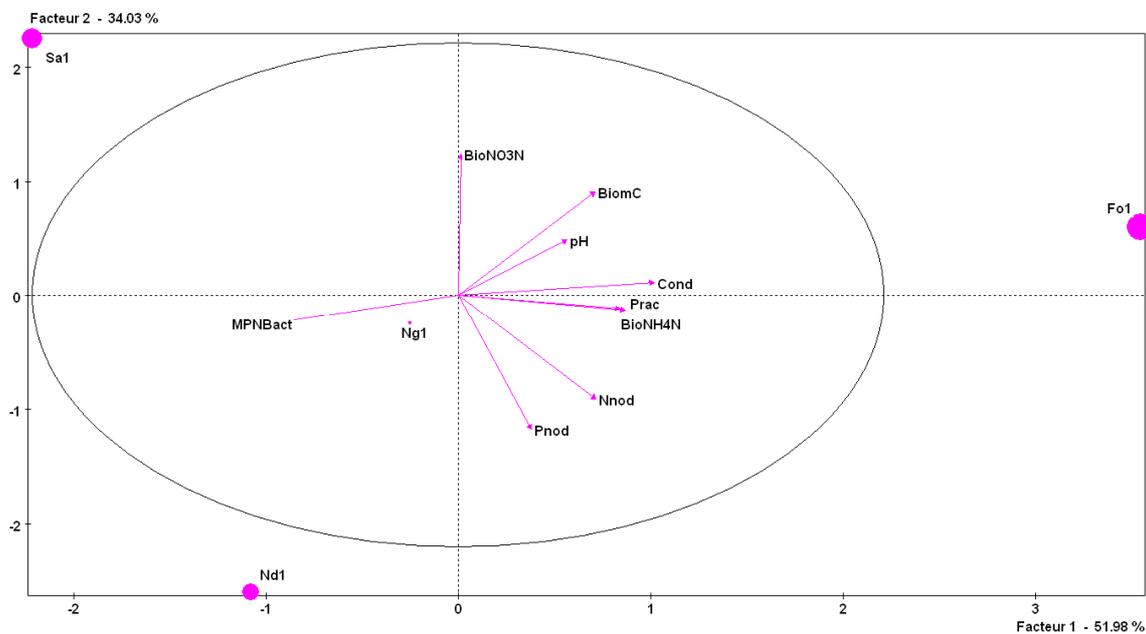


Figure 26: Projection sur les deux premières composantes principales (F1 X F2) des effets combinés des caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sols prélevés sous *A. seyal* à l'horizon de surface (0-25 cm) sur les biomasses racinaires et racinaires et les activités microbiennes. Sa1, Sarène, Nd1, Ndiagate ; Ng1, Ngallou ; Fo1, Foundiougne ; MPNBact, MPN rhizobiums ; BioNO₃N, N sous forme NO₃⁻ ; BioNH₄N, N sous forme NH₄⁺ ; BiomC, Biomasse microbienne C ; Cond, Conductivité électrique ; Prac, Biomasse racinaire ; Nnod, nombre de nodules ; Pnod, biomasse nodulaire.

Le pH des sols semble avoir peu d'influence sur la nodulation *in situ* des plantes. Par contre, l'on note une corrélation positive entre le pH et la biomasse microbienne totale et la minéralisation de l'azote sous forme ammonium. L'axe F1 permet de distinguer d'une part les sites de Foundiougne et Sarène avec des biomasses microbiennes élevées et les sites de Ngallou et Ndiagate avec une importante nodulation et un nombre élevé de rhizobium. Le

tableau 12 présente la matrice de corrélation des différentes données. L'analyse de ces résultats montre que le poids des racines ainsi que la biomasse microbienne sont positivement corrélés à la salinité du sol déterminée par la conductivité électrique ; alors que le nombre de rhizobiums capables de noduler *A. seyal* est négativement corrélé à la conductivité électrique. Paradoxalement, la salinité des sols est positivement corrélée à la biomasse racinaire, à la biomasse microbienne totale et à la minéralisation de l'azote sous forme ammonium. Il ressort de cette analyse que le nombre et le poids de nodules sont négativement corrélés à la teneur en nitrate du sol. Le pH a peu d'influence sur les paramètres biologiques des sols, à l'exception de la biomasse microbienne totale et la minéralisation de l'azote sous forme ammonium sont positivement corrélées au pH.

Tableau 12 : Matrice de corrélation des caractéristiques chimiques et biologiques des sols de tous les sites confondus

	Prac	Nnod	Pnod	MPNBact	BiomC	BioNH4N	BioNO3N	pH	Cond
Prac	1,00								
Nnod	0,69	1,00							
Pnod	0,40	0,92	1,00						
MPNBact	-0,92	-0,53	-0,16	1,00					
BiomC	0,56	-0,02	-0,41	-0,82	1,00				
BioNH4N	0,41	0,61	0,39	-0,62	0,45	1,00			
BioNO3N	0,02	-0,68	-0,91	-0,26	0,73	-0,19	1,00		
pH	0,04	0,07	-0,15	-0,41	0,59	0,83	0,24	1,00	
Cond	0,88	0,63	0,28	-0,98	0,76	0,76	0,12	0,52	1,00

MPNBact, MPN rhizobiums ; BioNO3N, N sous forme NO_3^- ; BioNH4N, N sous forme NH_4^+ ; BiomC, Biomasse microbienne C ; Cond, Conductivité électrique ; Prac, Biomasse racinaire ; Nnod, nombre de nodules ; Pnod, biomasse nodulaire.

7. Diversité fonctionnelle des communautés microbiennes des sols

L'évaluation de la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes des sols par la détermination du Profil de Réponse Catabolique (CRP) après ajout de 25 substrats individuels permet de se rendre compte de la variabilité dans l'activité métabolique des microorganismes des sols des différents sites. La diversité de réaction catabolique enregistrée en présence des différents substrats permet ainsi d'établir le profil de réponse catabolique des sols (Figure 27). Il est alors possible de distinguer les sols qui influencent la quantité de CO_2 dégagé suite à l'apport de chaque substrat.

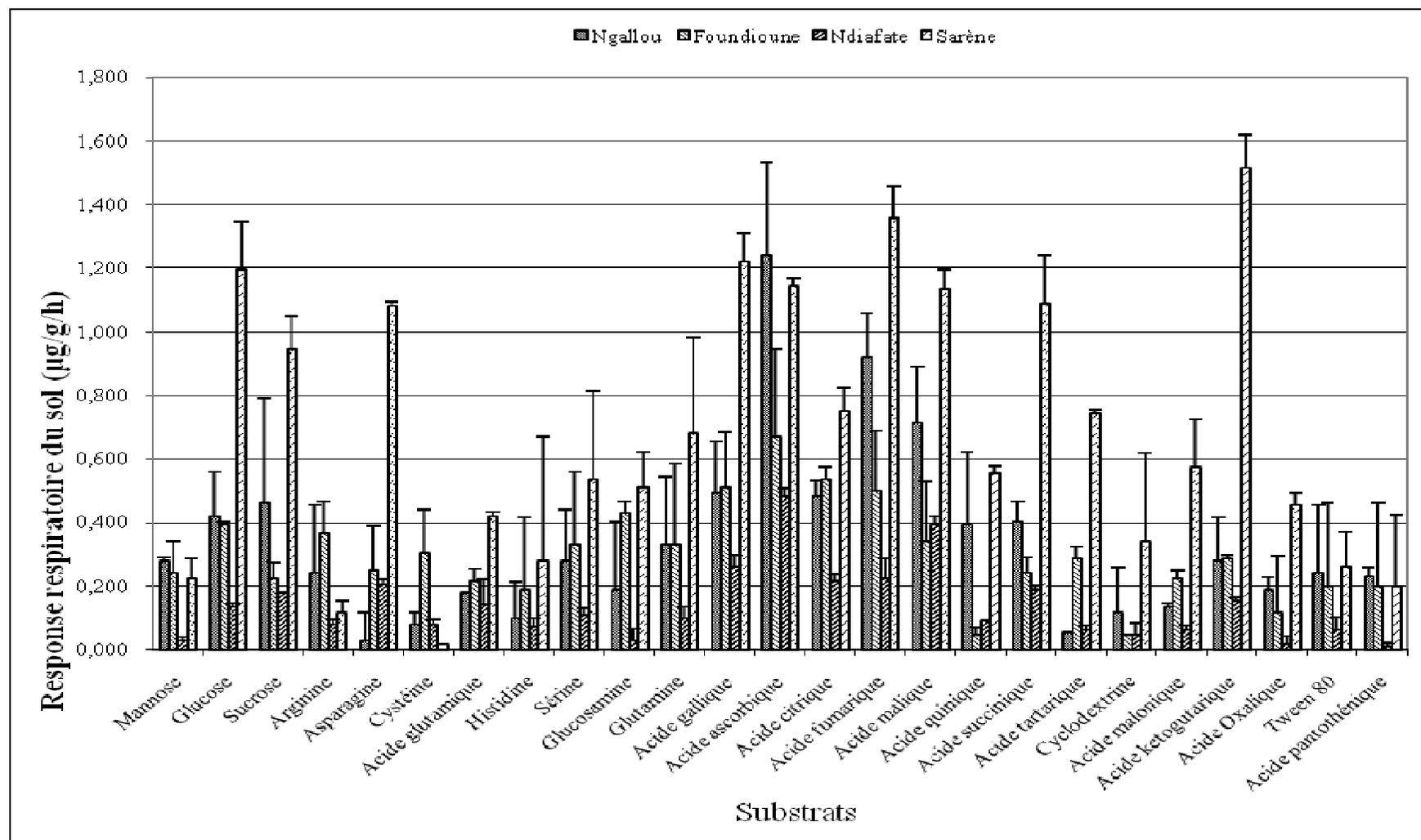


Figure 27 : Réponse catabolique des sols des différents sites par suite de l'addition des substrats individuels. Les résultats de diversité catabolique présentés sont les moyennes arithmétiques de trois répétitions.

Les sols de Sarène présentent de valeurs des quantités moyennes de CO₂ dégagé plus élevées par rapport aux autres sols, quel que soit le substrat ajouté. Ce résultat serait lié aux propriétés physiques et chimiques des sols de ce site très différentes de celles des autres sols. Pour les sols de Foundiougne et de Ngallou, les quantités moyennes de CO₂ dégagé ne sont pas très différentes entre ces deux sites. Par contre, quel que soit le substrat ajouté, les sols du site de Ndiafate présente les valeurs moyennes de CO₂ dégagé les plus faibles.

La figure 28 compare les valeurs moyennes de CO₂ dégagé par groupe de substrats et pour les 4 sites (Foundiougne, Ndiafate, Ngallou et Sarène). Les acides carboxyliques (acide citrique, acide fumarique, acide malique, acide ascorbique) et l'acide gallique sont les substrats les mieux métabolisés pour tous les sites confondus. Pour les hydrates de carbone, les acides carboxyliques et les polymères, les dégagements moyens de CO₂ des sols de Ngallou sont supérieurs à ceux des deux autres sols. Alors que pour les acides aminés, les amines et les acides aromatiques les valeurs moyennes de CO₂ dégagé sont globalement plus élevées pour les sols du site de Foundiougne.

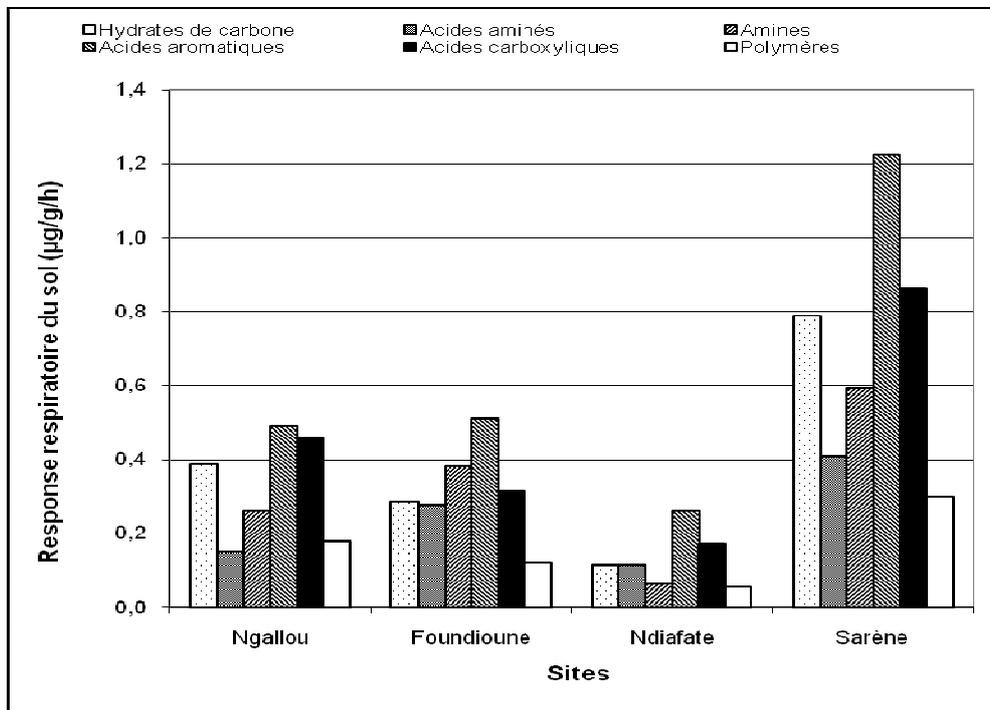


Figure 28 : Dégagement moyen de CO₂ par groupe de substrats et par site. hydrates de carbone (D-glucose, D-mannose, saccharose) ; amines (D-glucosamine, L-glutamine) ; acides aminés (L-asparagine, L-sérine, L-histidine, L-arginine, L-acide glutamique, L-cystéine) ; acides carboxyliques (acide citrique, acide fumarique, acide malique, acide ascorbique, acide malonique, acide quinique, acide succinique, acide tartrique, acide kéto glutarique, acide oxalique et acide pantothénique) ; acide aromatique (acide gallique) et polymères (Tween 80 et Cyclodextrine).

DISCUSSION

1. Analyse des effets combinés des caractéristiques physico-chimiques des sols sur leur fonctionnement microbien et biologique

Nos résultats montrent que les valeurs de pH ont peu d'influence sur les activités microbiennes. En effet, les valeurs de pH des sols des différents sites sont proches de la neutralité à légèrement acides et semblent compatibles avec la survie des microorganismes et les activités microbiennes du sol. Ces données pourraient d'ailleurs expliquer la relative importance du nombre de bactéries nodulant *A. seyal* en particulier à l'horizon de surface 0-25 cm. Par contre, ce nombre est inversement proportionnel à la profondeur d'échantillonnage des sols. La même tendance a été notée pour la biomasse microbienne totale des sols et les biomasses racinaire et nodulaire qui diminuent avec la profondeur d'échantillonnage. Nos résultats confirment ainsi ceux obtenus par des études antérieures (Fall et al. 2010; Faye et al. 2007; Raubuch and Beese 2005). Ces auteurs ont montré une diminution de la biomasse microbienne en fonction de la profondeur mais également de la distance par rapport au tronc de plusieurs espèces végétales. Cette variation spatiale de la biomasse microbienne des sols pourrait être corrélée à la quantité de matière organique généralement plus abondante dans la couche superficielle du sol et au voisinage du tronc de l'arbre. Bodelier et al. (1997) estiment que les microorganismes présents dans le sol rhizosphérique sont de loin plus nombreux que dans le sol hors d'influence de la plante. Le nombre de ces microorganismes dépend en particulier de la composition et la concentration des exsudats racinaires (Grego et al. 2003). Ainsi, ces derniers peuvent influencer l'abondance et les activités des populations microbiennes telluriques. Nous avons observé une corrélation positive entre la biomasse racinaire, la biomasse microbienne totale et la nodulation. Par contre, la minéralisation de l'azote sous forme nitrate, contrairement à l'azote ammoniacal, est négativement corrélée à la nodulation. Ce résultat est à lier au rôle dépressif du nitrate sur la nodulation. L'azote sous forme nitrate est un inhibiteur majeur de la symbiose fixatrice d'azote chez les légumineuses. Cependant, bien que cette inhibition ait été étudiée depuis de nombreuses années, aucun consensus n'a encore été établi sur les interactions spécifiques et quantitatives entre les apports de nitrate et d'ammonium sur la fixation de N₂ (Gan et al. 2004). Malgré la forte hétérogénéité entre les sites tant pour la

production de racines que pour la nodulation *in situ*. Il est à noter que le système racinaire d'*A. seyal* prolifère essentiellement (plus de 70% de la biomasse racinaire) à l'horizon de surface 0-25 cm. Pour les sites de Ndiagate et Ngallou bien qu'étant essentiellement sablonneux, donc potentiellement sans réel problème de pénétration profonde des racines dans le sol, aucune racine n'a été trouvée au delà de 50 cm de profondeur. Cette particularité serait intrinsèque à l'espèce *A. seyal* et ne serait pas en rapport avec les caractéristiques du sol notamment la salinité et/ou le pH du sol. En effet, la fonction du système racinaire est génétiquement déterminée, tant que les conditions environnementales sont favorables. Dans des conditions de milieu défavorables cependant, ce sont les conditions physiques qui prévalent (Kummerow and Mangan 1981). Dans notre étude, même si la salinité a tendance à augmenter avec la profondeur sur le site de Foundiougne, ce n'est pas le cas pour les sites de Ndiagate et Ngallou dont le niveau de salinité est relativement faible et constant entre la surface et l'horizon 50-75 cm. D'ailleurs, les arbres du site de Foundiougne, qui présente le taux de salinité le plus élevé, sont les seuls à produire des racines au delà de 50 cm de profondeur. *A. seyal* fait partie des plantes ligneuses des régions arides à pénétration profonde des racines primaires et fortes ramifications secondaires superficielles (Menaut 1983). Il semble que les plantes des habitats peu fertiles maximisent l'absorption et le stockage des nutriments au travers d'un coefficient biomasse racinaire / biomasse aérienne plus élevé, de même que par mycorhization, plutôt qu'en augmentant la capacité d'absorption de leurs racines (Chapin 1980). Selon Vestberg et al. (2005), la présence des champignons mycorhiziens s'accompagne d'une diversification de l'activité microbienne du sol avec pour corollaires un effet sur la minéralisation des substrats carbonés et un impact positif sur la qualité chimique des sols. Ces observations justifient l'apport d'un inoculum mycorhizien ne serait-ce que dans les étapes précoces de la croissance de la plante.

2. Analyse de la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes des sols

L'activité fonctionnelle des microorganismes rhizosphériques (bactéries, actinomycètes ou champignons) inclue une large gamme de fonctions telles que la décomposition de la matière organique, la mobilisation des nutriments minéraux, la fixation symbiotique de l'azote, la promotion ou l'inhibition de la croissance des plantes et divers autres processus

physiques (Degens et al. 2000). Ainsi, la diversité fonctionnelle microbienne du sol est importante pour le maintien de nombreux processus dans le sol (Hart et al. 2003). Il est généralement admis que la réduction de la diversité microbienne est associée à une réduction des capacités métaboliques (Giller et al. 1997). Cette diversité fonctionnelle a été analysée par la mesure du Profile de Réponse Catabolique (CRP) (Degens and Harris 1997) de l'horizon de surface 0-25 cm des sols des différents sites. Nos résultats présentés plus haut montrent que cet horizon concentre l'essentiel des activités microbiennes du sol. Le CRP reflète la composition en carbone organique du sol (Degens 1998). Le CO₂ dégagé représente le stade final de l'oxydation des substrats organiques disponibles dans le sol. Ainsi, une baisse du CO₂ dégagé traduit une faible disponibilité en carbone organique du sol (Degens 1998; Degens et al. 2000).

Nos résultats montrent une importante variabilité dans l'activité métabolique des microorganismes des sols des différents sites. Cependant, nos observations confirment que le CRP est positivement corrélé au pool de carbone organique du sol (Degens et al. 2000). La quantité cumulée de CO₂ dégagé au niveau des sols de Sarène est nettement plus importante que celle des sols des autres sites. Ce site présente par ailleurs la plus forte teneur en C organique. Alors que la plus faible quantité de CO₂ dégagé a été notée sur les sols du site de Ndiagate qui présentent également la plus faible teneur en C organique. Ces observations confirment les résultats obtenus plus haut qui distinguent nettement le site de Sarène des autres sites (Figure 28).

Nos résultats montrent cependant que le CRP ne varie pas de la même manière que la teneur en C organique entre les sites de Foundiougne et Sarène. Ce résultat laisse penser que le CRP dépend plus de la nature des substrats organiques, c'est à dire de la disponibilité en substrats carbonés facilement utilisables par les microorganismes du sol (Teklay et al. 2006). Nous avons noté une importante variation dans l'utilisation des différents substrats en fonction des sites. Les acides aromatiques, les acides carboxyliques et les hydrates de carbone sont dans l'ordre décroissant les substrats les mieux métabolisés. Alors que les acides aminés et les polymères sont les substrats les moins métabolisés par les communautés microbiennes des sols quel que soit le site.

A l'exception du site de Sarène, les valeurs de CRP obtenues dans notre étude sont faibles comparativement aux résultats signalés par d'autres études (Dabire et al. 2007; Sall et al. 2006). Ces observations pourraient s'expliquer par la pauvreté en nutriments des sols. En effet, nos sols sont très pauvres en N et P. D'après Boyer (1982), un sol est pauvre en azote si le taux est inférieur à 0,075% ; moyennement riche s'il est compris entre 0,075% et 0,125% et enfin riche s'il est supérieur à 0,125%. Certains auteurs ont montré que la pauvreté en nutriments du sol peut limiter significativement l'activité fonctionnelle dans le sol (Graham and Haynes 2005; Sall et al. 2006; Wardle et al. 2006). Ces résultats confirment notre hypothèse sur l'influence des facteurs physiques et chimiques du milieu sur la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes du sol. Nous n'avons cependant pas pu établir une corrélation entre la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes et les taux de salinité et les valeurs de pH des sols. Les plus faibles valeurs de CRP ont été notées sur le site de Ndiafate qui présente les niveaux de salinité les plus faibles, à l'exception du site de Sarène situé en zone non salée. Ce site de Ndiafate présente des valeurs de pH légèrement acides. Cependant, ces valeurs de pH sont compatibles avec les activités microbiennes, en particulier le développement de champignons à vésicules et arbuscules notamment les Glomales. Trappe et al. (1984) ont en effet montré que la germination et la croissance de *Glomus* sont optimales à pH compris entre 4 et 6. Or des études de diversité moléculaire des champignons mycorhiziens associés à *A. seyal* en zone semi-aride du Sénégal ont montré que les espèces du genre *Glomus* correspondent aux espèces dominantes dans les racines d'*A. seyal* (Manga et al. 2007). Ainsi, le flux de nutriments qui accompagne l'établissement et le maintien des certaines activités microbiennes du sol notamment les symbioses mycorhizienne et rhizobienne pourraient contribuer à l'activation des microorganismes indigènes du sol. Ce site présente la meilleure nodulation *in situ*. Une évaluation du taux d'azote fixé *in situ*, notamment par des méthodes isotopiques, permettrait d'apprécier l'efficacité de cette symbiose.

CHAPITRE IV : REPONSES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DES PLANTS D'*ACACIA SEYAL* DEL. SOUS CONTRAINTE SALINE

INTRODUCTION

Dans des environnements salins, l'adaptation des plantes à la salinité pendant la germination et les premiers stades de développement des plantules est cruciale pour l'établissement des espèces (Debez et al. 2004; Vicente et al. 2004). En effet, les plantes sont plus vulnérables à ce stade de leur cycle de vie. La germination des espèces halophiles en fonction des paramètres environnementaux détermine leur distribution dans des environnements salins (Kigel 1995; Tobe et al. 2000). Ainsi, l'étude de l'effet des concentrations de NaCl sur la germination est un test de laboratoire utile et rapide pour évaluer la tolérance au sel des espèces végétales.

La plupart des études sur le stress salin ont été réalisées sur les plantes annuelles et ont montré que le stress salin se traduit par une grande diversité de changements physiologiques et biochimiques des plantes (Al-Karaki 2001; Lambers 2003). Il affecte la germination, la croissance et le métabolisme des plantes (Munns 1993). De même, il affecte la nodulation (Cordovilla et al. 1999a), la symbiose rhizobiums/légumineuses (Serraj 2002; Zahran 1999) et la photosynthèse (Silveira et al. 2003). Plusieurs études ont montré que l'excès de sel dans le sol réduit la disponibilité de l'eau, inhibe les processus métaboliques des plantes. Il affecte leur teneur en nutriments (Menge and Kirkby 1982; Munns 1993; Serraj 2002), modifie l'équilibre osmotique et la conductivité hydraulique, entraînant un retard de croissance et une faible productivité (Al-Karaki 2001; Apse et al. 1999). Les solutions aux problèmes de la salinité et de l'alcalinité comprennent à la fois l'amélioration de la tolérance des plantes au sel et à l'application de facteurs biologiques tels que la remise en état des sols salins avec des espèces d'arbres à usages multiples tels que les *Acacia* spp., modérément tolérantes au sel (Giri et al. 2003; Zahran 1999). Ces espèces ont développé des mécanismes d'adaptations pour faire face aux carences nutritionnelles et autres contraintes (Doran and Turnbull 1997). Elles sont potentiellement utiles pour des applications écologiques, tels que l'aménagement paysager ou la réhabilitation des écosystèmes dégradés (Midgley and Bond 2001; Zahran 2001). L'augmentation de la superficie de

plantations d'arbres est un enjeu essentiel pour réhabiliter les écosystèmes comme les terres affectées par le sel. Les niveaux de tolérance au sel sont variables pour les deux partenaires *Acacia* spp. et les symbiotes microbiens ; par conséquent, la sélection pour la tolérance au sel de chaque partenaire (plante hôte et les symbiotes) est une stratégie appropriée pour l'établissement d'arbres dans les environnements salins. Il a été signalé que les rhizobiums associés aux *Acacia* spp. sahéliens ont une tolérance plus élevée au sel que leur plante hôte (Fall et al. 2008; Odee et al. 1997; Zhang et al. 1991).

Acacia seyal (Del.), est largement répandu dans les steppes côtières affectées par le sel, où la conductivité électrique (CE), dominée par des ions de chlorure de sodium, est comprise entre 8 et 130 dS/m (Barbiero et al. 2004). Toutefois, peu d'informations sont disponibles sur le niveau de tolérance au sel d'*A. seyal*. Des effets indésirables de NaCl ont été signalés sur la germination des semences de certains acacias Africains (Ndour and Danthu 1998). Parmi les espèces d'*Acacia* testées, ces auteurs considèrent *A. seyal* et *A. raddiana* comme les espèces les plus tolérantes.

Cette étude a été entreprise pour déterminer les effets de la salinité sur la germination des graines d'*A. seyal* ; mais aussi la croissance, la nodulation et l'assimilation de carbone et de l'azote de plants d'*A. seyal*. Cette étude s'inscrit dans une perspective de contribuer aux initiatives en cours au Sénégal pour trouver des espèces appropriées pour la plantation dans les zones touchées par le sel. La croissance des plants, les activités glutamine synthétase (GS) et phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), ainsi que les teneurs en protéines solubles et en chlorophylles ont été évaluées, comme des indicateurs utiles de la performance des plants en conditions de stress salin.

MATERIEL ET METHODES

1. Effet du sel (NaCl) sur la germination des graines

Les graines d'*Acacia bivenosa* DC. Prod., d'*Acacia sclerosperma* F. Muell. et d'*A. seyal* ont été fournies par l'ISRA/CNRF. Les espèces d'*A. bivenosa* et d'*A. sclerosperma* ont été choisies comme référence dans cette étude en raison de leur tolérance éprouvée au sel à différents stades de croissance et dans divers environnements (Aswathappa et al. 1987). Les graines de toutes les espèces étudiées ont été scarifiées et désinfectées superficiellement par trempage dans de l'acide sulfurique concentré à 95 % (v/v) pendant 30 min (*A. bivenosa* et *A. seyal*) et 60 min (*A. sclerosperma*). Vingt cinq (25) graines ont été prégermées comme décrit précédemment. Cinq concentrations de chlorure de sodium (NaCl) ont été testés : 0, 5, 10, 15, et 20 g/l (équivalentes à 0, 86, 171, 257 et 342 mM NaCl). L'expérience a été réalisée en trois répétitions par traitement du sel. La cinétique de germination a été suivie pendant 10 jours par le dénombrement quotidien des graines ayant germé. Le critère utilisé pour désigner une graine germée est la percée radriculaire. Le taux de germination d'une espèce pour une dose de NaCl donnée a été exprimé en pourcentage moyen de germination, calculé à partir du rapport du cumul des graines germées au dixième jour de comptage sur le nombre total de graines dans l'échantillon.

2. Effet du sel (NaCl) sur la croissance des espèces

Les graines préparées comme décrit dans le paragraphe précédent, ont été disposées stérilement sous une hotte à flux laminaire sur des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée (0,9 %). Ces boîtes, scellées au parafilm, ont été placées à l'étuve à 37 °C pendant 48 h pour la germination. La culture des plants et les tests de nodulation ont été effectués en utilisant la méthode de Gibson (Gibson 1980) sur des tubes (150 x 20 mm) contenant 30 ml de milieu nutritif de Jensen modifié dépourvu d'azote (Vincent 1970), contenant du NaCl à 0, 43, 86, 128, 171, 214, 256 et 342 mM (soit 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15 et 20 g/l). Une semaine après repiquage, la hauteur des plants et la longueur de la racine principale ont été mesurées. Le nombre de feuilles a été compté. Ces mesures ont été répétées toutes les semaines jusqu'à la fin de l'expérience qui a duré 4 semaines.

3. Influence du NaCl sur la croissance des rhizobiums en milieu liquide

Les 7 souches de rhizobiums utilisées ont été isolées à partir des nodules obtenus par piégeage sur des racines d'*A. seyal*. Elles appartiennent à deux groupes électrophorétiques différents : groupe I (3356, 3399 et 3403) et groupe III (3328, 3394, 3401 et 3402) (voir chapitre I).

L'expérience a été réalisée sur milieu YEM avec des teneurs croissantes en NaCl : 0, 171, 342 et 513 mM soit respectivement 0, 10, 20 et 30 g/l. Le milieu a été réparti dans des tubes à essai à raison de 5 ml par tube puis stérilisé à 120 °C pendant 20 min. Une pré-culture des souches a été effectuée et les densités optiques ont été mesurées avant l'inoculation des tubes pour la culture. Les tubes ont été incubés à 28 °C pendant 4 jours dans une chambre de culture bactérienne. La croissance bactérienne a été suivie par mesure de la densité optique au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm.

4. Effet du sel (NaCl) sur la symbiose *A. seyal*-rhizobium

Les graines d'*A. seyal* ont été prégermées comme indiqué ci-dessus. Les plants ont été transférés en conditions stériles (un plant par tube) en tube Gibson 150 x 20 mm (Gibson 1963) contenant un milieu nutritif Jensen stérile dépourvu d'azote ajusté à un pH 7 (Vincent 1970). Sur la base des résultats de la germination des graines, quatre concentrations de NaCl ont été testées pour cette expérience : 0, 86, 171 et 257 mM. Pour chaque concentration de NaCl, les germinations (n = 24) ont été maintenues dans une chambre de culture dans les conditions décrites plus haut.

Après une semaine de culture, les plants ont été inoculés avec deux souches *Mesorhizobium* sp. ORS 3394 et ORS 3403, isolées de nodules de racines d'*A. seyal* et phylogénétiquement proche de *Mesorhizobium plurifarum*. Les numéros d'accession dans GenBank de leurs séquences IGS 16S-23S sont respectivement FJ848985 et FJ848986. Les deux souches sélectionnées ont un comportement différent vis-à-vis du sel. La souche ORS 3403 (groupe IGS I) est plus résistante au sel que la souche ORS 3394 (groupe IGS III). Des cultures bactériennes sur milieu liquide à base d'extrait de levure et de mannitol (*Yeast Extract Mannitol*, YEM) (Vincent 1970) ont été réalisées pour l'inoculation. Ensuite les suspensions bactériennes ont été diluées de manière à obtenir la même DO. Les plants ont été inoculés

avec 1 ml de suspension de la souche ORS 3394 ou ORS 3403, avec environ 10^9 cellules/ml, ou 1 ml milieu YEM sans bactéries pour les témoins. Pour ce qui est de la double inoculation (les deux souches), les plants ont reçu 0,5 ml de chaque suspension. Vingt répétitions ont été effectuées pour chaque souche de rhizobium et vingt plants non inoculés ont servi comme témoins. L'effectivité de ces rhizobiums a été déterminée par la mesure du nombre de nodules et de la hauteur des plants.

Quarante jours après l'inoculation, les plants ont été échantillonnés et analysés pour les paramètres définis ci-dessous. La croissance a été évaluée en mesurant la hauteur des pousses. L'effet du traitement du sel sur l'infection par Rhizobium a été évalué par comptage du nombre de nodules par plant.

5. Procédure analytique

Les feuilles, les racines et les nodules ont été pesées, congelées dans de l'azote liquide et conservées à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'analyse. Pour les dosages de protéines solubles et des activités phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31) et glutamine synthétase (GS, EC 6.3.1.2), l'extraction a été réalisée à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Des échantillons de tissus ont été broyés à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans un tampon d'extraction (4 ml/g) contenant 25 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14 mM β -mercapto-éthanol, 500 mM EDTA et 1% (p/v) polyvinyl pyrrolidone (PVP 10) hydrosoluble. Le mélange a été centrifugé à $15\ 000\ \text{g}$ à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 20 min dans une centrifugeuse (modèle 3K15, SIGMA, Osterode am Harz, Allemagne). Le surnageant résultant a été utilisé pour les dosages des protéines solubles et des activités enzymatiques. L'extraction a été réalisée en double et les mesures ont été effectuées en triple répétition. Les activités enzymatiques ont été analysées par spectrophotométrie UV-visible (Modèle Ultrospec, Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, USA).

L'activité GS a été dosée par colorimétrie par la réaction de biosynthèse γ -glutamylhydroxamate (O'Neal and Joy 1973). Les composants du mélange réactionnel modifié étaient L-glutamate, 80 mM; NH_2OH , 6 mM ; MgCl_2 , 20 mM ; EDTA, 4 mM et l'ATP, 8 mM. L'absorbance du surnageant a été mesurée à une longueur d'onde de 540 nm après au moins 30 min d'incubation à $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. L'activité GS a été exprimée en $\mu\text{mol } \gamma$ -Glutamylhydroxamate (GGH)/h/g de matière fraîche.

L'activité PEPC (EC 4.1.1.31) a été dosée comme une source potentielle de malate. L'activité PEPC *in vitro* a été analysée par l'oxydation à 30 °C pendant 30 min de la nicotinamide adénine dinucléotide hydrogénase (NADH) par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 340 nm selon la méthode décrite par Nato et Mathieu (1978). Dans un volume final de 1 ml, le mélange réactionnel (pH 7,6) contient 15 mM Tris-HCl ; 0,125 mM de NaHCO₃ ; 0,025 mM NADH. La réaction a été lancée par l'ajout de 0,312 mM Phosphoénol-pyruvate (PEP). L'activité PEPC a été exprimée en mmol NADH/h/g de matière fraîche.

Les protéines solubles des différents extraits ont été dosées en spectrophotométrie par la méthode de Bradford (1976) par coloration des protéines par le bleu de Coomassie G-250 en utilisant le sérum albumine de bœuf (BSA) comme protéine standard (Merck, fraction V). Les échantillons ont été incubés pendant 15 à 20 min et la teneur en protéines solubles a été exprimée en mg/g de poids de matière fraîche.

La procédure pour la détermination de la chlorophylle était basée sur l'absorption de la lumière des extraits de chlorophylle (Arnon 1949). Les feuilles ont été broyées dans un mélange acétone/eau (80/20, v/v). Après centrifugation à 10000 g à 4 °C pendant 10 min, le surnageant obtenu a été utilisé pour le dosage de la teneur en chlorophylle. Les concentrations en chlorophylle totale (chlorophylle a et b) ont été déterminées en mesurant au spectrophotomètre l'absorbance des chlorophylles a et b dans un mélange acétone/eau (80%, v/v) aux longueurs d'onde 663 nm et 645 nm, respectivement en référence à un blanc constitué d'un mélange acétone/eau. La concentration en chlorophylle totale a été exprimée en mg/g de matière fraîche en utilisant les valeurs d'absorbance (A_{663} et A_{645}) aux longueurs d'onde 663 nm et 645 nm et les coefficients d'absorption spécifique pour les chlorophylles a et b, respectivement selon l'équation suivante :

$$C = ((20,2 (A_{645}) + 8,02 (A_{663})) \times V/M)$$

V et M désignent le volume d'extraction (l) et le poids de matière fraîche (mg) de feuilles broyées.

6. Analyses statistiques des données

Les données métriques des plants ainsi que le nombre de nodules ont été traitées à l'aide du logiciel SuperANOVA™ (Abacus Concepts, Berkeley, Inc, en Californie, 1989). Les moyennes obtenues ont été comparées sur la base du test Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

RESULTATS

1. Avant propos

Une partie de ce chapitre a fait l'objet de d'un article et d'une communication à des congrès internationaux.

1. Fall D, **Diouf D**, Diouf O, Neyra M, Diallo N (2009). Physiological and biochemical responses of *Acacia seyal* (Del.) seedlings under salt stress conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 32: 1122-1136. URL : <http://dx.doi.org/10.1080/01904160902943155>. (**Impact Factor 2009 : 0.512**).
2. Fall D, **Diouf D**, Neyra M, Diouf O, Diallo N (2004). Effet du sel (NaCl) sur la germination, la croissance, la nodulation et le métabolisme azoté et carboné chez *Acacia seyal* (Del.). Poster présenté au 11^e Congrès International de l'Association Africaine pour la fixation Biologique de l'Azote, 22-27 Novembre 2004, Dakar, Sénégal.

2. Effet du NaCl sur la germination des graines

Le taux de germination des graines varie selon la concentration de sel et l'espèce d'*Acacia* testée (Tableau 13). Le taux de germination des graines d'*A. seyal* diminue graduellement avec l'augmentation du stress salin. L'augmentation de la salinité de 0 à 85 mM de NaCl réduit le taux de germination d'*A. seyal* de 14%. En présence de NaCl à 171 mM, les meilleurs taux de germination ont été notés pour les espèces *A. bivenosa* (100%) et *A. seyal* (64%). Les graines d'*A. sclerosperma* présentent le plus faible taux de germination (32%). Avec des doses élevées de sel (256 mM et 342 mM NaCl), les graines d'*A. seyal* présentent un excellent taux de germination, meilleur que celui des espèces d'*A. bivenosa* et d'*A. sclerosperma*. Sur le milieu de culture contenant 342 mM NaCl, les graines d'*A. seyal* maintiennent un taux de germination élevé (44%). En revanche, aucune germination n'a été enregistrée pour les graines des autres espèces d'*Acacia*.

Tableau 13 : Effet de NaCl sur le taux de germination (%) de graines d'*Acacia bivenosa*, *A. sclerosperma* et *A. seyal*. Pour chaque concentration de NaCl, le taux de germination moyen de chaque espèce est calculé à partir du nombre cumulé de graines germées au bout de 10 jours sur eau gélosée (0,8%, p/v) contenant les concentrations en NaCl indiquées (0, 85, 171, 256, et 342 mM) rapporté au nombre total de graines mises à germer.

NaCl (mM)	Species		
	<i>Acacia bivenosa</i>	<i>A. sclerosperma</i>	<i>A. seyal</i>
0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0
85	100 ± 0,0	100 ± 0,0	86 ± 6,0
171	100 ± 0,0	32 ± 7,8	64 ± 3,2
256	18 ± 4,3	04 ± 2,0	46 ± 3,0
342	00 ± 0,0	00 ± 0,0	44 ± 3,5

Les valeurs sont des moyennes avec une erreur standard de la moyenne (n = 75).

3. Effet du sel (NaCl) sur la croissance *in vitro* des espèces d'*Acacia* spp.

L'influence du stress salin sur la croissance (hauteur des tiges et longueur du pivot) a été étudiée sur des plants d'*A. seyal*, d'*A. bivenosa* et d'*A. sclerosperma* cultivés en tubes Gibson pendant 4 semaines (Figure 29). Dans nos conditions de culture, quelle que soit l'espèce, la croissance des plants est inversement proportionnelle à la dose de NaCl appliquée. Quelle que soit la concentration en sel du milieu de culture, les plants d'*A. seyal* présentent la meilleure croissance. La hauteur maximale des tiges est obtenue avec ces mêmes plants d'*A. seyal*. Les stress compris entre 0 et 86 mM n'affectent pas la hauteur de la tige : 23 %, 20% et 18% de réduction par rapport aux témoins cultivés sans sel chez respectivement *A. seyal*, *A. bivenosa* et *A. sclerosperma* à 86 mM. Par contre, à 342 mM, la réduction de la hauteur

est plus marquée avec 37%, 43% et 58% de réduction respectivement pour *A. sclerosperma*, *A. bivenosa* et *A. seyal*.

Des tendances similaires de réduction de la longueur de la racine principale ont été notées pour les différentes espèces testées (données non présentées). Quelle que soit l'espèce, le système racinaire des plants est plus développé que la partie aérienne. Contrairement aux parties aériennes ; en présence ou non de NaCl, le système racinaire des plants d'*A. seyal* est moins développé que celui des deux autres espèces.

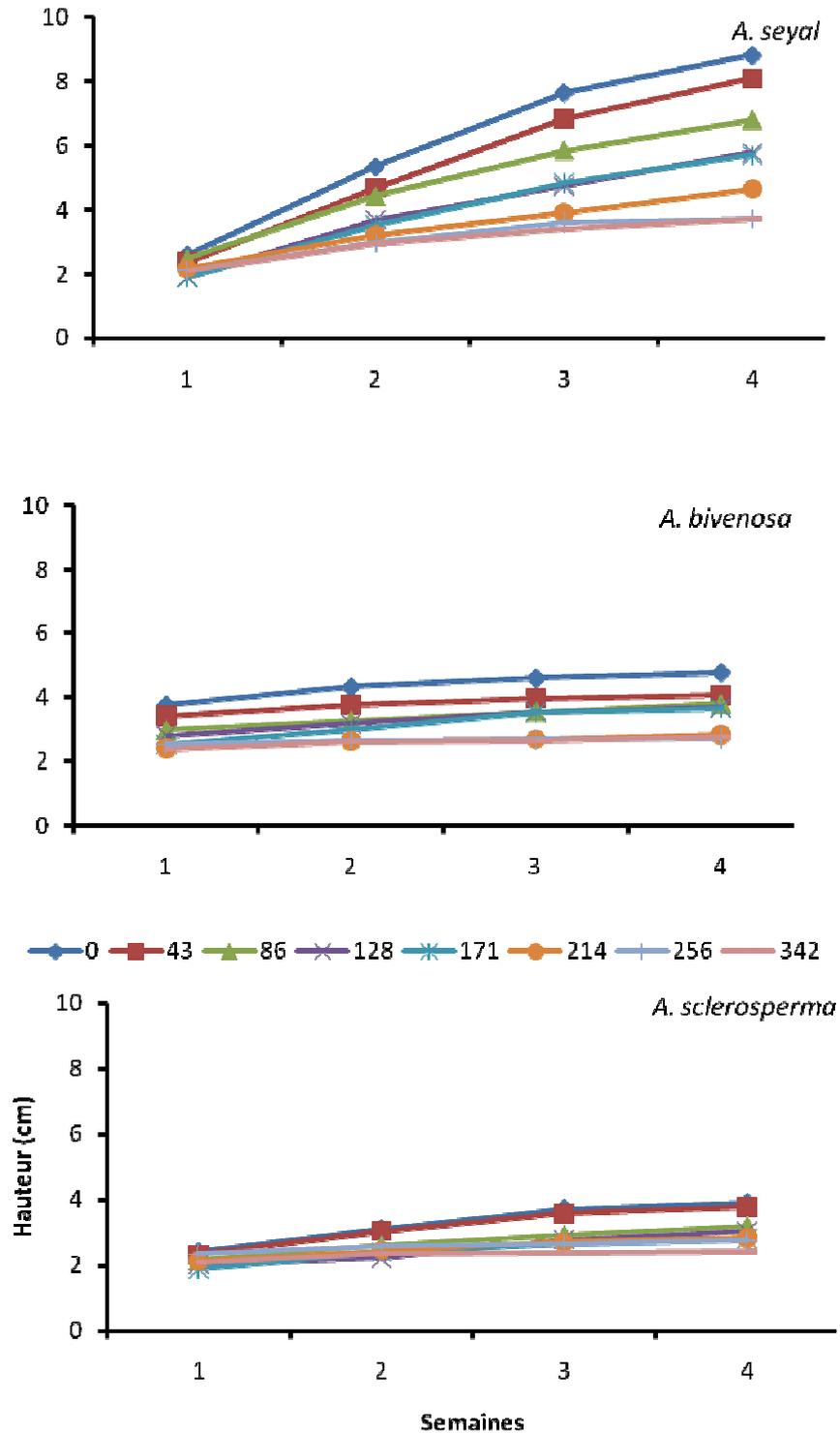


Figure 29 : Effet du sel (NaCl) à différentes concentrations (0, 43, 86, 128, 171, 214, 256 et 342 mM) sur la hauteur des tiges principales des plants d'*A. seyal*, d'*A. bivenosa* et d'*A. sclerosperma* cultivés en tubes Gibson pendant 4 semaines.

Une évolution positive du nombre de feuilles a été notée chez toutes les espèces au cours du temps pour toutes les doses de sel. Comme pour les parties aériennes, le plus grand nombre de feuilles a été noté chez *A. seyal*, quelle que soit la concentration de NaCl dans le milieu de culture. Au bout de quatre semaines, le nombre de feuilles des plants cultivés sans sel double chez *A. bivenosa* et *A. sclerosperma* comparativement à la première semaine ; alors que ce nombre triple pour les plants d'*A. seyal* (Tableau 14).

Tableau 14 : Effet du sel (NaCl) à différentes concentrations (0, 43, 86, 128, 171, 214, 256 et 342 mM) sur le nombre de feuilles des plants d'*A. seyal*, d'*A. bivenosa* et d'*A. sclerosperma* cultivés en tubes Gibson pendant 4 semaines

Dose NaCl (mM)	Espèces											
	<i>A. seyal</i>				<i>A. bivenosa</i>				<i>A. sclerosperma</i>			
	7	14	21	28	7	14	21	28	7	14	21	28
0	2,2 ^{bc}	3,2 ^c	4,4 ^c	7,1 ^c	1,2 ^{bc}	2,0 ^{de}	2,9 ^d	3,4 ^c	1,5 ^b	2,6 ^d	3,3 ^d	3,7 ^e
43	2,5 ^c	2,6 ^b	3,9 ^b	6,8 ^c	1,3 ^c	2,1 ^e	2,8 ^d	3,2 ^{bc}	1,5 ^b	2,2 ^c	2,7 ^c	3,3 ^{de}
86	2,2 ^{bc}	2,4 ^b	3,7 ^b	6,5 ^{bc}	1,0 ^a	1,8 ^{cde}	2,3 ^c	2,6 ^{abc}	1,3 ^{ab}	2,1 ^c	2,5 ^{bc}	3 ^{cd}
128	2,2 ^{ab}	2,4 ^b	3,6 ^b	6,6 ^c	1,1 ^a	1,7 ^{bcd}	2,2 ^{bc}	2,6 ^{abc}	1,2 ^{ab}	2,0 ^{bc}	2,2 ^{ab}	2,9 ^{cd}
171	2,0 ^{ab}	2,3 ^b	3,6 ^b	5,5 ^b	1,0 ^{ab}	1,4 ^{ab}	2,0 ^{bc}	2,5 ^{abc}	1,3 ^{ab}	1,9 ^{bc}	2,4 ^{bc}	2,6 ^{bc}
214	2,0 ^{ab}	1,9 ^a	2,7 ^a	4,3 ^a	1,1 ^{ab}	1,5 ^{abc}	2,0 ^{bc}	2,4 ^{abc}	1,3 ^{ab}	1,7 ^{ab}	2,1 ^{ab}	2,3 ^b
256	1,9 ^a	1,8 ^a	2,3 ^a	4 ^a	1,1 ^{abc}	1,6 ^{bc}	1,9 ^b	1,9 ^{ab}	1,3 ^{ab}	1,8 ^{abc}	2,1 ^{ab}	2,1 ^{ab}
342	2,1 ^{ab}	1,7 ^a	2,1 ^a	3,8 ^a	1,0 ^a	1,2 ^a	1,5 ^a	1,4 ^a	1,1 ^a	1,5 ^a	1,9 ^a	1,6 ^a

Pour chaque espèce, les valeurs d'une même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % selon le test de Fischer

La présence de sel (NaCl) dans le milieu de culture inhibe la formation de nouvelles feuilles comparativement aux témoins. Cette inhibition est d'autant plus prononcée que la concentration en sel est élevée. A 171 mM (10 g/l), on note une réduction de 22%, 26% et 29% respectivement pour *A. seyal*, *A. bivenosa* et *A. sclerosperma* au bout de 4 semaines de culture. Cette réduction est plus prononcée à 342 Mm (20 g/l). Après 28 jours de culture, elle est de 46% chez *A. seyal*, 56% chez *A. sclerosperma* et 59% chez *A. bivenosa*. Il est à noter que lorsque la concentration en sel du milieu atteint 214 mM, on assiste à un jaunissement suivi d'une chute des feuilles matures chez *A. seyal* ; alors que chez les deux autres espèces, l'inhibition de la formation de nouvelles feuilles est observée mais pas de chute des feuilles dans nos conditions d'expérience.

4. Effet du sel sur la croissance des souches

Une culture de 7 souches a été réalisée sur milieu liquide contenant des teneurs croissantes en NaCl. Nos résultats montrent que la plupart des souches sont capables de croître en présence de fortes concentrations en sel (Figure 30). Les concentrations en sel comprises entre 0 et 171 mM permettent la croissance des souches à l'exception de la souche ORS 3401. Cependant, la croissance des souches diminue lorsque la concentration du milieu de culture atteint 342 mM et devient très faible à 513 mM. La pente de la courbe en phase exponentielle de croissance des souches est inversement proportionnelle à la concentration en sel du milieu de culture. Cette pente est très faible aux concentrations 342 et 513 mM. Un accroissement de la longueur de cette phase exponentielle a été aussi noté à ces mêmes concentrations. La croissance de la souche ORS 3394 est optimale sur un milieu dépourvu de sel. Cependant à 513 mM (30 g/l), cette même souche présente la plus faible croissance ; alors que la souche ORS 3403 montre la meilleure croissance.

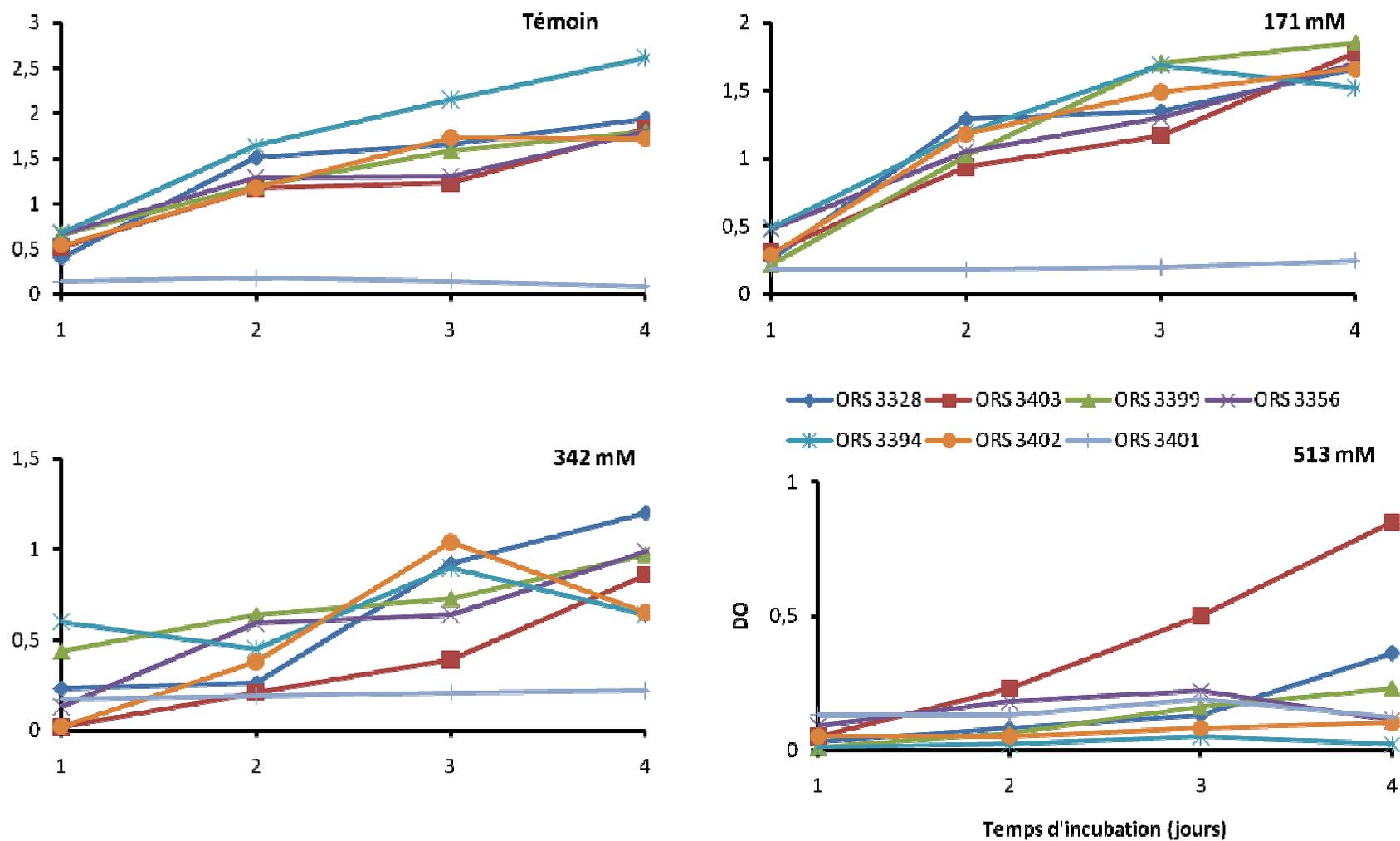


Figure 30 : Effet de quatre niveaux de salinité (0, 85, 171 et 256 mM NaCl) sur la croissance en milieu liquide de différentes souches de *Mesorhizobium sp. Nodulant A. seyal*.

5. Effet du NaCl sur la symbiose *A. seyal*-rhizobium

L'inoculation des plants d'*A. seyal* par des souches de *Mesorhizobium* sp. a stimulé leur croissance ; même pour ceux qui se développent sur un milieu de culture synthétique implémenté avec une forte dose de NaCl (Tableau 15). Globalement, la salinité réduit significativement la croissance des plants d'*A. seyal* ; quel que soit le type d'inoculum. La croissance des plants témoins non inoculés cultivés sur milieu avec 256 mM NaCl est réduite de 30% par rapport aux plants témoins non inoculés qui poussent sur milieu dépourvu de NaCl. Toutefois, l'infection des racines par des souches de rhizobium renforce les capacités des plants à tolérer le stress salin dans le milieu synthétique, comparativement aux plants témoins non inoculés. En présence de NaCl à 256 mM, la croissance en hauteur des plants inoculés augmente de 15% (ORS 3394), 18% (ORS 3403) et 19% (ORS 3394 + ORS 3403) par rapport aux plants témoins non inoculés.

Tableau 15 : Effet de quatre niveaux de salinité (0, 85, 171 et 256 mM NaCl) sur la croissance de plants d'*A. seyal* inoculés ou non cultivés en tubes Gibson pendant 40 jours. L'inoculation a été réalisée en apportant une culture liquide des souches de *Mesorhizobium* sp. ORS 3394 et ORS 3403

NaCl (mM)	Hauteur des tiges (cm)			
	Témoin non inoculé	ORS 3394	ORS 3403	ORS 3394 + ORS 3403
0	11,24 ^a	13,99 ^b	13,53 ^b	13,79 ^b
85	10,1 ^a	11,67 ^b	10,88 ^{ab}	12,20 ^b
171	8,77 ^a	9,53 ^{ab}	10,29 ^b	9,71 ^{ab}
256	8,2 ^a	9,45 ^{ab}	9,79 ^b	9,68 ^b

Les valeurs (moyennes de 24 répétitions) d'une même ligne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

Les plants d'*A. seyal* inoculés ont été nodulés, quel que soit le niveau de salinité. Comme pour la hauteur des plants, les niveaux élevés de salinité affectent la nodulation des plants. Cependant, l'augmentation du niveau de salinité de 0 mM à 85 mM NaCl n'a pas d'effet significatif sur l'initiation et le développement des nodules (Figure 31). Par contre, le stress salin réduit l'infection et le développement de nodules des plants qui poussent sur du NaCl à 171 mM et 256 mM. Toutefois, les effets néfastes de la salinité sur l'initiation et le développement des nodules varient en fonction de l'isolat utilisé comme inoculum bactérien. Le nombre de nodules des plants en croissance sur 171 mM NaCl et inoculés avec

les souches ORS 3394 (groupe IGS-RFLP III) ou ORS 3403 (groupe IGS-RFLP I) a diminué de respectivement 24% et 28%, par rapport à celui des plants cultivés en absence de NaCl.

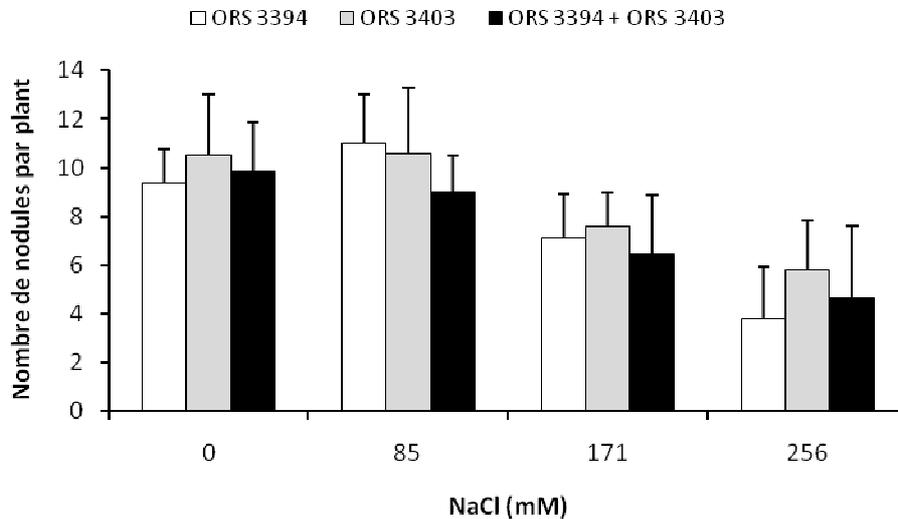


Figure 31 : Effet de quatre niveaux de salinité (0, 85, 171 et 256 mM NaCl) sur le nombre moyen de nodules de plants d'*A. seyal* inoculés avec deux souches de *Mesorhizobium* sp. (ORS 3394 et ORS 3403). Les plants ont été cultivés en tubes Gibson pendant 40 jours. Les valeurs représentent les moyennes de 24 plants et les barres indiquent l'écart-type de la moyenne

En présence de NaCl à 256 mM, le nombre de nodules de plants inoculés avec ORS 3403 a diminué seulement 45% par rapport aux plants témoins. Cependant, le nombre de nodules des plants inoculés avec la souche ORS 3394 seul ou inoculés avec les deux souches diminue respectivement de 60% et 52%.

6. Effet du NaCl sur la teneur en protéines solubles et activités GS

Les plants d'*A. seyal* inoculés avec la souche de *Mesorhizobium* sp. ORS 3403 ont des teneurs en protéines des feuilles plus élevées que celles des plants non-inoculés pour les mêmes niveaux de NaCl (Tableau 16).

Tableau 16 : Effet de quatre niveaux de salinité (0, 85, 171 et 256 mM NaCl) sur la teneur en protéines solubles (mg/g de matière fraîche) et l'activité glutamine synthétase (GS) ($\mu\text{mol } \gamma\text{-Glutamylhydroxamate/h/g}$ de matière fraîche) des feuilles, des racines et des nodules de plants d'*A. seyal* cultivés en tubes Gibson pendant 40 jours et inoculés ou non avec la souche de *Mesorhizobium* sp. ORS 3403

Organes	NaCl (mM)	Protéines solubles		Activité GS	
		Témoin non inoculé	ORS 3403	Témoin non inoculé	ORS 3403
Feuilles	0	11,52 ± 0,7 ^a	14,10 ± 0,3	113,71 ± 1,1	116,86 ± 2,1
	85	11,01 ± 0,5	12,60 ± 0,7	125,34 ± 0,2	129,92 ± 1,1
	171	9,16 ± 0,2	11,92 ± 0,5	129,77 ± 0,7	130,28 ± 2,8
	256	8,89 ± 0,3	10,77 ± 0,1	134,07 ± 1,41	134,07 ± 0,7
Racines	0	4,48 ± 0,7	4,40 ± 0,2	10,75 ± 1,4	11,11 ± 1,4
	85	3,57 ± 1,4	3,86 ± 0,7	10,22 ± 1,4	11,51 ± 0,5
	171	2,30 ± 0,7	2,32 ± 0,7	9,24 ± 0,3	9,22 ± 0,7
	256	2,03 ± 0,7	2,34 ± 0,7	4,33 ± 0,7	5,37 ± 1,4
Nodules	0	-	4,82 ± 1,4	-	77,24 ± 0,4
	85	-	4,02 ± 0,1	-	76,49 ± 1,4
	171	-	3,60 ± 1,4	-	74,77 ± 0,1
	256	-	2,32 ± 0,2	-	65,90 ± 2,3

^a Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions ± Ecart types

En absence de NaCl, la teneur en protéines des feuilles des plants nodulés est de 29% plus élevée que celle des plants non inoculés. En revanche, l'inoculation n'a pas d'effet significatif sur la teneur en protéines des racines. Le traitement salin réduit de façon significative la concentration de protéines dans tous les organes analysés, proportionnellement aux niveaux de NaCl ; quel que soit l'inoculum. L'augmentation de la teneur en protéines des feuilles des plants inoculés est réduite à 5% par une dose NaCl à 256 mM. Toutefois, la réduction de la teneur en protéines dépend des organes. La teneur en protéines des feuilles est 2 fois plus élevée que celle des racines et des nodules. A 256 mM NaCl, la réduction est plus importante dans les nodules (50%) et les racines (41%) que dans les feuilles (32%) des plants inoculés par rapport aux plants cultivés sur milieu dépourvu de NaCl.

L'activité GS des feuilles est respectivement 10 fois et 1,5 fois plus élevée que celles des racines et des nodules des plants inoculés. Contrairement aux protéines solubles, l'inoculation n'a pas augmenté l'activité GS des feuilles. Nos résultats montrent également que, contrairement aux activités GS des racines et des nodules, le stress salin améliore légèrement les activités de GS des feuilles.

7. Effet du NaCl sur la teneur en chlorophylles et activité PEPC des feuilles

La teneur en chlorophylles des feuilles est plus élevée chez les plants inoculés. L'augmentation de la salinité réduit la teneur en chlorophylles chez les plants nodulés ou non. Toutefois, la diminution de la teneur en chlorophylles des feuilles en conditions de contrainte saline est plus importante chez les plants non inoculés par rapport aux plants inoculés (Figure 32).

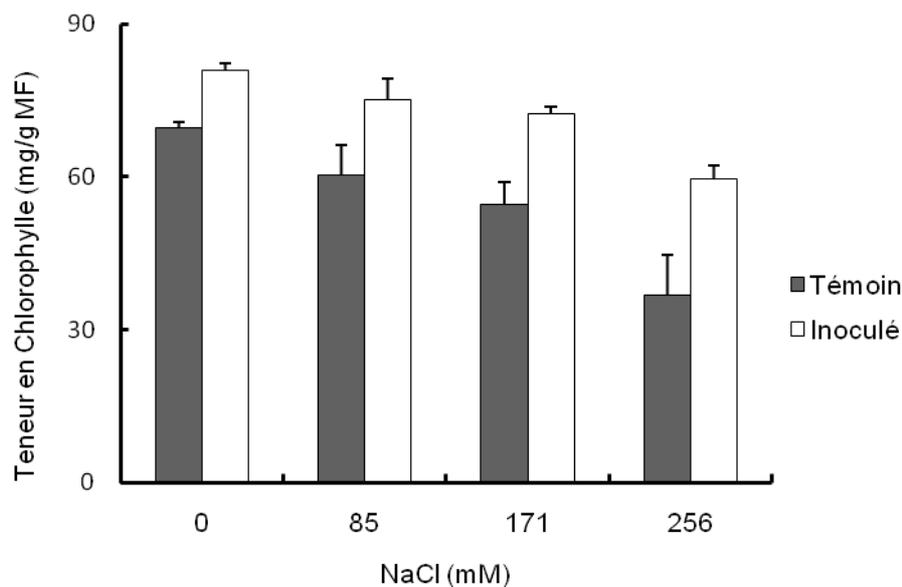


Figure 32 : Effet de quatre niveaux de salinité (0, 85, 171 et 256 mM NaCl) sur la teneur en chlorophylle des feuilles de plants d'*Acacia seyal* cultivés en tubes Gibson pendant 40 jours et inoculés ou non avec la souche de *Mesorhizobium* sp. ORS 3403. Les valeurs représentent les moyennes de 3 mesures et les barres indiquent l'écart-type de la moyenne.

En présence de NaCl à 256 mM, la baisse de la teneur en chlorophylle des feuilles, par rapport aux témoins sur milieu sans NaCl, atteint 47% et 27%, respectivement pour les plants non inoculés et inoculés. Ce résultat est à mettre en relation avec le fait que le stress salin réduit le nombre de feuilles des plants stressés, conduit à leur jaunissement ; et aboutit finalement à leur sénescence précoce (données non présentées).

L'activité PEPC des feuilles est stimulée par l'ajout de NaCl dans le milieu de culture (Figure 33). Il existe une corrélation positive significative entre le niveau de salinité et l'activité PEPC des feuilles ($r = 0,916$ et $r = 0,943$, respectivement pour les plants non inoculés et inoculés). L'augmentation de l'activité PEPC des feuilles des plants non inoculés est moins importante que celle des plants inoculés. Comparativement à des plants témoins cultivés sur milieu sans sel, une dose de NaCl de 256 mM augmente l'activité PEPC des feuilles de 67% et 92%, respectivement pour les plants non inoculés et inoculés.

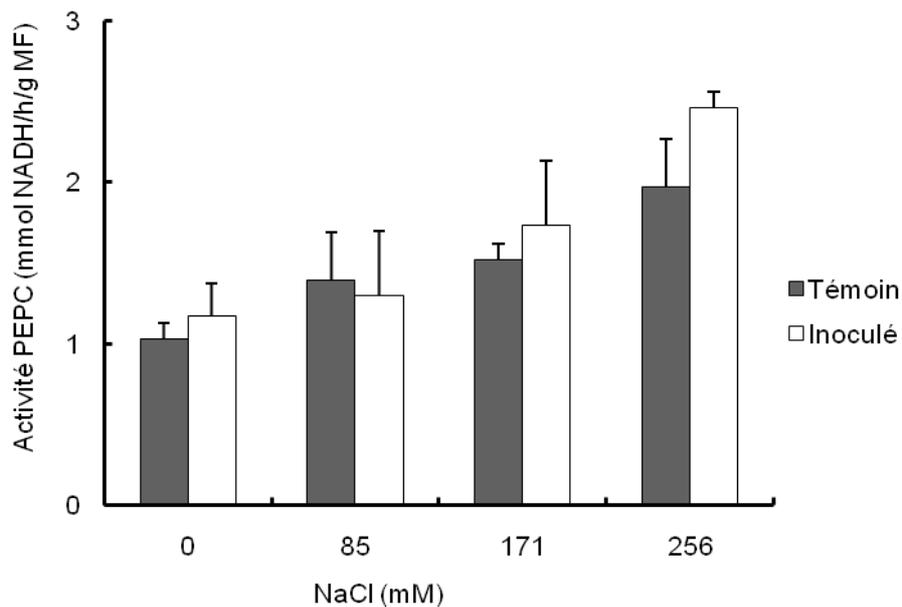


Figure 33 : Effet de quatre niveaux de salinité (0, 85, 171 et 256 mM NaCl) sur l'activité PEPC (mmol NADH/h/g de matière fraîche) des feuilles de plants d'*A. seyal* cultivés en tubes Gibson pendant 40 jours et inoculés ou non avec la souche de *Mesorhizobium* sp. ORS 3403. Les valeurs représentent les moyennes de 3 mesures et les barres indiquent l'écart-type de la moyenne.

IV. DISCUSSION

1. Effet du sel (NaCl) sur la germination des graines

Les actions de récupération des terres salées portent essentiellement sur les reboisements avec des essences tolérantes au sel. En effet, certaines espèces végétales, halophytes en particulier, développent des mécanismes anatomiques, morphologiques et physiologiques pour s'adapter et se développer dans ces zones salées (Zou et al. 1995). Pour une régénération naturelle de ces espèces et une installation réussie de ces plantes en milieu salé, leurs graines doivent rester viables à une forte salinité et pouvoir germer après une dormance secondaire imposée ; lorsque le niveau de salinité baisse (Vicente et al. 2004). Nous avons étudié dans ce travail, l'effet de différentes concentrations de NaCl (0, 85, 171, 256 et 342 mM) sur la germination de graines d'espèces d'*Acacia bivenosa*, d'*A. seyal* et d'*A. sclerosperma*. Le taux de germination final des graines de toutes les espèces est nettement réduit par l'augmentation du taux de salinité. Toutefois, *A. seyal* présente le plus fort taux de germination final (supérieur à 40%) à 342 mM de NaCl. Les graines d'*A. bivenosa* et d'*A. sclerosperma* sont plus sensibles au NaCl, comme en témoigne le faible taux de germination à 171 mM et 256 mM. La germination des graines de ces espèces a été inhibée à 342 mM de NaCl. Nos résultats montrent que les graines d'*A. seyal* maintiennent un taux de germination élevé même en conditions de forte salinité. *A. seyal* présenterait des prédispositions quant à la tolérance au stress salin. Ainsi, ces graines pourraient constituer une banque de semences viables lorsque les niveaux de salinité sont élevés et qu'elles pourraient germer, après le lessivage du sol, et la baisse du niveau de salinité, durant la saison des pluies (Llanes et al. 2005; Tobe et al. 2000).

2. Effet du NaCl sur la croissance et la nodulation des plants d'*A. seyal* inoculés

L'augmentation du niveau de salinité diminue significativement la croissance des plants, indépendamment du traitement d'inoculation. Des récentes études ont rapporté des effets dépressifs du NaCl sur la croissance d'espèces agroforestières (Diouf et al. 2005; Mills 2006; Villagra and Cavagnaro 2005). Toutefois, nos résultats montrent que l'inoculation améliore la croissance des plants comparativement aux plants témoins non inoculés ; quelle que soit la concentration de sel dans le milieu de culture. Plusieurs études démontrent que l'inoculation

des légumineuses par des souches de rhizobium tolérantes au sel peut améliorer leur nodulation et la fixation de l'azote en conditions de stress salin (Craig et al. 1991; Diouf et al. 2005; Lal and Khanna 1994; Marcar et al. 1991). Ces rapports soulignent que les souches de rhizobium tolérantes au sel peuvent noduler des légumineuses ligneuses modérément tolérantes au sel et former des symbioses fixatrice d'azote efficaces dans des sols salins ; ce qui permettra d'améliorer la fertilité des sols salins dans les terres arides. Les inoculums rhizobiens sont d'une importance capitale pour la réhabilitation des sols dégradés par le reboisement avec des légumineuses ligneuses (Zahran 2001).

Les plants ont été nodulés, quel que soit le niveau de NaCl. Ainsi, la survie des rhizobiums dans la rhizosphère, l'infection des racines et l'initiation des nodules n'ont pas été affectées par la salinité comme l'ont signalé Singleton et Bohlool (1984). Il est intéressant de noter qu'un stress salin modéré stimule la nodulation des plants d'*A. seyal* inoculés avec la souche ORS 3394. Un résultat similaire de stimulation du nombre de nodules et de la biomasse sèche des nodules en conditions de stress salin a également été signalé pour d'autres espèces halophiles (Cordovilla et al. 1999a; Diouf et al. 2005; Garg and Singla 2004; Soussi et al. 1999).

3. Réponses biochimiques des plants d'*A. seyal* au stress salin

Le stress salin modifie les teneurs en protéines solubles et en chlorophylles des feuilles, mais également le métabolisme du carbone. La réduction de la teneur en protéines solubles serait liée à une augmentation de l'activité protéolytique pour la synthèse d'osmoprotectants (Silveira et al. 2003). Toutefois, la fourniture de squelettes carbonés pour la biosynthèse des acides aminés est étroitement liée à l'assimilation de l'azote et au métabolisme du carbone (Suarez et al. 2002). Par conséquent, l'augmentation de la croissance des plantes inoculées et cultivées dans des environnements salins contribuent partiellement à une amélioration de la nutrition minérale des plantes hôtes ; et en conséquence à une activité photosynthétique plus intense (Serraj 2002; Zahran 1999). Nous avons montré dans cette étude que l'effet inhibiteur du sel sur la teneur en chlorophylle est atténué par l'inoculation. Des résultats similaires ont été rapportés par Giri et al. (2004) sur des plantes mycorhizées. Ces auteurs suggèrent qu'en conditions de stress salin, les champignons mycorhiziens réduisent l'effet

antagoniste de l'absorption du magnésium produit par le sodium, en supprimant l'absorption du sodium.

Le stress salin augmente légèrement l'activité phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) des feuilles des jeunes plants d'*A. seyal*. L'induction de la PEPC dans les feuilles de plants sous stress salin a également été signalée par d'autres études (Diallo and Queiroz-Claret 1983; Soussi et al. 1998). Ainsi, l'augmentation de l'activité PEPC pourrait être utilisée comme un indicateur biochimique de la tolérance au sel (Guerrier 1988). En effet, l'augmentation de la capacité de synthèse d'acides organiques pourrait faciliter la production de solutés organiques nécessaires aux ajustements osmotique et du pH en conditions de stress (Venekamp 1989).

Comme pour *Faidherbia albida* (Campa et al. 2000), l'assimilation de l'ammonium en acides aminés se déroule essentiellement dans les feuilles chez *A. seyal*. Dans notre étude, l'inoculation n'a pas d'effet sur l'activité glutamine synthétase (GS). Nous avons observé que le stress salin augmente légèrement l'activité GS des feuilles. Un tel résultat a été rapporté sur des feuilles de noix de cajou (Silveira et al. 2003). L'augmentation de l'activité GS pourrait être liée à la libération d'ions ammonium lors de la dégradation des protéines.

CHAPITRE V : EFFET DE L'INOCULATION AVEC DES SOUCHES DE *MESORHIZOBIUM* SP. ET/OU DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES SUR LA CROISSANCE ET LA NUTRITION MINERALE DE PLANTS D'*A. SEYAL* DEL.

INTRODUCTION

La réintroduction de plantes autochtones, associées à une bonne gestion des communautés de symbiotes microbiens, est un outil biotechnologique efficace pour la reconstitution des écosystèmes dégradés (Dommergues 1995; Requena et al. 2001; Thrall et al. 2005). Ces associations symbiotiques sont d'une importance capitale pour l'agriculture (Saxena et al. 2006; Yang et al. 2009; Zahran 1999). Les études menées sur les *Acacia* ont montré que ces espèces produisent non seulement du fourrage pour le bétail et bois de chauffage, mais ont également l'avantage supplémentaire d'apporter de l'engrais naturel au sol grâce à l'association symbiotique avec des rhizobiums compatibles et des champignons mycorhiziens (Allen and Allen 1981; Dommergues 1995). Les rhizobiums d'*Acacia* spp. ont une tolérance au sel plus élevée que celle de la plupart des rhizobiums (Fall et al. 2008; Odee et al. 1997; Zhang et al. 1991). Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) ont également été observés dans des environnements salins où ils améliorent la tolérance au sel des plants en début de croissance (Juniper and Abbott 1993; Ruiz-Lozano and Azcón 2000).

L'inoculation avec des souches de rhizobiums tolérantes pourrait améliorer la tolérance au sel de leurs hôtes (Zou et al. 1995). Les champignons MA permettent de réduire les pertes de rendement des cultures dans des sols salins (Al-Karaki 2006). Cet effet serait dû à une absorption accrue de nutriments à faible mobilité, tels que P, Fe, Cu et Zn (Colla et al. 2008; Garg and Manchanda 2008), et une diminution de l'absorption de Na (Al-Karaki 2000; Giri et al. 2007). En outre, les champignons MA peuvent améliorer les processus physiologiques tels que la capacité d'absorption d'eau des plantes en augmentant la conductivité hydraulique des racines et en ajustant favorablement l'équilibre osmotique et la teneur en hydrates de carbone (Palmieri and Swatzell 2004; Sheng et al. 2008; Smith and Read 1997). Pour faire face aux problèmes osmotiques induits par la contrainte saline, les plantes s'adaptent par la

synthèse de *novo* des solutés organiques compatibles agissant comme osmolytes. Parmi eux, la proline sert en tant que puits de stockage de carbone et d'azote et un réservoir de radicaux libres. Il stabilise les structures sub-cellulaires (membranes et protéines) et tamponne le potentiel redox cellulaire en conditions de stress salin (Garg and Manchanda 2009; Yokota 2003).

Des résultats positifs ont été obtenus par la co-inoculation d'acacias avec les CMA et les rhizobiums en conditions contrôlées (André et al. 2003; Diouf et al. 2005; Hatimi 1999; Weber et al. 2005). Toutefois, peu de travaux de recherche ont porté sur les effets des combinaisons des Rhizobiums et des champignons mycorhiziens sur la croissance des acacias sahéliens en conditions de stress salin. En outre, il existe peu d'informations sur les effets de la salinité sur l'efficacité de la fixation d'azote et l'absorption de P, et des accumulations d'osmoprotectants des légumineuses inoculées avec des CMA et/ou des rhizobiums. Une croissance efficace des plantes en conditions de stress salin, nécessite à la fois une tolérance au sel et un apport suffisant de nutriments tels que N et P, par une meilleure fixation de l'azote et une absorption efficace de P. Par conséquent, les recherches en biochimie et de réactions physiologiques des plantes inoculées sont nécessaires pour améliorer la performance de la plante hôte dans un environnement dégradé (Al-Karaki et al. 2004; Giri et al. 2003).

A. seyal présente un haut potentiel fixateur d'azote (Ndoye et al. 1995) et peut également s'associer à des champignons mycorhiziens arbusculaires (Manga et al. 2007). De plus, nos résultats ont montré que c'est une espèce modérément tolérante au sel. Ces adaptations naturelles font qu'elle est potentiellement utile pour des applications écologiques, en matière d'agroforesterie, d'aménagement paysager ou de réhabilitation des écosystèmes dégradés.

L'objectif de la présente recherche était d'étudier les effets de trois niveaux de salinité sous forme de concentrations croissantes de solutions de chlorure de sodium (NaCl) sur l'efficacité de l'inoculation microbienne des plants d'*A. seyal* avec des souches *Mesorhizobium* sp. et/ou un cocktail de CMA du genre *Glomus*. Nous déterminerons l'effet l'inoculation microbienne sur la croissance, l'absorption des éléments nutritifs minéraux, et

la stratégie de tolérance au stress osmotique de plants d'*A. seyal* cultivés en serre sous contrainte saline pendant 4 mois sur un sol non désinfecté.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel végétal et conditions de culture des plants

Les graines d'*A. seyal* ont été fournies par l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles/Centre National de la Recherche Forestière (ISRA/CNRF). La scarification, la stérilisation superficielle et la germination des graines ont été réalisées comme décrit plus haut. Les plants d'*A. seyal* ont été repiqués individuellement dans des sacs en plastique contenant 1 kg de sol sableux (sol de Sangalkam) pauvre en azote et en phosphore. Ce sol est très riche en rhizobiums, mais avec un faible potentiel mycorhizien (Duponnois et al. 2002). Les caractéristiques physico-chimiques ont été décrites plus haut (chapitre II). Les plants cultivés en serre en lumière naturelle (30 °C le jour, 25 °C la nuit, avec une photopériode de 14 h) ont été régulièrement arrosés à l'eau distillée.

2. Production d'inoculum de champignon mycorhiziens arbusculaires et de rhizobium

Trois isolats de champignons mycorhiziens à arbuscules *Glomus intraradices*, *G. mosseae* et *G. verruculosum* ont été propagés en serre sur des racines de plants de maïs (*Zea mays*) cultivés sur un substrat TerraGreen (argile calcinée) pendant 12 semaines (Plenchette et al. 1989). Les plants de maïs ont ensuite été récoltés et les racines ont été délicatement lavées et coupées en morceaux de 0,5 cm (contenant environ 250 vésicules/cm). Les quatre souches de *Mesorhizobium* sp. (ORS3324, ORS 3356, ORS 3359 et ORS 3365) ont été isolées à partir de nodules de racines d'*A. seyal*, comme décrit précédemment. Ces souches ont été choisies sur la base des résultats de leur performance et de leur tolérance au sel. Les souches ont été cultivées sur milieu YEM pendant 2 jours à 28 °C sous agitation orbitale dans des flacons en verre.

3. Inoculation microbienne et traitements salés

Avant le repiquage, un trou de 1 cm de diamètre et 5 cm de profondeur a été préparé dans chaque pot et rempli avec 1 g de fragments de racines de maïs mycorhizées. Des racines de maïs non-mycorhizées, préparées comme décrit ci-dessus, ont servi pour les traitements témoin sans inoculation CMA. Les trous ont été recouverts avec le même sol sableux non

désinfecté. Les jeunes plants d'*A. seyal* ont été inoculés au moment du repiquage avec 5 ml de la suspension des quatre souches (10^9 cellules bactériennes) ou 5 ml du milieu de culture sans bactéries dans le cas des traitements témoins. Le même volume d'inoculum bactérien a été ajouté dans les traitements combinant ORS 3324, ORS 3356, ORS 3359 et ORS 3365. Les traitements ont été définis par une combinaison factorielle de trois niveaux de salinité (non salé et deux niveaux de salinité) et quatre traitements microbiens [plants témoins non-inoculés (C), inoculés avec *Mesorhizobium* sp. (R), inoculés avec CMA (M), inoculés avec *Mesorhizobium* sp. et CMA (RM)]. Les plants ont été disposés en blocs aléatoires complets avec neuf répétitions par traitement combiné. Les solutions salines 170 mM NaCl et 340 mM NaCl ont des valeurs de conductivité électrique (CE) de 16,75 $\mu\text{S}/\text{cm}$ et 30,40 $\mu\text{S}/\text{cm}$, respectivement. Le témoin non salé (0 mM de NaCl) a été réalisée avec de l'eau distillée (CE-1,8 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Pour augmenter la salinité dans le sol, deux solutions différentes (170 mM et 340 mM de NaCl) ont été ajoutés aux sacs en plastique. Les solutions salines ont été appliquées une seule fois au début de l'expérience pour chaque traitement de sel pour simuler le lessivage du sel de la surface du sol durant la saison des pluies. Pour éviter les effets du sel sur l'établissement des symbioses rhizobiennes et mycorhiziennes l'application de sel a été effectué trois semaines après l'inoculation. Afin de minimiser le choc du stress salin, les semis ont été progressivement exposés au NaCl. La teneur en sel a été incrémentée de 25 mM par jour jusqu'à ce que les concentrations finales aient été atteintes. Par la suite, les plants ont été irrigués à l'eau distillée tout au long de l'expérience.

4. Evaluation de la nodulation, de la colonisation mycorhizienne et de l'effectivité des symbioses rhizobiennes et mycorhiziennes

Les effets relatifs de l'inoculation sur la croissance des plants ont été comparés en mesurant la hauteur des plants au bout de 4 mois. Les plants ont été récoltés et leur système racinaire soigneusement rincé. Des aliquotes ont été conservés pour l'évaluation de la colonisation par les champignons. L'infektivité des rhizobiums a été évaluée par le décompte du nombre de nodules. Tous les tissus végétaux ont été séchés à l'étuve à 80 °C pendant 72 h pour la détermination de la biomasse totale (parties aériennes et racines). La colonisation des racines par des champignons mycorhiziens a été déterminée sur les mêmes plants échantillonnés.

Les racines préalablement prélevées et conservées dans de l'alcool ont été étudiées au laboratoire. Elles ont été colorées au bleu trypan 0,05% (v/v) dans lactophénol selon la méthode de Phillips et Hayman (1970) modifiée. Les racines ont d'abord été rincées soigneusement à l'eau de robinet, mises dans des tubes à essai contenant une solution de KOH à 10% et l'ensemble porté à ébullition dans un bain marie à 90 °C pendant 1 h. Cette opération permet de vider les cellules de leur contenu cytoplasmique. Afin de les éclaircir davantage, les racines ont été rincées et trempées dans de l'eau de javel diluée au 1/10 (10 ml d'eau de javel ramenée à 100 ml avec de l'eau déminéralisée) pendant 3 min. Après un rinçage à l'eau courante, elles ont été trempées dans une solution de bleu trypan (0,05 %) et les tubes placés à nouveau au bain Marie à 90° C pendant 30 min. Au terme de cette opération, le colorant a été égoutté et les racines trempées dans de l'eau de robinet. La coloration au bleu Trypan permet d'observer la colonisation du système racinaire des plants par les champignons MA.

Vingt (20) fragments de racines fines d'environ un 1 cm de long sont prélevés à différents niveaux de chaque échantillon colorés puis montés entre lame et lamelle dans du glycérol. Le taux d'endomycorhization du système racinaire ou fréquence d'infection (F %) ainsi que l'intensité d'endomycorhization des racines (I %) ont été évalués au microscope optique (Figure 34) comme décrit par Trouvelot *et al.* (1986).

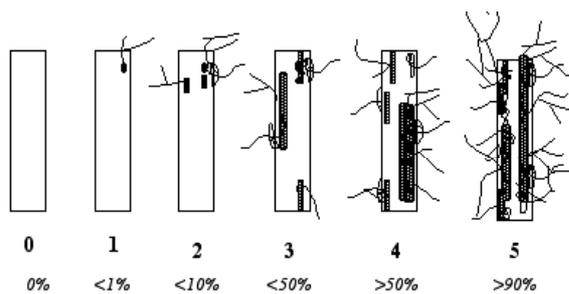


Figure 34 : Notation de l'infection mycorhizienne (classes 0 à classe 5) selon Trouvelot *et al.* (1986)

Le taux de colonisation endomycorhizienne de chaque fragment a été estimé selon un barème constitué de six classes notées de zéro (0) à cinq (5). La fréquence et l'intensité de mycorhization ont été calculées selon les formules suivantes :

$$F\% = (\text{nombre de fragments mycorhizés} / \text{nombre total de fragments observés}) \times 100$$

$$I\% = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / \text{nombre total de fragments observés}$$

Où n_5 = nombre de fragments notés 5, n_4 = nombre de fragments notés 4, n_3 = nombre de fragments notés 3, n_2 = nombre de fragments notés 2, n_1 = nombre de fragments notés 1.

5. Analyse des teneurs minérales de feuilles et des racines

Les teneurs en proline des feuilles ont été mesurées par colorimétrie à 520 nm (Monnevaux and Nemmar 1986). 100 mg de matière fraîche des feuilles ont été mélangés avec 2 ml de méthanol 40% (v/v). Le mélange a ensuite été porté au bain-marie à 85 °C pendant 1 h. Après refroidissement à température ambiante, 1 ml de ninhydrine acide 2,5% (v/v) dans de l'acide acétique, 1 ml d'un réactif (constitué de 60 ml d'acide acétique glacial, 16 ml d'acide phosphorique et 24 ml d'eau) ont été ajoutés à 1 ml du surnageant. Le mélange a ensuite été chauffé dans un bain d'eau bouillante pendant 30 min, puis refroidi à température ambiante et extrait avec 5 ml de toluène. La phase de toluène a été recueillie et déshydratée avec du sulfate de sodium anhydre. La densité optique de la phase de toluène a été mesurée à 520 nm en se servant du toluène pur comme blanc. La teneur en proline a été déterminée à partir d'une gamme étalon en $\mu\text{mole/g}$ de poids de matière fraîche. Les teneurs en N (Kjeldhal), P total, K et Na des parties aériennes et des racines ont été mesurées au Laboratoire LAMA, ISO 9001-2000, Dakar, US IMAGO, IRD, www.lama.ird.sn.

6. Analyses statistiques

Les données métriques des plants ainsi que le nombre de nodules ont été traitées à l'aide du logiciel SuperANOVA™ (Abacus Concepts, Berkeley, Inc, en Californie, 1989). Les moyennes obtenues ont été comparées sur la base du test Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

III. RESULTATS

1. Avant propos

Une partie de ce chapitre a fait l'objet d'un article en préparation et de trois communications à des congrès internationaux.

1. **Diouf D**, Fall D, Kane A, Bakhoun N, Ba AT, Duponnois R. Symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi and *Mesorhizobium* spp. enhances growth and mineral nutrition of *Acacia seyal* (Del.) seedlings under salt stress. (Article en préparation).
2. **Diouf D**, Fall D, Kane A, Bakhoun N, Ba AT, Ndoye I, Duponnois R (2010) Valorisation des microorganismes symbiotiques pour la réhabilitation des écosystèmes dégradés au Sahel : Symbiose mycorhizienne et rhizobienne de *Acacia seyal* (Del.) en conditions de contrainte saline. Communication orale présentée au "1st International Congress on Mycorrhizal Symbiosis : Ecosystems and Environment of Mediterranean Area (Mycomed 2010)", 11-13 Octobre 2010, Marrakech, Maroc.
3. **Diouf D**, Fall D, Kane A, Bakhoun N, BA AT, Dupponois R (2009). L'inoculation avec des champignons mycorhiziens à arbuscules et des *Mesorhizobium* spp. améliore la croissance et la nutrition minérale d'*Acacia seyal* (Del.) en conditions de stress salin. Communication orale présentée à la Xe Animation Régionale de l'AUF, 10-13 Novembre 2009, Dakar, Sénégal.

2. Colonisation microbienne des racines de plants d'A. seyal en conditions de stress salin

La présente étude a montré une influence positive de l'inoculation microbienne sur la colonisation des racines par les champignons mycorhiziens à arbuscules et les rhizobiums, quel que soit le niveau du stress salin (Tableau 17). Toutefois, le taux de nodulation et le niveau de colonisation des racines varient avec le traitement microbien et de la concentration en sel.

Tableau 17 : Effet de l'inoculation microbienne avec Rhizobium et/ou les champignons mycorhiziens à arbuscules sur la production de biomasse (g/plant) et le nombre de nodules de plants d'A. seyal cultivés pendant 4 mois sur un sol non désinfecté. Les plants ont été soumis à 0, 170 ou 340 mM NaCl

Traitements	Biomasse aérienne	Biomasse racinaire	Biomasse totale	Nombre de nodules
Dose de NaCl (mM)				
0	0,586 (0,026) ⁽¹⁾ a	0,638 (0,032) a	1,223 (0,047)a	18,4 (1,741) ab
170	0,576 (0,026) a ⁽²⁾	0,850 (0,032) b	1,426 (0,046)b	16,7 (1,504) a
340	0,699 (0,024) a	0,699 (0,03) a	1,249 (0,047)a	22,2 (1,793) b
Inoculation				
C	0,451 (0,021) a	0,616 (0,031) a	1,067 (0,036)a	9,8 (1,154) a
R	0,578 (0,030) b	0,783 (0,047) b	1,361 (0,066)b	17,8 (1,415) b
M	0,622 (0,028) b	0,732 (0,040) b	1,354 (0,056)b	20,7 (1,057) b
RM	0,632 (0,023) b	0,784 (0,033) b	1,416 (0,035)b	28,1 (2,079) c
Signification ⁽³⁾				
Salinité (S)	NS	**	**	NS
Inoculation (Inoc,)	**	**	**	**
S x Inoc,	*	**	**	NS

C, plants témoins non inoculés; R, plants inoculés avec *Mesorhizobium* spp.; M, plants inoculés avec *Glomus* spp.; RM, plants inoculés avec *Mesorhizobium* spp. et *Glomus* spp.

⁽¹⁾ Erreur Standard, ⁽²⁾ Pour chaque facteur, les valeurs (moyennes de 24 répétitions pour le traitement inoculation microbienne et 32 répétitions pour le traitement salinité) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls tests. ⁽³⁾NS, *, **: Non-significatif, significatif à $P < 0,05$, ou à $P < 0,001$, respectivement.

Il est intéressant de noter que les CMA et les rhizobiums colonisent avec succès les racines d'A. seyal, même en présence de NaCl (Figure 35).

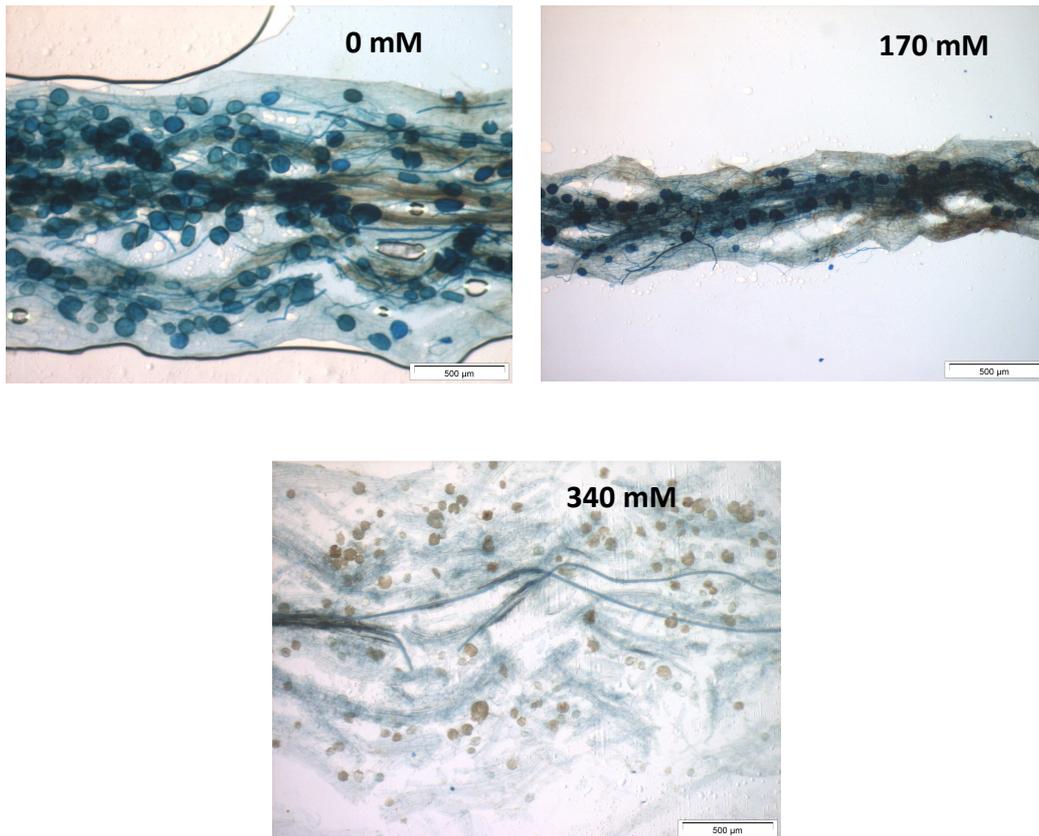


Figure 35 : Racines mycorhizées de plants d'*A. seyal* inoculés avec des champignons mycorhiziens à arbuscules et cultivés pendant 4 mois sur un sol non désinfecté. Les plants ont été soumis à 0, 170 ou 340 mM de NaCl.

Les plus forts taux de mycorhization (fréquence et intensité) et de nodulation ont été observés sur les racines des plants avec une double inoculation par les CMA et les rhizobiums (RM). Aucune structure mycorhizienne n'a été enregistrée sur les traitements non inoculés avec les CMA (C et R). En revanche, une faible nodulation a été observée sur des plants témoins non inoculés. Contrairement à la salinité, l'inoculation microbienne a un effet significatif sur la nodulation, qui augmente 2 fois pour les plants avec les rhizobiums seuls ou les CMA seuls (R, M) et 2,9 fois pour les plants doublement inoculés (RM), en comparaison aux plants témoins non inoculés. Il est à noter la corrélation négative entre les niveaux de salinité des sols et la mycorhization des racines des plants (fréquence et intensité). La colonisation mycorhizienne des racines décroît avec l'augmentation du niveau de salinité. Pour les plants doublement inoculés (RM), la fréquence de mycorhization diminue, passant de 100% pour les plants qui poussent sur un milieu dépourvu de NaCl à 70% pour ceux qui sont cultivés en présence de NaCl à 340 mM (Figure 36).

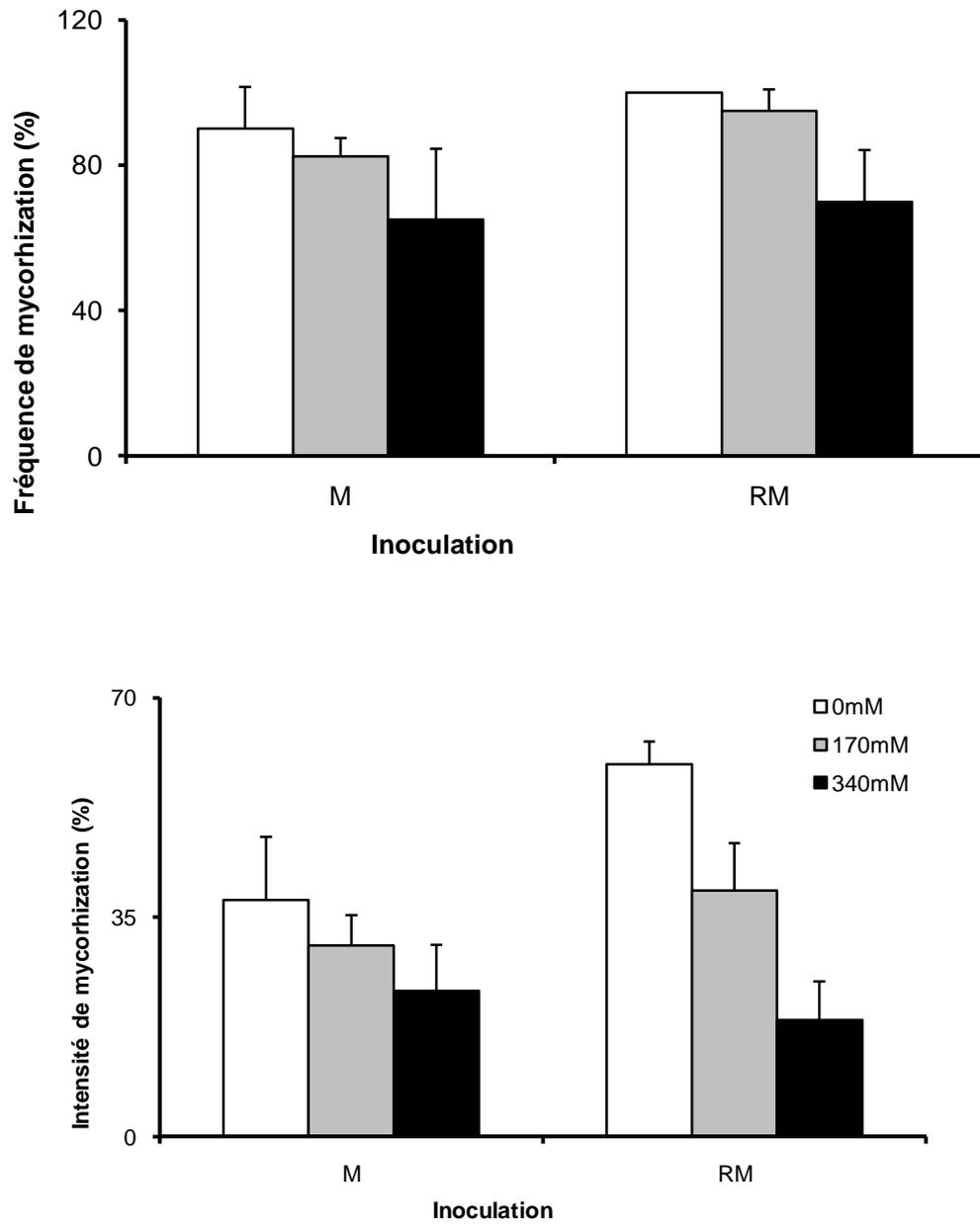


Figure 36 : Taux (Fréquence et Intensité) de mycorrhization de plants d'*A. seyal* inoculés avec des champignons mycorhiziens à arbuscules et cultivés pendant 4 mois sur un sol non désinfecté. Les plants ont été soumis à 0, 170 ou 340 mM de NaCl.

3. L'inoculation microbienne améliore la croissance des plants d'*A. seyal* en condition de stress salin

L'inoculation microbienne améliore la croissance des plants d'*A. seyal*; quel que soit le niveau de salinité. Cependant, l'effet de l'inoculation microbienne sur la croissance des plants varie en fonction de l'inoculum utilisé. Les poids de matières sèches des racines et des parties aériennes sont significativement plus élevés chez les plants d'*A. seyal* inoculés avec les CMA et les rhizobiums (RM) par rapport aux plants témoins non inoculés ($P < 0,05$) (Tableau 17). La double inoculation augmente la production de biomasse, indépendamment du niveau de salinité. Les taux d'augmentation de la biomasse par rapport aux plants témoins non inoculés sont de 28% (R), 27% (M) et 33% (RM). Contrairement à l'inoculation microbienne, la contrainte saline appliquée n'a pas d'effet significatif sur la masse de matière sèche produite et le nombre de nodules. Par contre, la croissance et la production de biomasse sont significativement affectées par l'interaction des deux traitements : Inoculation x Salinité.

4. Effet de l'inoculation sur la nutrition minérale des plants en relation avec la salinité

L'inoculation microbienne a une influence positive significative sur la nutrition des plants, même pour des niveaux de salinité élevés ($P < 0,05$) (Figures 37 et 38). A l'exception du Na, les teneurs en éléments minéraux (N, P et K) des plants sont relativement plus élevées dans les parties aériennes par rapport aux racines. Les plants inoculés accumulent plus de N, P, K et Na à la fois dans les racines et les parties aériennes que les plants non-inoculés ; quel que soit le niveau de salinité. En outre, l'effet de l'inoculation microbienne sur l'absorption des éléments minéraux est significativement plus élevé en conditions de stress salin qu'en absence de sel. En présence de NaCl à 340 mM, les plants mycorhizés (M et RM) ont une teneur en N dans les racines significativement plus élevée que celle des plants non-mycorhizés. Les teneurs en azote des parties aériennes et des racines des plants doublement inoculés (RM) à 340 mM de NaCl sont respectivement 1,7 fois et 1,6 fois plus élevées que celles des plants témoins non inoculés. En absence de sel, l'inoculation microbienne a un léger effet sur la concentration de P dans les parties aériennes et les racines. En revanche, en conditions de stress salin, l'inoculation microbienne augmente de façon significative l'absorption de P. Les traitements mycorhiziens, en particulier, ont un important effet sur

l'absorption de P de plants stressés. A un niveau élevé de NaCl (340 mM), la concentration de P dans les parties aériennes des plants inoculés par les champignons mycorhiziens seuls (M) augmente de 37% par rapport à celle des plants témoins non inoculés.

De même que la teneur en P, l'inoculation microbienne augmente la concentration en K dans les racines et les parties aériennes des plants en conditions de stress salin. En outre, les plants mycorhizés (M et RM) accumulent une plus forte concentration de K dans les racines et les parties aériennes ; quel que soit le niveau de salinité. Ainsi, la concentration en K dans les plants doublement inoculés en présence de 340 mM de NaCl augmente de 71% et 49%, respectivement dans les racines et les parties aériennes par rapport aux mêmes organes des plants témoins. La concentration en Na des racines est supérieure à celle des parties aériennes, quel que soit le niveau de salinité. En conditions de stress salin, l'inoculation microbienne augmente légèrement les concentrations en Na. Les champignons MA ont un effet positif dans l'augmentation de l'absorption du Na. Les parties aériennes ont un rapport K/Na plus élevé que les racines, quel que soit le niveau de salinité (données non présentées). Toutefois, le rapport K/Na des parties aériennes diminue avec l'augmentation de la salinité des sols. En revanche, le rapport K/Na des racines n'est pas corrélé aux doses de sel appliquées dans le milieu de culture.

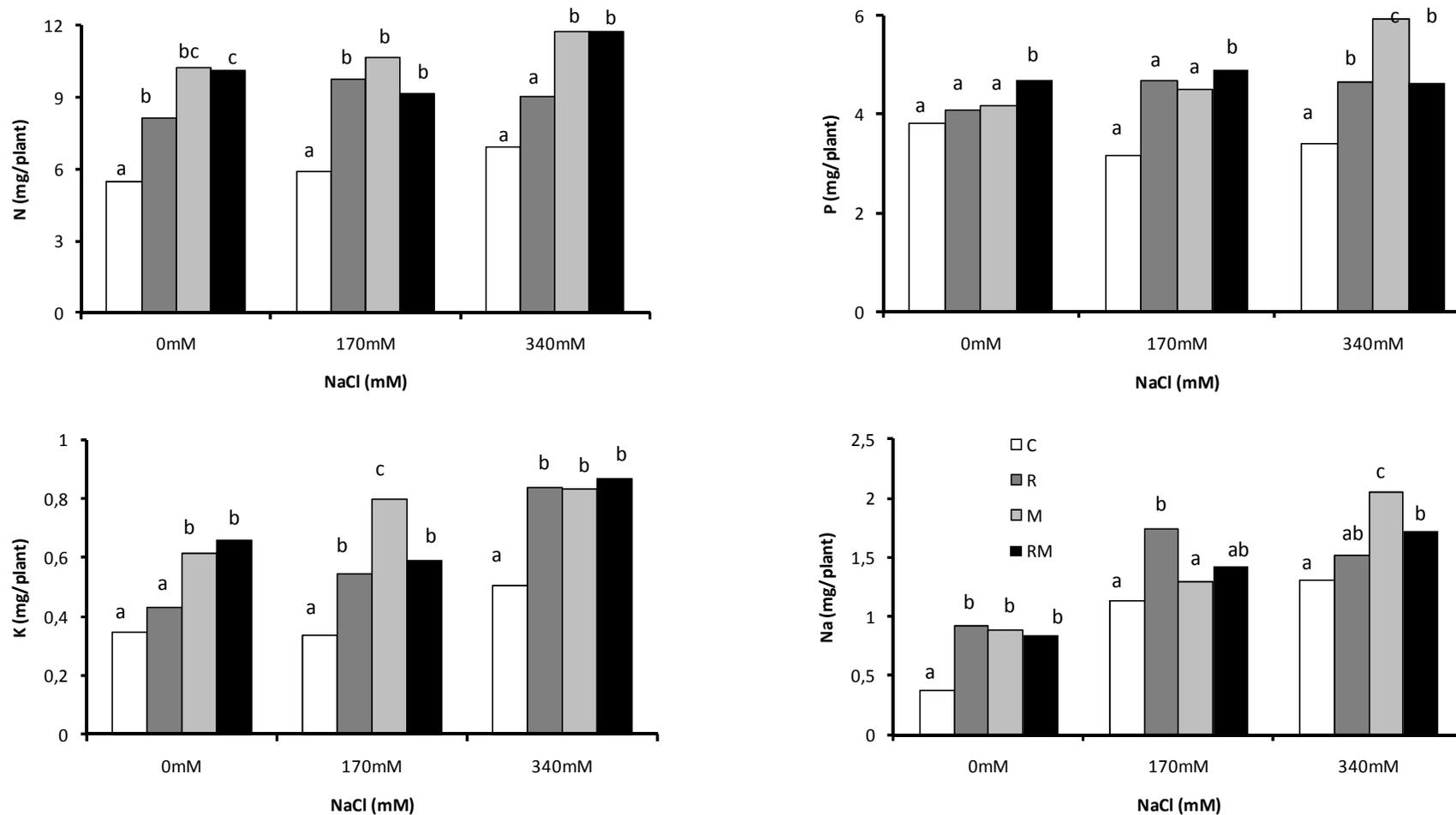


Figure 37 : Teneur foliaire en N, P, K et Na de plants d'*A. seyal* inoculés avec des rhizobiums et/ou des champignons mycorhiziens à arbuscules et cultivés pendant 4 mois sur un sol non désinfecté. Les plants ont été soumis à 0, 170 ou 340 mM de NaCl. Pour chaque dose de NaCl, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls tests ($P < 0,05$).

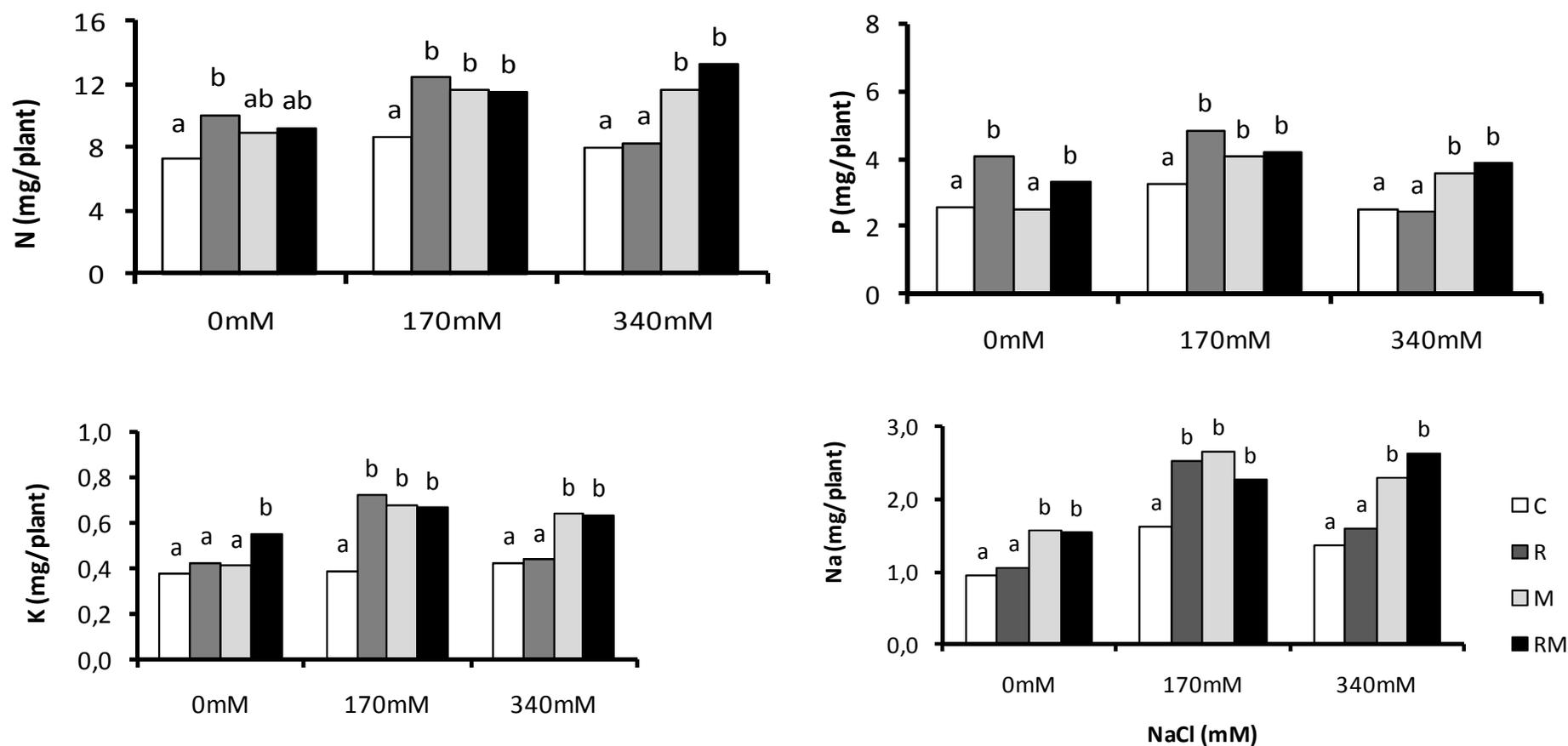


Figure 38 : Teneur racinaire en N, P, K et Na de plants d'*A. seyal* inoculés avec des rhizobiums et/ou des champignons mycorhiziens à arbuscules et cultivés pendant 4 mois sur un sol non désinfecté. Les plants ont été soumis à 0, 170 ou 340 mM de NaCl. Pour chaque dose de NaCl, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls tests ($P < 0,05$).

5. Teneur en proline des feuilles en rapport avec la salinité

A l'exception des plants inoculés avec des rhizobiums, les concentrations en proline des feuilles sont faibles chez les plants cultivés dans des conditions non salines (Figure 39). Chez les plants inoculés avec des rhizobiums dans des conditions non salines, la teneur en proline des feuilles atteint $11 \mu\text{mol/g}$ de matière fraîche et le niveau de salinité ne modifie pas significativement sa concentration. En revanche, pour les autres traitements la teneur en proline foliaire augmente avec le stress salin. La concentration en proline des feuilles est plus élevée pour les plants d'*A. seyal* non inoculés ou inoculés avec des rhizobiums. En présence de NaCl à 340 mM, les plants colonisés par les CMA (M) accumulent respectivement 8% et 22% de proline en moins que les plants témoins non inoculés (C) et les plants inoculés avec des rhizobiums (R).

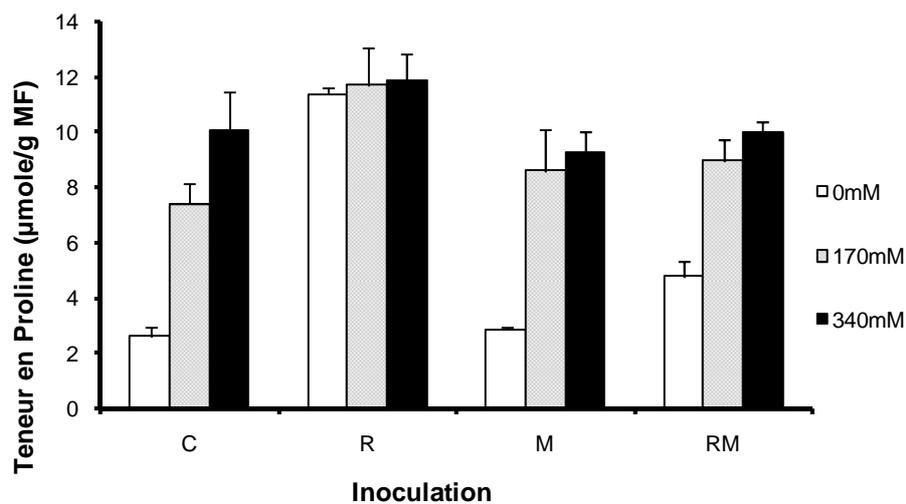


Figure 39 : Teneur foliaire en proline ($\mu\text{mol/g}$ Matière fraîche) de plants d'*A. seyal* inoculés avec des rhizobiums et/ou des champignons mycorhiziens à arbuscules et cultivés pendant 4 mois sur un sol non désinfecté. Les plants ont été soumis à 0, 170 ou 340 mM de NaCl.

IV. DISCUSSION

1. Colonisation microbienne des racines de plants d'*A. seyal* en conditions de stress salin

Parmi les nombreuses études consacrées à la tolérance au sel des légumineuses, très peu de recherches traitent de la réponse des légumineuses ligneuses à la double inoculation par des champignons mycorhiziens et des rhizobiums en conditions de stress salin (Diouf et al. 2005; Hatimi 1999). La présente étude évalue sur les aspects physiologiques et biochimiques liés à la tolérance au sel de plants d'*A. seyal* inoculés ou non avec des champignons mycorhiziens à arbuscules et/ou des rhizobiums et soumis à un stress salin. Les plants inoculés montrent une plus grande tolérance au stress de sel que les plants non inoculés, comme le montrent l'augmentation de la production de biomasse et l'amélioration de la nutrition minérale.

Nos résultats montrent une influence positive de l'inoculation microbienne sur la colonisation des racines par les CMA et/ou les rhizobiums, quel que soit le niveau de salinité. Dans nos conditions expérimentales, les CMA et les rhizobiums colonisent avec succès les racines d'*A. seyal* ; montrant que ces symbiotes microbiens survivent dans des conditions de stress salin. Le taux de mycorhization (intensité et fréquence) et le nombre de nodules des plants inoculés, ont sensiblement augmenté ; même si les systèmes racinaires des plants ont été soumis à un stress salin. Toutefois, le niveau de colonisation des racines varie avec le traitement microbien. L'absence de mycorhization des plants témoins non inoculés pourrait être dû à des facteurs combinés tels que la faible densité de propagules infectieux des champignons mycorhiziens signalée précédemment dans le sol utilisé (Duponnois et al. 2002) et/ou des facteurs environnementaux tels que la présence d'antagonistes des CMA dans la microflore (Oliveira et al. 1997).

La mycorhization s'est produite quelle que soit l'intensité du stress salin. Cependant, les fortes concentrations de NaCl entraînent une réduction de la colonisation mycorhizienne. La mycorhization a été plus importante en absence de NaCl que dans des conditions de sols salés (Al-Karaki et al. 2001; Aliasgharzadeh et al. 2001). La réduction de la mycorhization en conditions de stress salin pourrait être dû à un effet direct de NaCl sur les champignons, probablement par la diminution de leur capacité à germer et à croître en présence de NaCl

dans la solution du sol (Juniper and Abbott 2006). Comme pour les plants d'*A. auriculiformis* et d'*A. mangium* inoculés avec des souches de *Bradyrhizobium* spp. et de *G. intraradices* (Diouf et al. 2005), la mycorhization des plants d'*A. seyal* est plus fortement affectée que la nodulation par les traitements salés (170 mM et 340 mM). Contrairement à l'inoculation microbienne, les doses de sel testées n'ont pas d'effet significatif sur la nodulation des plants (Cordovilla et al. 1999b). Il est intéressant de noter que le nombre de nodules a augmenté en conditions de stress salin chez les plants inoculés, ce qui pourrait expliquer le niveau plus élevé de leur fixation d'azote. Il pourrait également s'agir d'une réaction symbiotique à l'augmentation du sel. Des résultats antérieurs ont montré que l'exposition de plantes de *Cajanus cajan* à un stress salin stimulait la formation des nodules. Cependant, la croissance des nodules était affectée et une réduction de la biomasse nodulaire a été notée (Garg and Manchanda 2008).

Quelques nodules se sont formés sur les racines des plants témoins non inoculés, indiquant que le sol contenait des souches autochtones capables de former des nodules sur les racines d'*A. seyal*. Cette faible nodulation observée sur les racines des plants témoins non inoculés pourrait aussi être due à des contaminations microbiennes du moment que l'expérience a été réalisée sur un sol non désinfecté et en conditions naturelles en serre. D'autant plus que nos résultats antérieurs ont confirmé la promiscuité de l'espèce *A. seyal*. Cependant, la faible croissance des plants témoins non inoculés ont montré que les souches autochtones sont moins efficaces que les souches de *Mesohizobium* sp. utilisées comme inoculum dans cette étude. Des résultats similaires ont été observés avec *A. mangium* et *A. auriculiformis* sur le même sol (Diouf et al. 2005) et suggèrent la nécessité d'inoculer le sol avec des rhizobiums sélectionnés pour améliorer la tolérance au sel de cette légumineuse ligneuse, largement répandue au Sahel.

2. L'inoculation microbienne peut améliorer la tolérance au stress salin des plants d'*A. seyal*

Le poids de matière sèche des plants a été utilisé comme critère pour évaluer la tolérance relative des plantes au sel (Cordovilla et al. 1999b). Nos résultats montrent que les effets du sel sur la croissance et la productivité des plants ne sont pas toujours négatifs. Une dose de NaCl de 170 mM dans le milieu de culture stimule le développement du poids de matière

sèche des racines des plants. Des résultats similaires ont été précédemment rapportés (Anthraper and DuBois 2003; Hussain et al. 1995). En effet, certaines légumineuses ligneuses telles que *Prosopis* spp. et *Acacia* spp., peuvent contracter des relations symbiotiques avec des rhizobium et fixer l'azote même en conditions de forte salinité (Zahran 1999; Zhang et al. 1991). Cela indique que la sensibilité de la symbiose au stress salin n'est pas un phénomène universel (Cordovilla et al. 1999b). La présente étude montre que, dans un sol salin, une inoculation avec des souches de *Mesorhizobium* sp. et de *Glomus* spp. peut favoriser l'installation des plants et stimuler leur croissance. En conditions de stress salin, la biomasse sèche totale des plants inoculés augmente significativement comparativement à celle des plants non-inoculés. Ce résultat appuie les conclusions précédentes qui démontrent que les plants inoculés avec des CMA et/ou des rhizobiums croissent mieux en conditions de stress salin que les plants non-inoculés (Al-Karaki 2000; Diouf et al. 2005; Giri et al. 2007; Serraj 2002). Nos résultats montrent une relation synergique en conditions de stress salin entre les rhizobiums et les CMA. En fait, la réaction d'une plante à une double ou triple inoculation peut conduire à des effets antagonistes ou synergiques en fonction des souches bactériennes et fongiques utilisées ou du biovar de la plante hôte. Ces effets entraînent des effets dépressifs ou stimulants sur la croissance des plants. Des effets antagonistes ont été notés chez *Dalbergia nigra* entre souches de champignons (*Gigaspora* sp. et *Glomus* sp.) et de *Bradyrhizobium* sp. (Santiago et al. 2002). Alors que la double inoculation de plants d'*A. mangium* avec des souches de *Bradyrhizobium* sp. et de *G. intraradices* a stimulé la croissance des plants en cultures aéroponiques (Weber et al. 2005) et sur sol en pépinière (Diouf et al. 2005). Ces effets antagonistes seraient liés à une compétition trophique entre les symbiotes pour l'approvisionnement en squelettes carbonés (Weber et al. 2005).

3. Effet de l'inoculation sur la nutrition minérale des plants sous contrainte saline

La croissance des plants et l'acquisition des éléments minéraux sont stimulées par la double inoculation au même titre que la mycorhization et la nodulation des plants. Des résultats similaires ont été signalés sur des cultivars de soja (Meghvansi et al. 2008) et des plants d'*A. cyanophylla* (Hatimi 1999) inoculés avec des rhizobiums et des CMA. Il semble que le cocktail de souches de CMA, non seulement améliore la nodulation et la fixation d'azote, mais pourrait aussi modifier le développement des inoculums bactériens le long du système

racinaire ; ce qui suggère que les relations spécifiques qui peuvent survenir durant le développement de la symbiose tripartite, aux niveaux physiologique et moléculaire (André et al. 2003; Garg and Manchanda 2008).

Les concentrations en éléments nutritifs (N, P, Na et K) ont augmenté de façon significative dans les organes des plants inoculés par rapport aux plants non-inoculés. Une meilleure assimilation des éléments nutritifs (N et P) des plants inoculés peut améliorer leur croissance en conditions de stress salin et réprimer les effets néfastes du stress salin. Les souches de bactéries et les champignons mycorhiziens contribuent à la croissance des plants sous stress salin par un approvisionnement accru, respectivement en azote et en phosphore. Nos résultats montrent que les concentrations en N et en P des racines et des parties aériennes sont plus élevées chez les plants inoculés par rapport à des plants témoins non inoculés, quel que soit le niveau du stress salin. L'amélioration de la nodulation et la fixation d'azote par les CMA est universellement reconnu. Nos résultats montrent que l'effet positif de la double inoculation avec les rhizobiums et les CMA sur la nutrition des plants est plus évident en conditions de stress salin (Diouf et al. 2005; Hatimi 1999).

Contrairement aux résultats obtenus sur des plants d'*A. nilotica* inoculés avec des CMA, *Glomus fasciculatum* par Giri et al. (Giri et al. 2007), la concentration en Na des racines et des parties aériennes est plus élevée chez les plants inoculés par rapport aux plants témoins non inoculés. Les concentrations en Na et K des racines et des parties aériennes augmentent avec les niveaux de salinité. Des concentrations élevées en K dans les parties aériennes et les racines des plants en conditions de stress salin, pourraient être bénéfiques pour maintenir un élevé du rapport K/Na et ainsi influencer l'équilibre ionique du cytoplasme (Founoune et al. 2002). La littérature rapporte qu'en général, l'augmentation de la concentration de Na dans les parties aériennes et les racines est due en premier lieu à une augmentation du transport (Rogers et al. 2003). Toutefois, cette augmentation de concentrations dans les parties aériennes peut avoir des effets néfastes sur la croissance et la survie des plantes (Barrett-Lennard 2003).

4. Teneur en proline des feuilles en rapport avec la salinité

La présence de NaCl dans le substrat d'enracinement a provoqué une importante accumulation de proline dans les feuilles, avec cependant une différence en fonction du

traitement microbien. Les valeurs les plus élevées ont été enregistrées chez les plants inoculés avec des rhizobiums. Dans les autres traitements microbiens, l'augmentation de la teneur en proline des feuilles est positivement corrélée à la dose de sel appliquée, même si le stress salin n'a pas significativement affecté la croissance des plants. Une teneur en proline 20 fois plus importante a été notée dans les feuilles de plants halophytes de *Plantago crassifolia* traités avec 500 mM NaCl (Vicente et al. 2004). La concentration en proline de nombreuses halophytes a été jugée plus élevée que celle des glycophytes (Ashraf and Harris 2004). Ces tendances laissent penser que la proline est impliquée dans la tolérance au sel des plants d'*A. seyal* en assurant un rôle protecteur des tissus en conditions de stress salin élevé (Jain et al. 2001; Vicente et al. 2004). Cependant, il existe une grande controverse sur l'accumulation de proline ; qui semble être plus un symptôme de vulnérabilité au stress qu'une réponse adaptative (Cordovilla et al. 1996) et son utilisation comme critère de sélection pour la tolérance au sel est remise en cause (Ashraf and Harris 2004).

En effet, le taux d'accumulation de la proline dans la plante varie en fonction des organes (Silveira et al. 2001). Des études antérieures ont montré que le taux d'accumulation de la proline dans les feuilles et les racines n'était pas lié au niveau de tolérance au sel chez les espèces d'acacias australiens et donc ne pouvait pas servir comme indice de tolérance au sel pour ces espèces d'acacias, même si une corrélation positive a été notée entre le niveau du stress salin et le taux d'accumulation de proline (Yokota 2003).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

La salinisation des terres est un problème majeur dans de nombreuses régions du monde. Elle est exacerbée par plusieurs facteurs, notamment le réchauffement climatique, les sécheresses successives, la mauvaise gestion des terres et la faible couverture végétale. Les basses vallées du Sine et du Saloum sont parmi les zones écogéographiques les plus touchées par ce phénomène, qui s'étend de plus en plus et menace le bassin arachidier du Sénégal. Ainsi, la réhabilitation et le développement des barrières de végétation dans ces écosystèmes fragiles sont particulièrement importants, mais elles sont généralement limitées par l'aridité et le manque de nutriments du sol. L'étude de la diversité microbienne qui favorise et améliore la présence de plantes capables de pousser dans des conditions arides est donc d'un intérêt particulier. Notre étude se veut une contribution à la définition d'itinéraires techniques pour la réhabilitation de ces sols affectés par la salinité, notamment par la plantation d'*A. seyal*.

DIVERSITE GENETIQUE DES RHIZOBIUMS AUTOCHTONES DES SOLS DES BASSES VALLEES DU SINE ET DU SALOUM ASSOCIES A A. SEYAL

Il est admis que les communautés microbiennes de la rhizosphère, notamment les bactéries fixatrices d'azote, sont des composantes essentielles du fonctionnement durable des écosystèmes. La prospection de la diversité biologique naturelle est une condition essentielle avant toute mise en valeur. A cet effet, nous avons évalué le potentiel infectieux rhizobien des sols des basses vallées du Sine et du Saloum et la diversité des rhizobiums autochtones associés à *A. seyal*. L'évaluation du potentiel infectieux rhizobien des sols des basses vallées du Sine et du Saloum sur *A. seyal* révèle une large distribution ainsi qu'une forte diversité des rhizobiums associés à *A. seyal*. Nous disposons d'une collection de 49 isolats de rhizobiums nodulant *A. seyal*. Cependant, la diversité génétique et phénotypique de ces rhizobiums nodulant *A. seyal* ne semble pas être liée à l'origine géographique du sol de leur isolement. En effet, nos résultats ont montré que le regroupement des isolats de rhizobiums associés à *A. seyal*, sur la base de l'analyse des polymorphismes des fragments de restriction de l'IGS 16S-23S et le séquençage du gène 16S codant pour l'ARNr ne reflète pas leur origine géographique. L'analyse des séquences de l'ADNr 16S et de l'ADNr 16S-23S a

confirmé la forte diversité génétique des rhizobiums associés à *A. seyal* dans ces sols Sénégalais.

Cette espèce dont la nodulation semble peu spécifique, en conditions de laboratoire, est préférentiellement nodulée dans nos conditions expérimentales par des souches de rhizobium proches de l'espèce *Mesorhizobium plurifarum*. Dans ces sols, *A. seyal* est nodulée par des souches de rhizobiums à croissance rapide et des souches de rhizobiums à croissance moyenne, appartenant aux genres *Mesorhizobium* et *Ensifer*. De plus, nos résultats ont montré la coexistence de souches ineffectives d'*Agrobacterium* et de *Burkholderia* avec des rhizobiums symbiotiques.

ANALYSE PHYLOGENETIQUE DES GENES SYMBIOTIQUES ET CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES SOUCHES DE MESORHIZOBIUM SP. ASSOCIEES A A. SEYAL

Nos résultats ont également démontré la capacité d'adaptation des populations naturelles de rhizobiums associés à *A. seyal* à d'importants stress environnementaux et leur capacité à établir des associations symbiotiques dans les environnements de ces sols. Ces résultats sont encourageants pour des recherches pour sélectionner des rhizobiums pour améliorer la fixation d'azote dans de tels environnements. D'autant plus que la recherche de gènes impliqués dans le transport de solutés compatibles dont la présence a été révélée parmi les souches de rhizobium des nodules d'*A. seyal* suggère la présence de systèmes constitutifs de transport d'osmorégulateurs.

Une expérience sur la réponse de la plante hôte à l'inoculation indique que la diversité génétique des rhizobiums qui nodulent *A. seyal* se manifeste également à travers la réponse symbiotique de l'hôte. En effet, certains isolats ont produit une biomasse sèche et un nombre de nodules plus importants que d'autres, indiquant que la sélection des souches de rhizobium sur la base de l'efficacité de leur association symbiotique avec *A. seyal* est possible ; et que ces souches pourraient être utilisées comme inoculum. Toutefois, une nouvelle évaluation de la symbiose entre *A. seyal* et ces souches de bactéries est nécessaire

pour déterminer leur survie et leur potentiel compétitif sur de longues périodes de temps et dans diverses conditions environnementales.

Nos résultats mettent en évidence la promiscuité de l'espèce végétale *A. seyal* et des souches de rhizobium qui lui sont associées. L'analyse des séquences des gènes *nodA*, *nodC* et *nifH*, choisis comme des indicateurs de la nodulation et de la fixation de l'azote de souches de rhizobiums associés à *A. seyal* révèle une forte diversité phylogénétique des gènes de nodulation *nodC* et de fixation d'azote *nifH* parmi les souches testées. Ainsi *A. seyal* peut établir une symbiose avec un large éventail d'espèces de rhizobiums portant des gènes de nodulation et de fixation d'azote phylogénétiquement divergents. Les souches de rhizobium qui nodulent *A. seyal* portent les mêmes gènes de nodulation et de fixation d'azote que celles qui nodulent l'espèce *Prosopis juliflora*. Ces deux espèces végétales partagent la même aire de répartition au Sénégal. Ce qui laisse penser à un transfert latéral de gènes entre leurs symbiotes rhizobiens. Par ailleurs, cette promiscuité pourrait constituer un avantage important pour cette légumineuse qui peut être utilisée dans les programmes de reboisement, en termes d'amélioration de la nodulation et de fixation d'azote. Elle pourrait également expliquer sa large répartition en Afrique tropicale.

INFLUENCE DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES SUR LA DIVERSITE FONCTIONNELLE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DES SOLS

Nous avons évalué le rôle des paramètres physiques et chimiques du sol sur le biofonctionnement des sols de 4 peuplements naturels d'*A. seyal* du Sénégal (Foundiougne, Ndiagate, Palmarin Ngallou et Sarène). L'analyse des caractéristiques physiques et chimiques des sols de 4 sites d'échantillonnage couverts par des peuplements naturels d'*A. seyal* a montré que les caractéristiques chimiques du sol notamment le niveau de salinité et la teneur en nutriments (N et P) sont les plus déterminants pour les activités microbiennes et biologiques du sol. Malgré l'hétérogénéité des données entre les sites, nos résultats ont montré que les biomasses racinaires et nodulaires de même que la biomasse microbienne sont inversement proportionnelles à la profondeur d'échantillonnage des sols quel que soit le site prospecté. Ces résultats confirment des observations antérieures. Nous avons

cependant pu prouver une nodulation *in situ* chez *A. seyal*, ce qui est relativement rare pour les ligneux tropicaux en zones aride et semi-aride. D'ailleurs, sur les sols des sites prospectés, le nombre de bactéries nodulant *A. seyal* est relativement élevé. Cependant, le nombre de rhizobiums capables de noduler *A. seyal* est négativement corrélé à la conductivité électrique des sols.

Nos résultats ont mis en exergue qu'*A. seyal* fait partie des plantes ligneuses des régions arides à pénétration profonde des racines primaires et fortes ramifications secondaires superficielles. Ce qui semble être une forme d'adaptation des plantes des habitats peu fertiles qui maximisent ainsi l'absorption et le stockage des nutriments au travers d'un coefficient biomasse racinaire / biomasse aérienne plus élevé, de même que par mycorhization, plutôt qu'en augmentant la capacité d'absorption de leurs racines.

Il ressort de l'évaluation de la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes des sols par la détermination du Profil de Réponse Catabolique (CRP) de l'horizon de surface 0-25 cm des 4 sites d'échantillonnage couverts par des peuplements naturels d'*A. seyal* une importante variabilité dans l'activité métabolique des microorganismes des sols des différents sites prospectés. Ces résultats reflètent une hétérogénéité dans le recyclage des substrats carbonés et donc une hétérogénéité dans la composition microbienne des sols de ces différents sites. Nos résultats mettent en exergue le fait que la pauvreté en éléments nutritifs des sols entrave fortement l'expression des microorganismes indigènes. L'établissement et le maintien des certaines activités microbiennes du sol notamment les symbioses mycorhizienne et rhizobienne pourraient contribuer à l'activation de ces microorganismes indigènes du sol, même en conditions de contrainte saline.

Le CRP rend bien compte de la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes, mais ne permet pas une identification des microorganismes ni une quantification effective de leurs activités. L'utilisation de méthodes de génotypage permettrait d'identifier les microorganismes présents dans le sol. De même, des techniques de mesures radioisotopiques permettraient de quantifier l'azote fixé *in situ* et de déterminer la contribution de la nodulation *in situ* dans le pool d'azote des plantes adultes. Le choix de sites d'échantillonnage avec des niveaux des paramètres physico-chimiques, notamment

salinité et/ou de valeurs de pH, plus contrastés permettraient de mieux rendre compte de l'effet de ces paramètres du sol sur le fonctionnement microbien des sols.

REPONSES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES D'*A. SEYAL* DEL. SOUS CONTRAINTE SALINE

Nous avons évalué le niveau de tolérance au sel d'*A. seyal*, au moment de la germination et au stade juvénile, qui sont des stades cruciaux pour l'établissement d'une espèce végétale. Il ressort de notre étude qu'*A. seyal* est modérément tolérante au sel, avec un taux de germination élevé (40%) en présence de NaCl à 342 mM, meilleur que celui des espèces d'*A. bivenosa* et d'*A. sclerosperma*, dont la tolérance au sel est éprouvée. Il est intéressant de noter qu'*A. seyal* pourrait ainsi constituer une réserve de graines viables lorsque les niveaux de salinité sont élevés. Cette propriété pourrait faciliter une installation réussie de cette espèce dans les environnements salins. La salinité affecte la croissance et la nodulation *in vitro* des plants d'*A. seyal*. De même, le stress salin affecte les teneurs en protéines solubles et en chlorophylles des feuilles, mais également le métabolisme du carbone. Cependant, l'inoculation rhizobienne améliore la croissance et les réponses physiologiques et métaboliques des plants d'*A. seyal* en conditions de stress salin.

EFFET DE L'INOCULATION AVEC DES SOUCHES DE MESORHIZOBIUM SP. ET/OU DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES SUR LA CROISSANCE ET LA NUTRITION MINERALE DE PLANTS D'*A. SEYAL* DEL.

Les techniques d'inoculation microbienne contrôlée avec des espèces tolérantes au sel pourraient être exploitées pour la réhabilitation des sols affectés par la salinité. A l'effet de montrer l'importance des communautés microbiennes symbiotiques sur la tolérance au stress salin de plants d'*A. seyal*, nous avons testé l'efficacité de différentes formes d'inoculum sur le fonctionnement de la symbiose *A. seyal*-rhizobium en conditions de stress salin. L'augmentation de la colonisation racinaire par les rhizobiums et les CMA, l'amélioration de la croissance des plants et de l'absorption de nutriments notées dans cette étude démontrent l'importance de l'inoculation microbienne pour la réduction des effets du stress salin sur les plants d'*A. seyal* cultivés en conditions de salinité. La double inoculation

avec des rhizobiums et un cocktail de CMA a eu un effet synergétique sur la nutrition des plants. Cet effet positif est encore plus évident en conditions de stress salin. Ainsi, les deux symbiotes améliorent la croissance et la nutrition minérale des plants. Ils les protègent contre les effets dépressifs de la salinité. Il serait cependant intéressant de poursuivre cette étude au champ afin de vérifier la compétitivité des souches introduites par rapport aux souches natives. Mais également de déterminer l'impact de l'inoculation microbienne sur la diversité fonctionnelle et structurelle des communautés microbiennes du sol.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelmoumen H, Filali-Maltouf A, Neyra M, Belabed A and El Idrissi M M 1999 Effect of high salts concentrations on the growth of rhizobia and responses to added osmotica. *Journal of Applied Microbiology* 86, 889-898.
- Achouak W, Christen R, Barakat M, Martel M-H and Heulin T 1999 *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 787-794.
- Adams J G, Brigaud F, Charreau C L and Fauck R 1965 *Connaissances du Sénégal: Climat - Sols - Végétation*. Centre de Recherches et de Documentation du Sénégal, Saint-Louis, Sénégal.
- Aguilar O M, Riva O and Peltzer E 2004 Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13548-13553.
- Al-Karaki G, McMichael B and Zak J 2004 Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza* 14, 263-269.
- Al-Karaki G N 2001 Germination, sodium, and potassium concentrations of barley seeds as influenced by salinity. *Journal of Plant Nutrition* 24, 511-522.
- Al-Karaki G N 2000 Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress. *Mycorrhiza* 10, 51-54.
- Al-Karaki G N 2006 Nursery inoculation of tomato with arbuscular mycorrhizal fungi and subsequent performance under irrigation with saline water. *Science Horticultura* 109, 1-7.
- Al-Karaki G N, Hammad R and Rusan M 2001 Response of two tomato cultivars differing in salt tolerance to inoculation with mycorrhizal fungi under salt stress. *Mycorrhiza* 11, 43-47.
- Alazard D and Duhoux E 1990 Development of stem nodules in a tropical forage legume, *Aeschynomene afraspera*. *Journal of Experimental Botany* 41, 1199-1206.
- Aliasgharzadeh N, Rastin N S, Towfighi H and Alizadeh A 2001 Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in saline soils of the Tabriz Plain of Iran in relation to some physical and chemical properties of soil. *Mycorrhiza* 11, 119-122.
- Allen O N and Allen E K 1981 *The Leguminosae: A source book of characteristics, uses and nodulation*. The University of Wisconsin Press, Madison. 812 p.
- Allen O N and Allen E K 1936 Root nodule bacteria of some tropical leguminous plants: I. Cross-Inoculation studies with *Vigna sinensis* L.1. *Soil Science* 42, 61-77.
- Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman D J 1997 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.
- Amarger N, Macheret V and Laguerre G 1997 *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 996-1006.

- Amato M and Ladd J N 1988 Assay for microbial biomass based on ninhydrin-reactive nitrogen in extracts of fumigated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 20, 107-114.
- An D S, Im W T, Yang H C and Lee S T 2006 *Shinella granuli* gen. nov., sp. nov., and proposal of the reclassification of *Zoogloea ramigera* ATCC 19623 as *Shinella zoogloeoides* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 443-448.
- André S, Neyra M and Duponnois R 2003 Arbuscular mycorrhizal symbiosis changes the colonization pattern of *Acacia tortilis* spp. *raddiana* rhizosphere by two strains of rhizobia. *Microbial Ecology* 45, 137-144.
- Anthraper A and DuBois J D 2003 The effect of NaCl on growth, N₂ fixation (acetylene reduction), and percentage total nitrogen in *Leucaena leucocephala* (Leguminosae) var. K-8. *American Journal of Botany* 90, 683-692.
- Apse M P, Aharon G S, Snedden W A and Blumwald E 1999 Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285, 1256-1258.
- Ardourel M, Demont N, Debelle F, Maillet F, de Billy F, Prome J C, Denarie J and Truchet G 1994 *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* 6, 1357-1374.
- Arnon D I 1949 Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiology* 24, 1-15.
- Ashraf M and Harris P J C 2004 Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166, 3-16.
- Ashwath N, Dart P J, Edwards D G and Khanna P K 1995 Tolerance of Australian tropical and subtropical Acacias to acid soil. *Plant and Soil* 171, 83-87.
- Assefa F and Kleiner D 1998 Nodulation pattern and acetylene reduction (nitrogen fixation) activity of some highland and lowland Acacia species of Ethiopia. *Biology and Fertility of Soils* 27, 60-64.
- Aswathappa N, Marcar N E and Thomson L A J 1987 Salt tolerance of Australian tropical and subtropical acacias. *In Australian Acacias in Developing Countries*, Ed J W Turnbull. pp 70-73, Canberra, Australia.
- Atkinson E M, Palcic M M, Hindsgaul O and Long S R 1994 Biosynthesis of *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide Nod factors: NodA is required for an N-acyltransferase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 91, 8418-8422.
- Ba S, Willems A, de Lajudie P, Roche P, Jeder H, Quatrini P, Neyra M, Ferro M, Prome J C, Gillis M, Boivin-Masson C and Lorquin J 2002 Symbiotic and taxonomic diversity of rhizobia isolated from *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in Africa. *Systematic and Applied Microbiology* 25, 130-145.
- Bailly X, Olivieri I, Brunel B, Cleyet-Marel J-C and Bena G 2007 Horizontal Gene Transfer and Homologous Recombination Drive the Evolution of the Nitrogen-Fixing Symbionts of Medicago Species. *Journal of Bacteriology* 189, 5223-5236.

- Bala A and Giller K 2007 Relationships between rhizobial diversity and host legume nodulation and nitrogen fixation in tropical ecosystems. *In* Advances in Integrated Soil Fertility Management in sub-Saharan Africa: Challenges and Opportunities. pp 691-702.
- Bala A and Giller K E 2001 Symbiotic specificity of tropical tree rhizobia for host legumes. *New Phytologist* 149, 495-507.
- Bala A, Murphy P and Giller K E 2001 Genetic diversity of rhizobia from natural populations varies with the soil dilution sampled. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 841-843.
- Baldani J I, Baldani V L D, Seldin L and Dobereiner J 1986 Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36, 86-93.
- Barbiero L, Mohamedou A O, Laperrousaz C, Furian S and Cunnac S 2004 Polyphasic origin of salinity in the Senegal delta and middle valley. *Catena* 58, 101-124.
- Barbour W M, Hattermann D R and Stacey G 1991 Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2635-2639.
- Barcellos F G, Menna P, da Silva Batista J S and Hungria M 2007 Evidence of Horizontal Transfer of Symbiotic Genes from a *Bradyrhizobium japonicum* Inoculant Strain to Indigenous Diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2635-2643.
- Barrett-Lennard E G 2003 The interaction between waterlogging and salinity in higher plants: causes, consequences and implications. *Plant and Soil* 253, 35-54.
- Benhizia Y, Benhizia H, Benguedouar A, Muresu R, Giacomini A and Squartini A 2004 Gamma Proteobacteria Can Nodulate Legumes of the Genus *Hedysarum*. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 462-468.
- Benson D R and Silvester W B 1993 Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 57, 293-319.
- Berge O, Lodhi A, Brandelet G, Santaella C, Roncato M A, Christen R, Heulin T and Achouak W 2009 *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 367-372.
- Birdsell J A 2002 Integrating Genomics, Bioinformatics, and Classical Genetics to Study the Effects of Recombination on Genome Evolution. *Molecular Biology and Evolution* 19, 1181-1197.
- Blondeau R 1980 Fixation biologique de l'azote atmosphérique. Vuibert, Paris. 102 p.
- Boch J, Kempf B and Bremer E 1994 Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *Journal of Bacteriology* 176, 5364-5371.
- Boddey R M, Urquiaga S, Alves B J R and Reis V 2003 Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil* 252, 139-149.

- Bodelier P L E, Wijnhuizen A G, Blom C W P M and Laanbroek H J 1997 Effects of photoperiod on growth of and denitrification by *Pseudomonas chlororaphis* in the root zone of *Glyceria maxima*, studied in a gnotobiotic microcosm. *Plant and Soil* 190, 91-103.
- Boivin C, Ndoye I, Lortet G, Ndiaye A, De Lajudie P and Dreyfus B 1997 The *Sesbania* root symbionts *Sinorhizobium saheli* and *S. teranga* bv. *sesbaniae* can form stem nodules on *Sesbania rostrata*, although they are less adapted to stem nodulation than *Azorhizobium caulinodans*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1040-1047.
- Boivin P and Job J O 1988 Conductivimétrie électromagnétique et cartographie automatique des sols salés. *Cahiers ORSTOM de Pédologie* 24.
- Boivin P and Le Brusq J-Y 1985 Désertification et salinisation des terres au Sénégal: Problèmes et remèdes. *In Séminaire National sur la désertification, Saint Louis, Sénégal, 22-26 avril, 1985.* pp 5. Evolution de la salinité des sols et des eaux en relation avec la riziculture submergée dans le delta du fleuve Sénégal (campagne 1981-1982).
- Boncompagni E, Dupont L, Mignot T, Osteras M, Lambert A, Poggi M-C and Le Rudulier D 2000 Characterization of a *Sinorhizobium meliloti* ATP-Binding Cassette Histidine Transporter Also Involved in Betaine and Proline Uptake. *Journal of Bacteriology* 182, 3717-3725.
- Bonfils P and Faure J 1965 La salure des terres de la Région de Tattaguine-Dangane. *In Annales du Centre de Recherches Agronomiques de Bambey.* pp 111-121, Bambey, Sénégal.
- Booth I R, Cairney J, Sutherland L and Higgin C F 1988 Enteric bacteria and osmotic stress: an integrated homeostatic system. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series* 17, 35S-49S.
- Bordeleau L and Prévost D 1994 Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and Soil* 161, 115-125.
- Boscari A, Mandon K, Dupont L, Poggi M C and Le Rudulier D 2002 BetS is a major glycine betaine/proline betaine transporter required for early osmotic adjustment in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* 184, 2654-2663.
- Boscari A, Mandon K, Poggi M C and Le Rudulier D 2004 Functional expression of *Sinorhizobium meliloti* BetS, a high-affinity betaine transporter, in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5916-5922.
- Bouzar H and Jones J B 2001 *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 1023-1026.
- Bowen G J, Beerling D J, Koch P L, Zachos J C and Quattlebaum T 2004 A humid climate state during the Palaeocene/Eocene thermal maximum. *Nature* 432, 495-499.
- Boyer J S 1982 Plant Productivity and Environment. *Science* 218, 443-448.
- Bradford M M 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Bremner J M 1965 Inorganic forms of nitrogen. *In Methods of Soil Analysis*, Eds C A Black, D D Evans, L E Ensminger, J L White and F E Clark. pp 1179-1237. *Agronomy Society of America and Soil Science Society of America, Madison, WI, USA.*

- Brewin N J 1991 Development of the Legume Root Nodule. *Annual Review of Cell Biology* 7, 191-226.
- Brewin N J 2004 Plant Cell Wall Remodelling in the Rhizobium-Legume Symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23, 293-316.
- Brockwell J 1980 Experiment with crop and pasture legumes: principles and practice. *In Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*, Ed F J Bergersen. pp 417-488. John Wiley & Sons Ltd, New York, USA.
- Brom S, Girard L, Tun-Garrido C, Garcia-de los Santos A, Bustos P, Gonzalez V and Romero D 2004 Transfer of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 requires cointegration with p42a, which may be mediated by site-specific recombination. *Journal of Bacteriology* 186, 7538-7548.
- Broughton W J, Jabbouri S and Perret X 2000 Keys to symbiotic harmony. *Journal of Bacteriology* 182, 5641-5652.
- Bukhari Y M 1997 Cytoevolution of Taxa in *Acacia* and *Prosopis* (Mimosaceae). *Australian Journal of Botany* 45, 879-891.
- Cabanes D, Boistard P and Batut J 2000 Symbiotic induction of pyruvate dehydrogenase genes from *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 483-493.
- Caetano-Anolles G, Wall L G, De Micheli A T, Macchi E M, Bauer W D and Favelukes G 1988 Role of Motility and Chemotaxis in Efficiency of Nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology* 86, 1228-1235.
- Campa C, Diouf D, Ndoye I and Dreyfus B 2000 Differences in nitrogen metabolism of *Faidherbia albida* and other N₂-fixing tropical woody acacias reflect habitat water availability. *New Phytologist* 147, 571-578.
- Carter J M, Gardner W K and Gibson A H 1994 Improved growth and yield of faba bean (*Vicia faba* cv. *Fiord*) by inoculation with strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae* in acid soils in South-west Victoria. *Australian Journal of Agricultural Research* 45, 613-662.
- Casida L E J 1982 *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: A Bacterial Predator of Bacteria in Soil. *International Journal of Systematic Bacteriology* 32, 339-345.
- Chandler M R 1978 Some Observations on Infection of *Arachis hypogaea* L. by *Rhizobium*. *Journal of Experimental Botany* 29, 749-755.
- Chandler M R, Date R A and Roughley R J 1982 Infection and Root-Nodule Development in *Stylosanthes* Species by *Rhizobium*. *Journal of Experimental Botany* 33, 47-57.
- Chapin F S 1980 The Mineral Nutrition of Wild Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11, 233-260.
- Chargaff E 1950 Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 6, 201-209.
- Charreau C L 1963 Aperçu sur les alluviaux rencontrés au Sénégal et les problèmes de mise en valeur. *In 5e Réunion Comité Régional pour l'Afrique de l'Ouest en matière de Conservation et d'Utilisation des Sols (CROACUS)*, Freetown, Sierra Leone, 1963. pp 15.

- Chen W-X, Tan Z-Y, Gao J-L, Li Y and Wang E-T 1997 *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 870-873.
- 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. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 153-159.
- Chen W M, de Faria S M, Chou J H, James E K, Elliott G N, Sprent J I, Bontemps C, Young J P and Vandamme P 2008 *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 2174-2179.
- Chen W M, de Faria S M, James E K, Elliott G N, Lin K Y, Chou J H, Sheu S Y, Cnockaert M, Sprent J I and Vandamme P 2007 *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1055-1059.
- Chen W M, James E K, Coenye T, Chou J H, Barrios E, de Faria S M, Elliott G N, Sheu S Y, Sprent J I and Vandamme P 2006 *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1847-1851.
- 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 1729-1735.
- Chen W P and Kuo T T 1993 A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research* 21, 2260.
- Chen W X, Li G S, Qi Y L, Wang E T, Yuan H L and Li J L 1991 *Rhizobium huakuui* sp. nov. Isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 275-280.
- 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. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38, 392-397.
- Chiu W L, Peters G A, Levieille G, Still P C, Cousins S, Osborne B and Elhai J 2005 Nitrogen deprivation stimulates symbiotic gland development in *Gunnera manicata*. *Plant Physiology* 139, 224-230.
- Cho J C and Tiedje J M 2001 Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3677-3682.
- Colla G, Roupheal Y, Cardarelli M, Tullio M, Rivera C and Rea E 2008 Alleviation of salt stress by arbuscular mycorrhizal in zucchini plants grown at low and high phosphorus concentration. *Biology and Fertility of Soils* 44, 501-509.
- Collins A G 1999 Molecules and evolutionary history. *In* Evolution: investigating the evidence, Eds D Springer and J Scotchmoor. *Paleontological Society Papers*.
- Collins M D and Jones D 1981 Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiological Reviews* 45, 316-354.

- Cordovilla M D, Ligeró F and Lluch C 1999a Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen assimilation in nodules of faba bean (*Vicia faba* L.). *Applied Soil Ecology* 11, 1-7.
- Cordovilla M D P, Berrido S I, Ligeró F and Lluch C 1999b Rhizobium strain effects on the growth and nitrogen assimilation in *Pisum sativum* and *Vicia faba* plant growth under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 154, 127-131.
- Cordovilla M P, Ligeró F and Lluch C 1996 Growth and nitrogen assimilation in nodules in response to nitrate levels in *Vicia faba* under salt stress. *Journal of Experimental Botany* 47, 203-210.
- Craig G F, Atkins C A and Bell D T 1991 Effect of salinity on growth of four strains of Rhizobium and their infectivity and effectiveness on two species of Acacia. *Plant and Soil* 133, 253-262.
- Culham D E, Lasby B, Marangoni A G, Milner J L, Steer B A, van Nues R W and Wood J M 1993 Isolation and sequencing of *Escherichia coli* gene proP reveals unusual structural features of the osmoregulatory proline/betaine transporter, ProP. *Journal of Molecular Biology* 229, 268-276.
- D'Haese W, Mergaert P, Promé J-C and Holsters M 2000 Nod Factor requirements for efficient stem and root nodulation of the tropical legume *Sesbania rostrata*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 15676-15684.
- Dabire A P, Hien V, Kisa M, Bilgo A, Sangare K S, Plenchette C, Galiana A, Prin Y and Duponnois R 2007 Responses of soil microbial catabolic diversity to arbuscular mycorrhizal inoculation and soil disinfection. *Mycorrhiza* 17, 537-545.
- Dagnélie P 1973 Théories et méthodes statistiques : applications agronomiques. Les Presses Agronomiques de Gembloux, Gembloux, Belgium. 378 p.
- de Faria S M, Hay G T and Sprent J I 1988 Entry of Rhizobia into Roots of *Mimosa scabrella* Bentham Occurs between Epidermal Cells. *Journal of General Microbiology* 134, 2291-2296.
- de Faria S M, Lewis G P, Sprent J I and Sutherland J M 1989 Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytologist* 111, 607-619.
- de Lajudie P, Laurent-Fulele E, Willems A, Torek U, Coopman R, Collins M D, Kersters K, Dreyfus B and Gillis M 1998a *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 1277-1290.
- de Lajudie P, Willems A, Nick G, Moreira F, Molouba F, Hoste B, Torck U, Neyra M, Collins M D, Lindstrom K, Dreyfus B and Gillis M 1998b Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 369-382.
- de Lajudie P, Willems A, Pot B, Dewettinck D, Maestrojuan G, Neyra M, Collins M D, Dreyfus B, 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. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 715-733.
- De Ley J, Cattoir H and Reynaerts A 1970 The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *European Journal of Biochemistry* 12, 133-142.

- Dean D R, Bolin J T and Zheng L 1993 Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis. *Journal of Bacteriology* 175, 6737-6744.
- Debelle F, Moulin L, Mangin B, Denarie J and Boivin C 2001 Nod genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochimica Polonica* 48, 359-365.
- Debelle F, Rosenberg C and Bono J J 2007 [Calcium and Nod signaling]. *Médecine Science* 23, 130-132.
- Debez A, Ben Hamed K, Grignon C and Abdelly C 2004 Salinity effects on germination, growth, and seed production of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant and Soil* 262, 179-189.
- Degens B P 1998 Decreases in microbial functional diversity do not result in corresponding changes in decomposition under different moisture conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1989-2000.
- Degens B P and Harris J A 1997 Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 1309-1320.
- Degens B P, Schipper L A, Sparling G P and Vojvodic-Vukovic M 2000 Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 189-196.
- Denarie J, Debelle F and Prome J C 1996 *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry* 65, 503-535.
- Denarie J, Debelle F and Rosenberg C 1992 Signaling and host range variation in nodulation. *Annual Review of Microbiology* 46, 497-531.
- Depret G and Laguerre G 2008 Plant phenology and genetic variability in root and nodule development strongly influence genetic structuring of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations nodulating pea. *New Phytologist* 179, 224-235.
- Diallo N and Queiroz-Claret C 1983 The effect of sodium chloride on the carbon metabolism of *Cakile maritima* et *Kalanchoe blossfeldiana*. *Physiologie Vegetale* 21, 621-623.
- Diaw-Guene N-F, Campa C and Gueye M 1998 Sélection de souches de rhizobium d'*Acacia seyal* tolérantes au sel. In *l'Acacia au Sénégal*, Eds C Campa, C Grignon, M Gueye and S Hamon. pp 387-396. ORSTOM, Paris, France.
- Dickie I A, Montgomery R A, Reich P B and Schnitzer S A 2007 Physiological and phenological responses of oak seedlings to oak forest soil in the absence of trees. *Tree Physiology* 27, 133-140.
- Diouf D, Duponnois R, Ba A T, Neyra M and Lesueur D 2005 Symbiosis of *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium* with mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium* spp. improves salt tolerance in greenhouse conditions. *Functional Plant Biology* 32, 1143-1152.
- Diouf D, Forestier S, Neyra M and Lesueur D 2003 Optimisation of inoculation of *Leucaena leucocephala* and *Acacia mangium* with rhizobium under greenhouse conditions. *Annals of Forest Science* 60, 379-384.

- Diouf D, Samba-Mbaye R, Lesueur D, Ba A T, Dreyfus B, de Lajudie P and Neyra M 2007 Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. rhizobial populations indigenous to Senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. *Microbial Ecology* 54, 553-566.
- Dixon R and Wheeler C 1986 Nitrogen fixation in plants. Blackie and Son, Glasgow, UK. 192 p.
- 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. *Systematic and Applied Microbiology* 22, 647-661.
- Dolédec S and Chessel D 1987 Rythmes saisonniers et composantes stationnelles en milieu aquatique I-Description d'un plan d'observations complet par projection de variables. *Acta Oecologica* 8, 403-426.
- Dominguez-Ferreras A, Perez-Arnedo R, Becker A, Olivares J, Soto M J and Sanjuan J 2006 Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymB for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* 188, 7617-7625.
- 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, avec référence particulière aux zones subhumides et arides. CIRAD, FAO, IRD, Montpellier. 499 p.
- Dommergues Y R 1995 Nitrogen fixation by trees in relation to soil nitrogen economy. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 42, 215-230.
- 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, 4008.
- Doran J C and Turnbull J W 1997 Australian trees and shrubs: species for land rehabilitation and farm planting. ACIAR, Canberra, Australia. 384 p.
- Dorthe J 2000 *Acacia seyal* Del. *In* Seed Leaflet. Danida Forest Seed Centre, Humlebaek.
- Downie J A and Young J P 2001 Genome sequencing. The ABC of symbiosis. *Nature* 412, 597-598.
- Doyle J, Chappill J, Bailey C and Kajita T 2000 Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from *rbcl* sequences and non-molecular data. *In* Advances in Legume Systematics, Part 9, Eds P Herendeen and A Bruneau. pp 1-10. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Doyle J J 1994 Phylogeny of the Legume Family: An Approach to Understanding the Origins of Nodulation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25, 325-349.
- Doyle J J, Doyle J L, Ballenger J A, Dickson E E, Kajita T and Ohashi H 1997 A phylogeny of the chloroplast gene *rbcl* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. *American Journal of Botany* 84, 541-554.
- Doyle J J and Luckow M A 2003 The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* 131, 900-1010.
- 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*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38, 89-98.

- Dreyfus B L and Dommergues Y R 1981a Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. FEMS Microbiology Letters 10, 313–317.
- Dreyfus B L and Dommergues Y R 1981b Nodulation of *Acacia* species by fast- and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. Applied and Environmental Microbiology 41, 97-99.
- Duodu S, Nsiah E K, Bhuvaneshwari T V and Svenning M M 2006 Genetic diversity of a natural population of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* analysed from field nodules and by a plant infection technique. Soil Biology and Biochemistry 38, 1162-1165.
- Duponnois R, Colombet A, Hien V and Thioulouse J 2005 The mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and rock phosphate amendment influence plant growth and microbial activity in the rhizosphere of *Acacia holosericea*. Soil Biology and Biochemistry 37, 1460-1468.
- Duponnois R, Founoune H and Lesueur D 2002 Influence of the controlled dual ectomycorrhizal and rhizobal symbiosis on the growth of *Acacia mangium* provenances, the indigenous symbiotic microflora and the structure of plant parasitic nematode communities. Geoderma 109, 85-102.
- Duponnois R, Plenchette C, Prin Y, Ducouso M, Kisa M, Ba A M and Galiana A 2007 Use of mycorrhizal inoculation to improve reforestation process with Australian *Acacia* in Sahelian ecozones. Ecological Engineering 29, 105-112.
- 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*. International Journal of Systematic Bacteriology 44, 461-473.
- Eardly B D, Wang F S and Berkum P 1996 Corresponding 16S rRNA gene segments in Rhizobiaceae and *Aeromonas* yield discordant phylogenies. Plant and Soil 186, 69-74.
- Elliott G N, Chen W-M, Chou J-H, Wang H-C, Sheu S-Y, Perin L, Reis V M, Moulin L, Simon M F, Bontemps C, Sutherland J M, Bessi R, de Faria S M, Trinick M J, Prescott A R, Sprent J I and James E K 2007 *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. New Phytologist 173, 168-180.
- Elliott G N, Chou J-H, Chen W-M, Bloemberg G V, Bontemps C, Martínez-Romero E, Velázquez E, Young J P W, Sprent J I and James E K 2009 *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. Environmental Microbiology 11, 762-778.
- Elmerich C 1991 Genetics and regulation of Mo-nitrogenase. In Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation, Eds M J Dilworth and A R Glenn. pp 103–141. Elsevier, Amsterdam.
- Empadinhas N and da Costa M S 2008 Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. International Microbiology 11, 151-161.
- Epstein E and Bloom A J 2005 Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. Sinauer Associates Sunderland, MA, USA. 400 p.
- Essendoubi M, Brhada F, Eljamali J E, Filali-Maltouf A, Bonnassie S, Georgeault S, Blanco C and Jebbar M 2007 Osmoadaptative responses in the rhizobia nodulating *Acacia* isolated from south-eastern Moroccan Sahara. Environmental Microbiology 9, 603-611.

- Fall D, Diouf D, Ourarhi M, Faye A, Abdelmounen H, Neyra M, Sylla S N and Missbah El Idrissi M 2008 Phenotypic and genotypic characteristics of *Acacia senegal* (L.) Willd. root-nodulating bacteria isolated from soils in the dryland part of Senegal. *Letters in Applied Microbiology* 47, 85-97.
- Fall D, Diouf D, Zoubeirou A M, Bakhouma N, Faye A and Sall S 2010 Effect of distance and depth on microbial biomass and mineral nitrogen content under *Acacia senegal* (L.) Willd. trees. *Journal of Environmental Management* Sous presse.
- FAO 2009 Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. *In* Land and Plant Nutrition Management Service. FAO, Rome, Italy.
- Fauvart M and Michiels J 2008 Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium-legume symbiosis. *FEMS Microbiology Letters* 285, 1-9.
- Faye A, Sall S, Chotte J-L and Lesueur D 2007 Soil bio-functioning under *Acacia nilotica* var. *tomentosa* protected forest along the Senegal River. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 79, 35-44.
- Felsenstein J 1985 Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Ferro M, Lorquin J, Ba S, Sanon K, Prome J-C and Boivin C 2000 *Bradyrhizobium* sp. strains that nodulate the teguminous tree *Acacia albida* produce fucosylated and partially sulfated Nod Factors. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 5078-5082.
- Fierer N, Schimel J P and Holden P A 2003 Influence of drying-rewetting frequency on soil bacterial community structure. *Microbial Ecology* 45, 63-71.
- Fischer H M 1994 Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 58, 352-386.
- Fougnies L, Renciot S, Muller F, Planchette C, Prin Y, de Faria S M, Bouvet J M, Sylla S N, Dreyfus B and Ba A M 2007 Arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation improve flooding tolerance in *Pterocarpus officinalis* Jacq. seedlings. *Mycorrhiza* 17, 159-166.
- Founoune H, Duponnois R, Ba A M and El Bouami F 2002 Influence of the dual arbuscular endomycorrhizal/ectomycorrhizal symbiosis on the growth of *Acacia holosericea* (A. Cunn. ex G. Don) in glasshouse conditions. *Annals of Forest Science* 59, 93-98.
- Fox G E, Wisotzkey J D and Jurtshuk P, Jr. 1992 How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 166-170.
- Frank B 1889 Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 7, 332-346.
- Fremont M, Prin Y, Chauviere M, Diem H G, Pwee K H and Tan T K 1999 A comparison of *Bradyrhizobium* strains using molecular, cultural and field studies. *Plant Science* 141, 81-91.
- Frey-Klett P, Chavatte M, Clause M-L, Courier S, Le Roux C, Raaijmakers J, Martinotti M G, Pierrat J-C and Garbaye J 2005 Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist* 165, 317-328.

- Frioni L, Malates D, Irigoyen I and Dodera R 1998 Promiscuity for nodulation and effectivity in the N₂-fixing legume tree *Acacia caven* in Uruguay. *Applied Soil Ecology* 7, 239-244.
- Galiana A, Chaumont J, Diem H G and Dommergues Y R 1990 Nitrogen-fixing potential of *Acacia mangium* and *Acacia auriculiformis* seedlings inoculated with *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* spp. *Biology and Fertility of Soils* 9, 261-267.
- Galibert F, Finan T M, Long S R, Puhler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett M J, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis R W, Dreano S, Federspiel N A, Fisher R F, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Golding B, Gouzy J, Gurjal M, Hernandez-Lucas I, Hong A, Huizar L, Hyman R W, Jones T, Kahn D, Kahn M L, Kalman S, Keating D H, Kiss E, Komp C, Lelaure V, Masuy D, Palm C, Peck M C, Pohl T M, Portetelle D, Purnelle B, Ramsperger U, Surzycki R, Thebault P, Vandenbol M, Vorholter F J, Weidner S, Wells D H, Wong K, Yeh K C and Batut J 2001 The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293, 668-672.
- Gan Y, Stulen I, van Keulen H and Kuiper P J C 2004 Low concentrations of nitrate and ammonium stimulate nodulation and N₂ fixation while inhibiting specific nodulation (nodule DW g⁻¹ root dry weight) and specific N₂ fixation (N₂ fixed g⁻¹ root dry weight) in soybean. *Plant and Soil* 258, 281-292.
- Gao J-L, Turner S L, Kan F L, Wang E T, Tan Z Y, Qiu Y H, Gu J, Terefework Z, Young J P W, Lindstrom K and Chen W X 2004 *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 2003-2012.
- Garcia-Fraile P, Rivas R, Willems A, Peix A, Martens M, Martinez-Molina E, Mateos P F and Velazquez E 2007 *Rhizobium cellulosilyticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 844-848.
- Garg N and Manchanda G 2008 Effect of Arbuscular Mycorrhizal inoculation on salt-induced nodule senescence in *Cajanus cajan* (Pigeonpea). *Journal of Plant Growth Regulation* 27, 115-124.
- Garg N and Manchanda G 2009 Role of Arbuscular Mycorrhizae in the alleviation of Ionic, osmotic and oxidative stresses induced by salinity in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (pigeonpea). *Journal of Agronomy and Crop Science* 195, 110-123.
- Garg N and Singla R 2004 Growth, photosynthesis, nodule nitrogen and carbon fixation in the chickpea cultivars under salt stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 16, 137-146.
- Garrity G, Brenner D J, Krieg N R and Staley J T 2005 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York. 1400 p.
- Geremia R A, Mergaert P, Geelen D, Van Montagu M and Holsters M 1994 The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91, 2669-2673.
- Gevers D, Cohan F M, Lawrence J G, Spratt B G, Coenye T, Feil E J, Stackebrandt E, Van de Peer Y, Vandamme P, Thompson F L and Swings J 2005 Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* 3, 733-739.

- Ghosh W and Roy P 2006 *Mesorhizobium thioanganeticum* sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 91-97.
- Gibson A H 1980 Methods for legumes in glasshouses and controlled environment cabinets. *In* *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*, Ed F J Bergersen. pp 139-184. Wiley-Interscience, Chichester.
- Gibson A H 1963 Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. I. The effect of temperature on recently nodulated *Trifolium subterraneum* (L.) plants. *Australian Journal of Biological Sciences* 16, 28-42.
- Giffard P-L 1972 Etude des possibilités d'afforestation des sols salés du Sine-Saloum : Rapport préliminaire. pp 68. CTFT, Dakar, Sénégal.
- Giffard P-L 1970 Etude des potentialités de reboisement dans le Delta : Synthèse des recherches effectuées de 1965 à 1969. pp 106. CTFT, Dakar, Sénégal.
- Giller K E, Beare M H, Lavelle P, Izac A M N and Swift M J 1997 Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Applied Soil Ecology* 6, 3-16.
- Gillis M, Van Van T, 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. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 274-289.
- Giraud E, Moulin L, Vallenet D, Barbe V, Cytryn E, Avarre J-C, Jaubert M, Simon D, Cartieaux F, Prin Y, Bena G, Hannibal L, Fardoux J, Kojadinovic M, Vuillet L, Lajus A, Cruveiller S, Rouy Z, Mangenot S, Segurens B, Dossat C, Franck W L, Chang W-S, Saunders E, Bruce D, Richardson P, Normand P, Dreyfus B, Pignol D, Stacey G, Emerich D, Vermeglio A, Medigue C and Sadowsky M 2007 Legumes Symbioses: Absence of Nod Genes in Photosynthetic Bradyrhizobia. *Science* 316, 1307-1312.
- Giri B, Kapoor R and Mukerji K 2007 Improved tolerance of *Acacia nilotica* to salt stress by arbuscular mycorrhiza, *Glomus fasciculatum* may be partly related to elevated K/Na ratios in root and shoot tissues. *Microbial Ecology* 54, 753-760.
- Giri B, Kapoor R and Mukerji K G 2003 Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and salinity on growth, biomass, and mineral nutrition of *Acacia auriculiformis*. *Biology and Fertility of Soils* 38, 170-175.
- Giri B and Mukerji K G 2004 Mycorrhizal inoculant alleviates salt stress in *Sesbania aegyptiaca* and *Sesbania grandiflora* under field conditions: evidence for reduced sodium and improved magnesium uptake. *Mycorrhiza* 14, 307-312.
- Gleason C, Chaudhuri S, Yang T, Munoz A, Poovaiah B W and Oldroyd G E 2006 Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* 441, 1149-1152.
- Gonzalez-Pasayo R and Martinez-Romero E 2000 Multiresistance Genes of *Rhizobium etli* CFN42. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 572-577.
- González-Sama A, Lucas M M, de Felipe M R and Pueyo J J 2004 An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin *Lupinus albus*. *New Phytologist* 163, 371-380.

- Gonzalez V, Bustos P, Ramirez-Romero M, Medrano-Soto A, Salgado H, Hernandez-Gonzalez I, Hernandez-Celis J, Quintero V, Moreno-Hagelsieb G, Girard L, Rodriguez O, Flores M, Cevallos M, Collado-Vides J, Romero D and Davila G 2003 The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome Biology* 4, R36.
- Goris J, Konstantinidis K T, Klappenbach J A, Coenye T, Vandamme P and Tiedje J M 2007 DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 81-91.
- Gottfert M, Rothlisberger S, Kundig C, Beck C, Marty R and Hennecke H 2001 Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *Journal of Bacteriology* 183, 1405-1412.
- Graham M H and Haynes R J 2005 Catabolic diversity of soil microbial communities under sugarcane and other land uses estimated by Biolog and substrate-induced respiration methods. *Applied Soil Ecology* 29, 155-164.
- Graham P H 1992 Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 38, 475-484.
- Graham P H, Sadowsky M J, Keyser H H, Barnett 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. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 582-587.
- Grego S, Moscatelli M S, Marinari S and Cacciari I 2003 Activité Biochimique de la rhizosphère d'Acacia raddiana au nord et au sud du Sahara. *In* Un arbre au désert, Acacia raddiana, Eds M Grouzis and E Le Floch. pp 231-247. IRD Editions, Paris, France.
- Griffiths R I, Whiteley A S, O'Donnell A G and Bailey M J 2003 Physiological and community responses of established grassland bacterial populations to water stress. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6961-6968.
- Gu C T, Wang E T, Tian C F, Han T X, Chen W F, Sui X H and Chen W X 2008 *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 1364-1368.
- Guan S H, Chen W F, Wang E T, Lu Y L, Yan X R, Zhang X X and Chen W X 2008 *Mesorhizobium caraganae* sp. nov., a novel rhizobial species nodulated with *Caragana* spp. in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 2646-2653.
- Guerrier G 1988 Levels of phosphoenolpyruvate carboxylase and malate dehydrogenase extracted from seedlings germinated in a saline medium: biochemical parameters of the ecophysiology of the plant? *Seed science and technology* 16, 571-578.
- Guillot A, Obis D and Mistou M Y 2000 Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. *International Journal of Food Microbiology* 55, 47-51.
- Gutierrez-Zamora M L and Martinez-Romero E 2001 Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *Journal of Biotechnology* 91, 117-126.

- Hageman R V and Burris R H 1978 Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 75, 2699-2702.
- Hall J B and McAllan A 1993 *Acacia seyal*: a monograph. School of Agricultural and Forest Sciences, University of Wales, Bangor.
- Halverson L J and Stacey G 1986 Signal exchange in plant-microbe interactions. *Microbiological Reviews* 50, 193-225.
- Han T X, Han L L, Wu L J, Chen W F, Sui X H, Gu J G, Wang E T and Chen W X 2008a *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 2610-2618.
- Han T X, Wang E T, Wu L J, Chen W F, Gu J G, Gu C T, Tian C F and Chen W X 2008b *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 1693-1699.
- Hardy R and Knight E, Jr 1968 Biochemistry and postulated mechanisms of nitrogen fixation. *In Progress in Phytochemistry*, Eds L Reinholds and L Liwischitz. pp 407-489. Wiley-Interscience, London.
- Harrier L A, Whitty P W, Sutherland J M and Sprent J I 1997 Phenetic investigation of non-nodulating African species of *Acacia* (*Leguminosae*) using morphological and molecular markers. *Plant Systematics and Evolution* 205, 27-51.
- Hart M M, Reader R J and Klironomos J N 2003 Plant coexistence mediated by arbuscular mycorrhizal fungi. *Trends in Ecology and Evolution* 18, 418-423.
- Hatimi A 1999 Effect of salinity on the association between root symbionts and *Acacia cyanophylla* Lind.: growth and nutrition. *Plant and Soil* 216, 93-101.
- Haukka K and Lindström K 1994 Pulsed-field gel electrophoresis for genotypic comparison of *Rhizobium* bacteria that nodulate leguminous trees. *FEMS Microbiology Letters* 119, 215-220.
- Haukka K, Lindstrom K and Young J P W 1998 Three Phylogenetic Groups of *nodA* and *nifH* Genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* Isolates from Leguminous Trees Growing in Africa and Latin America. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 419-426.
- Hennecke H, Kaluza K, Thöny B, Fuhrmann M, Ludwig W and Stackebrandt E 1985 Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen fixing bacteria. *Archives of Microbiology* 142, 342-348.
- 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, 2775-2779.
- Hirsch A M, Lum M R and Downie J A 2001 What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special? *Plant Physiology* 127, 1484-1492.
- 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. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38, 406-416.

- Horn C, Jenewein S, Sohn-Bosser L, Bremer E and Schmitt L 2005 Biochemical and structural analysis of the *Bacillus subtilis* ABC transporter OpuA and its isolated subunits. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 10, 76-91.
- Hou B C, Wang E T, Li Y, Jr., Jia R Z, Chen W F, Gao Y, Dong R J and Chen W X 2009 *Rhizobium tibeticum* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Trigonella archiducis-nicolai* (Sirj.) Vassilcz. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 3051-3057.
- Hunter W J, Kuykendall L D and Manter D K 2007 *Rhizobium selenireducens* sp. nov.: a selenite-reducing alpha-Proteobacteria isolated from a bioreactor. *Current Microbiology* 55, 455-460.
- Huss V A, Festl H and Schleifer K H 1983 Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Systematic and Applied Microbiology*, 184-192.
- Hussain G, Al-Jaloud A, Al-Shammary S and Karimulla S 1995 Effect of saline irrigation on the biomass yield, and the protein, nitrogen, phosphorus, and potassium composition of alfalfa in a pot experiment. *Journal of Plant Nutrition* 18, 2389-2408.
- Jain M, Mathur G, Koul S and Sarin N B 2001 Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Reports* 20, 463-468.
- Jain R, Rivera M C, Moore J E and Lake J A 2003 Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 20, 1598-1602.
- James E K 2000 Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research* 65, 197-209.
- Jarvis B D W, Pankhurst C E and Patel J J 1982 *Rhizobium loti*, a New Species of Legume Root Nodule Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 32, 378-380.
- Jarvis B D W, Van Berkum 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. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 895-898.
- Jensen M A, Webster J A and Straus N 1993 Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 945-952.
- Jha P and Kumar A 2009 Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant. *Microbial Ecology* 58, 179-188.
- John M, Rohrig H, Schmidt J, Wieneke U and Schell J 1993 Rhizobium NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 90, 625-629.
- Jones K M, Kobayashi H, Davies B W, Taga M E and Walker G C 2007 How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. *Nature Reviews Microbiology* 5, 619-633.
- Jordan D C 1984 Family III, Rhizobiaceae Conn 1938. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Ed J G Holt. pp 234-256. Williams & Wilkins, Baltimore.

- 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. *International Journal of Systematic Bacteriology* 32, 136-139.
- Joshi N R, Agate A D and Paknikar K M 2000 Polyamine patterns in iron- and sulphur-oxidizing bacteria isolated from an Indian copper mine indicate requirement of spermidine for growth under acid conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16, 631-634.
- Jourand P, Giraud E, Bena G, Sy A, Willems A, Gillis M, Dreyfus B and de Lajudie P 2004 *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylophilic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 2269-2273.
- 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 Environmental Microbiology* 59, 1702-1708.
- Juniper S and Abbott L 1993 Vesicular-arbuscular mycorrhizas and soil salinity. *Mycorrhiza* 4, 45-57.
- Juniper S and Abbott L K 2006 Soil salinity delays germination and limits growth of hyphae from propagules of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 16, 371-379.
- Kempf B and Bremer E 1995 OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* 270, 16701-16713.
- Khbaya B, Neyra M, Normand P, Zerhari K and Filali-Maltouf A 1998 Genetic Diversity and Phylogeny of Rhizobia That Nodulate *Acacia* spp. in Morocco Assessed by Analysis of rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4912-4917.
- Kigel J 1995 Seed germination in arid and semi-arid regions *In* Seed Development and Germination, Eds J Kigel and G Galili. pp 215-240. Marcel Dekker, New York, USA.
- Kimura M 1968 Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217, 624-626.
- Kimura M 1983 *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kimura M 1980 A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Biology* 16, 111-120.
- Kneip C, Lockhart P, Vob C and Maier U-G 2007 Nitrogen fixation in eukaryotes - New models for symbiosis. *BMC Evolutionary Biology* 7, 55.
- Knosel D H 1984 Genus *Phyllobacterium*. *In* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Eds N R Krieg and J G Holt. pp 254-256. The Williams & Wilkins Co, Baltimore.
- Kondorosi E, Buire M, Cren M, Iyer N, Hoffmann B and Kondorosi A 1991 Involvement of the syrM and nodD3 genes of *Rhizobium meliloti* in nod gene activation and in optimal nodulation of the plant host. *Molecular Microbiology* 5, 3035-3048.

- Konstantinidis K T and Tiedje J M 2005a Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2567-2572.
- Konstantinidis K T and Tiedje J M 2005b Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *Journal of Bacteriology* 187, 6258-6264.
- Krasova-Wade T, Ndoye I, Braconnier S, Sarr B, de Lajudie P and Neyra M 2003 Diversity of indigeneous bradyrhizobia associated with three cowpea cultivars (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) grown under limited and favorable water conditions in Senegal (West Africa). *African Journal of Biotechnology* 2, 13-23.
- Kumar H, Arora N, Kumar V and Maheshwari D 1999 Isolation, characterization and selection of salt tolerant rhizobia nodulating *Acacia catechu* and *A. nilotica*. *Symbiosis* 26, 279-288.
- Kumar S G, Reddy A M and Sudhakar C 2003 NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. *Plant Science* 165, 1245-1251.
- Kummerow J and Mangan R 1981 Root systems in *Quercus dumosa* Nutt. dominated chaparral in southern California. *Acta oecologica Plant* 2, 177-188.
- 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. *Canadian Journal of Microbiology* 38, 501-505.
- Kwon S W, Park J Y, Kim J S, Kang J W, Cho Y H, Lim C K, Parker M A and Lee G B 2005 Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 263-270.
- Lafay B and Burdon J J 2007 Molecular Diversity of Legume Root-Nodule Bacteria in Kakadu National Park, Northern Territory, Australia. *PLoS ONE* 2, e277.
- Lafay B and Burdon J J 2001 Small-Subunit rRNA genotyping of Rhizobianodulating Australian *Acacia* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 396-402.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 56-63.
- 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* 147, 981-993.
- Laine A-L 2009 Role of coevolution in generating biological diversity: spatially divergent selection trajectories. *Journal of Experimental Botany* 60, 2957-2970.
- Lal B and Khanna S 1994 Selection of salt-tolerant *Rhizobium* isolates of *Acacia nilotica*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10, 637-639.
- Lambers H 2003 Introduction, dryland salinity: A key environmental issue in Southern Australia. *Plant and Soil* 257, 5-7.

- Laranjo M, Alexandre A, Rivas R, Velázquez E, Young J P W and Oliveira S 2008 Chickpea rhizobia symbiosis genes are highly conserved across multiple *Mesorhizobium* species. *FEMS Microbiology Ecology* 66, 391-400.
- Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, Chenna R, McGettigan P A, McWilliam H, Valentin F, Wallace I M, Wilm A, Lopez R, Thompson J D, Gibson T J and Higgins D G 2007 Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Lavin M, Herendeen P S and Wojciechowski M F 2005 Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary. *Systematic Biology* 54, 575-594.
- Le Houérou H N 1980 Les fourrages ligneux en Afrique : état actuel des connaissances. *In* Les fourrages ligneux en Afrique, CIPEA, Addis Abeba, Ethiopie, 1980. Ed H N Le Hourou. pp 418.
- Leary J J K, Singleton P W and Borthakur D 2004 Canopy nodulation of the endemic tree legume *Acacia koa* in the mesic forests of hawaii. *Ecology* 85, 3151-3157.
- Leary J K, Singleton P W, Scowcroft P G and Borthakur D 2006 Symbiotic diversity in the cosmopolitan genus *Acacia*. *Symbiosis* 41, 107-117.
- Lerouge P, Fichette-Laine A C, Chekkafi A, Avidgor V and Faye L 1996 N-linked oligosaccharide processing is not necessary for glycoprotein secretion in plants. *Plant Journal* 10, 713-719.
- Lesueur D, Diem H G, Dianda M and Roux C 1993 Selection of *Bradyrhizobium* strains and provenances of *Acacia mangium* and *Faidherbia albida*: Relationship with their tolerance to acidity and aluminium. *Plant and Soil* 149, 159-166.
- Levin B R and Bergstrom C T 2000 Bacteria are different: Observations, interpretations, speculations, and opinions about the mechanisms of adaptive evolution in prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 6981-6985.
- Lewis G, Schrire B, Mackinder B and Lock M 2005 *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew, London, UK. 592 p.
- Li Lu Y, Chen W F, Li Han L, Wang E T and Chen W X 2009 *Rhizobium alkalisoli* sp. nov., isolated from *Caragana intermedia* growing in saline-alkaline soils in the north of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 3006-3011.
- Lie T, Göktan D, Engin M, Pijnenborg J and Anlarsal E 1987 Co-evolution of the legume-Rhizobium association. *Plant and Soil* 100, 171-181.
- Limpens E, Franken C, Smit P, Willemsse J, Bisseling T and Geurts R 2003 LysM Domain Receptor Kinases Regulating Rhizobial Nod Factor-Induced Infection. *Science* 302, 630-633.
- Lin D X, Chen W F, Wang F Q, Hu D, Wang E T, Sui X H and Chen W X 2009 *Rhizobium mesosinicum* sp. nov., isolated from root nodules of three different legumes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1919-1923.
- Lin D X, Wang E T, Tang H, Han T X, He Y R, Guan S H and Chen W X 2008 *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 1409-1413.

- Lindstrom K 1989 *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology 39, 365-367.
- Lindström K and Lehtomäki S 1988 Metabolic properties; maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (Galegae) compared with other fast-growing rhizobia. FEMS Microbiology Letters 50, 365-367.
- Lippi D, De Paolis M R, Di Mattia E, Grego S, Pietrosanti T and Cacciari I 2000 Effect of salinity on growth and starvation-survival of a tropical *Rhizobium* strain. Biology and Fertility of Soils 30, 276-283.
- Llanes A, Reinoso H and Luna V 2005 Germination and early growth of *Prosopis strombulifera* seedlings in different saline solutions. World Journal of Agricultural Sciences 1, 120-128.
- Long S R 1996 *Rhizobium* symbiosis: nod factors in perspective. Plant Cell 8, 1885-1898.
- Lorquin J, Lortet G, Ferro M, Mear N, Prome J-C and Boivin C 1997 *Sinorhizobium teranga* bv. acaciae ORS1073 and *Rhizobium* sp. strain ORS1001, two distantly related *Acacia*-nodulating strains, produce similar Nod factors that are O carbamoylated, N methylated, and mainly sulfated. Journal of Bacteriology 179, 3079-3083.
- 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*. Molecular Plant-Microbe Interactions 9, 736-747.
- Lu Y L, Chen W F, Wang E T, Han L L, Zhang X X, Chen W X and Han S Z 2009 *Mesorhizobium shangrilense* sp. nov., isolated from root nodules of *Caragana* species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59, 3012-3018.
- Ludwig W and Schleifer K-H 1999 Phylogeny of Bacteria beyond the 16S rRNA standard. American Society for Microbiology News 65, 752-775.
- Mahler R L and Bezdicek D F 1978 Diversity of *Rhizobium leguminosarum* in the Palouse of Eastern Washington. Applied and Environmental Microbiology 36, 780-782.
- Maillet F, Debelle F and Denarie J 1990 Role of the nodD and syrM genes in the activation of the regulatory gene nodD3, and of the common and host-specific nod genes of *Rhizobium meliloti*. Molecular Microbiology 4, 1975-1984.
- Makkar N S and Casida L E J 1987 *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.; a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. International Journal of Systematic Bacteriology 37, 323-326.
- Mallet B, Besse F, Gautier D, Muller D, Bouba N and NJITI C 2003 Quelles perspectives pour les gommiers en zone de savanes d'Afrique centrale ? In Savanes africaines : des espaces en mutation, des acteurs face à de nouveaux défis, Garoua, Cameroun, 2003. Eds J Y Jamin, L Seiny Boukar and C Floret.
- Mandon K, Osteras M, Boncompagni E, Trinchant J C, Spennato G, Poggi M C and Le Rudulier D 2003 The *Sinorhizobium meliloti* Glycine Betaine Biosynthetic Genes (betICBA) Are Induced by Choline and Highly Expressed in Bacteroids. Molecular Plant-Microbe Interactions 16, 709-719.

- Manga A, Diop T A, van Tuinen D and Neyra M 2007 Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Acacia seyal* in a semiarid zone of Senegal. *Sécheresse* 18, 129-133.
- Mantelin S, Saux M F-L, Zakhia F, Bena G, Bonneau S, Jeder H, de Lajudie P and Cleyet-Marel J-C 2006 Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 827-839.
- Marcar N E, Dart P and Sweeney C 1991 Effect of root-zone salinity on growth and chemical composition of *Acacia ampliceps* B. R. Maslin, *A. auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. and *A. mangium* Willd at two nitrogen levels. *New Phytologist* 119, 567-573.
- Marie C, Broughton W J and Deakin W J 2001 Rhizobium type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Current Opinion in Plant Biology* 4, 336-342.
- Marius C 1985 Contribution à l'étude des mangroves du Sénégal et de Gambie. Ecologie-pédologie-géochimie. Mise en valeur et aménagement (Résumé de thèse), Thèse de doctorat en sciences - Ecologie de la Terre. Cahiers ORSTOM, Série Pédologie XXI, 127-131.
- Marius C 1995 Effets de la sécheresse sur l'évolution des mangroves du Sénégal et de la Gambie. *Secheresse* 6, 123-125.
- Marmur J and Doty P 1961 Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *Journal of Molecular Biology* 3, 585-594.
- Marsudi N D S, Glenn A R and Dilworth M J 1999 Identification and characterization of fast- and slow-growing root nodule bacteria from South-Western Australian soils able to nodulate *Acacia saligna*. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1229-1238.
- Martinez-Romero E 2009 Coevolution in Rhizobium-Legume Symbiosis? *DNA and Cell Biology* 28, 361-370.
- 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. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 417-426.
- Maslin B R, Miller J T and Seigler D S 2003 Overview of the generic status of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). *Australian Systematic Botany* 16, 1-18.
- Massibot J A and Carles L 1946 Mise en valeur des tannes rizicultivables du Sine (Sénégal). *Agronomie Tropicale* 1, 451-466.
- Mathesius U, Weinman J J, Rolfe B G and Djordjevic M A 2000 Rhizobia Can Induce Nodules in White Clover by "Hijacking" Mature Cortical Cells Activated During Lateral Root Development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 170-182.
- Meeks J C and Elhai J 2002 Regulation of Cellular Differentiation in Filamentous Cyanobacteria in Free-Living and Plant-Associated Symbiotic Growth States. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 94-121.

- Meghvansi K M, Prasad K, Harwani D and Mahna S 2008 Response of soybean cultivars toward inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium japonicum* in the alluvial soil. *European Journal of Soil Biology* 44, 316-323.
- Menaut J C 1983 The vegetation of African savannas. *In* Tropical savannas, Ed F Bourlière. Elsevier, Amsterdam.
- Menge L K and Kirkby E A 1982 Nitrogen. *In* Principles of plant nutrition, Eds L K Menge and E A Kirkby. pp 369-386. International Potash Institute, Bern, Switzerland.
- Menna P, Hungria M, Barcellos F G, Bangel E V, Hess P N and Martinez-Romero E 2006 Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 315-332.
- 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 Microbiology Ecology* 41, 77-84.
- Mhamdi R, Mrabet M, Laguerre G, Tiwari R and Aouani M E 2005 Colonization of *Phaseolus vulgaris* nodules by *Agrobacterium*-like strains. *Canadian Journal of Microbiology* 51, 105-111.
- Midgley J J and Bond W J 2001 A synthesis of the demography of African acacias. *Journal of Tropical Ecology* 17, 871-886.
- Miller J T, Andrew R and Bayer R J 2003 Molecular phylogenetics of the Australian acacias of subg. *Phyllodineae* (Fabaceae: Mimosoideae) based on the *trnK* intron. *Australian Journal of Botany* 51, 167-177.
- Miller J T and Bayer R J 2001 Molecular phylogenetics of *Acacia* (Fabaceae: Mimosoideae) based on the chloroplast *MATK* coding sequence and flanking *TRNK* intron spacer regions. *American Journal of Botany* 88, 697-705.
- Miller J T and Bayer R J 2003 Molecular phylogenetics of *Acacia* subgenera *Acacia* and *Aculeiferum* (Fabaceae : Mimosoideae), based on the chloroplast *matK* coding sequence and flanking *trnK* intron spacer regions. *Australian Systematic Botany* 16, 27-33.
- Mills A J 2006 The role of salinity and sodicity in the dieback of *Acacia xanthophloea* in Ngorongoro Caldera, Tanzania. *African Journal of Ecology* 44, 61-71.
- Mnasri B, Mrabet M, Laguerre G, Aouani M E and Mhamdi R 2007 Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N₂-fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel biovar (bv. *mediterranense*) of *Sinorhizobium meliloti*. *Archives in Microbiology* 187, 79-85.
- 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.
- Mohammed A, Sharma R S, Ali S and Babu C R 2001 Molecular diversity of the plasmid genotypes among *Rhizobium* gene pools of sesbanias from different habitats of a semi-arid region (Delhi). *FEMS Microbiology Letters* 205, 171-178.

- Monneveux P and Nemmar M 1986 Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et le blé dur (*Triticum durum* Desf.) Etude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement. *Agronomie* 6, 583-590.
- Moreira F, Gillis M, Pot B, Kersters K and Franco A 1993 Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Systematic and Applied Microbiology* 16, 135-146.
- Moreira F M d S, Cruz L, de Faria S M, Marsh T, Martinez-Romero E, Pedrosa F d O, Pitard M R and Peter W Y J 2006 *Azorhizobium doebereineriae* sp. Nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 197-206.
- Moreira F M d S, Haukka K and Young J P W 1998 Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. *Molecular Ecology* 7, 889-895.
- Moulin L, Béna G, Boivin-Masson C and Stepkowski T 2004 Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30, 720-732.
- Moulin L, Munive A, Dreyfus B and Boivin-Masson C 2001 Nodulation of legumes by members of the [beta]-subclass of Proteobacteria. *Nature* 411, 948-950.
- Mpeperek S, Makonese F and Wollum A G 1997 Physiological characterization of indigenous rhizobia nodulating *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils. *Symbiosis* 22, 275-292.
- Muhaisen H M H, Ilyas M, Mushfiq M, Parveen M and Basudan O A 2002 Flavonoids from *Acacia tortilis*. *Journal of Chemical Research* 2002, 276-278.
- Munns R 1993 Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell and Environment* 16, 15-24.
- Murray B R, Thrall P H and Woods M J 2001 *Acacia* species and rhizobial interactions: Implications for restoration of native vegetation. *Ecological Management & Restoration* 2, 213-219.
- Musiyiwa K, Mpeperek S and Giller K 2005 Symbiotic effectiveness and host ranges of indigenous rhizobia nodulating promiscuous soyabean varieties in Zimbabwean soils. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 1169-1176.
- Mutsaers M and Van Der Velden J 1973 Le dessalement des terres salées du delta du fleuve Sénégal. Bilan de trois années d'expérimentations (1970-1973) et perspectives. pp 73. PNUD/FAO/OMVS, Saint-Louis.
- Mylona P, Pawlowski K and Bisseling T 1995 Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell* 7, 869-885.
- Nakagawa Y, Sakane 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., sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 16-22.
- Nandasena K G, O'Hara G W, Tiwari R P, Sezmis E and Howieson J G 2007 In situ lateral transfer of symbiosis islands results in rapid evolution of diverse competitive strains of mesorhizobia suboptimal in symbiotic nitrogen fixation on the pasture legume *Biserrula pelecinus* L. *Environmental Microbiology* 9, 2496-2511.

- Nandasena K G, O'Hara G W, Tiwari R P, Willems A and Howieson J G 2009 *Mesorhizobium australicum* sp. nov. and *Mesorhizobium opportunistum* sp. nov., isolated from *Biserrula pelecinus* L. in Australia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 2140-2147.
- Napoli C and Albersheim P 1980 Infection and nodulation of clover by nonmotile *Rhizobium trifolii*. *Journal of Bacteriology* 141, 979-980.
- Naser S M, Thompson F L, Hoste B, Gevers D, Dawyndt P, Vancanneyt M and Swings J 2005 Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology* 151, 2141-2150.
- Nathan R 2006 Long-distance dispersal of plants. *Science* 313, 786-788.
- Nato A and Mathieu Y 1978 Changes in phosphoenolpyruvate carboxylase and rubulose-bisphosphate carboxylase activities during photoheterotrophic growth of *Nicotiana tabacum* cell suspension. *Plant Sciences Letters* 13, 49-56.
- Ndiaye J P 1999 Utilisation du phosphogypse dans les sols de la vallée alluviale du fleuve Sénégal. pp 10. Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, Dakar, Sénégal.
- Ndour P and Danthu P 1998 Effet des contraintes hydrique et saline sur la germination de quelques acacias africains. *In* *l'Acacia au Sénégal*, Eds C Campa, C Grignon, M Gueye and S Hamon. pp 105-122. ORSTOM, Paris, France.
- Ndoye I, de Billy F, Vasse J, Dreyfus B and Truchet G 1994 Root nodulation of *Sesbania rostrata*. *Journal of Bacteriology* 176, 1060-1068.
- Ndoye I, Gueye M, Danso S K A and Dreyfus B 1995 Nitrogen fixation in *Faidherbia albida*, *Acacia raddiana*, *Acacia senegal* and *Acacia seyal* estimated using the ¹⁵N isotope dilution technique. *Plant and Soil* 172, 175-180.
- Nedelcho B, Mohamed A, Roberto D and Maurizio I 1992 The expression of the *nodD* and *nodABC* genes of *Rhizobium leguminosarum* is not regulated in response to combined nitrogen. *FEMS Microbiology Letters* 97, 205-208.
- Ngom A, Nakagawa Y, Sawada H, Tsukahara J, Wakabayashi S, Uchiumi T, Nuntagij A, Kotepong S, Suzuki A, Higashi S and Abe M 2004 A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. *Journal of General and Applied Microbiology* 50, 17-27.
- Nicholas K B and Nicholas H B J 1997 GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
- Nick G, de Lajudie P, Eardly B D, Suomalainen S, Paulin L, Zhang X, Gillis M and Lindstrom K 1999 *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 1359-1368.
- Njiti C and Galiana A 1996 Symbiotic properties and *Rhizobium* requirements for effective nodulation of five tropical dry zone acacias. *Agroforestry Systems* 34, 265-275.
- Normand P, Cournoyer B, Simonet P and Nazaret S 1992 Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*. *Gene* 111, 119-124.

- Normand P, Ponsonnet C, Nesme X, Neyra M and Simonet P 1996 ITS analysis of prokariotes. In Molecular Microbial Ecology Manual, Eds A D L Akkermans, J D van Elsas and F J De Bruijn. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- 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. International Journal of Systematic Bacteriology 45, 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.). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 44, 511-522.
- Novak K, Chovanec P, Skrdleta V, Kropacova M, Lisa L and Nemcova M 2002 Effect of exogenous flavonoids on nodulation of pea (*Pisum sativum* L.). Journal of Experimental Botany 53, 1735-1745.
- Nowak P, Soupas L, Thomas-Oates J and Lindstrom K 2004 *Acacia senegal* and *Prosopis chilensis*-nodulating rhizobia *Sinorhizobium arboris* HAMBI 2361 and *S. kostiense* HAMBI 2362 produce tetra- and pentameric LCOs that are N-methylated, O-6-carbamoylated and partially sulfated. Carbohydrate Research 339, 1061-1067.
- Nuswantara S, Fujie M, Yamada T, Malek W, Inaba M, Kaneko Y and Murooka Y 1999 Phylogenetic position of *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei*, a symbiont of *Astragalus sinicus* cv. Japan. Journal of Bioscience and Bioengineering 87, 49-55.
- O'Neal D and Joy K W 1973 Glutamine synthetase of pea leaves. I. Purification, stabilization, and pH optima. Archives of biochemistry and biophysics 159, 113-122.
- Ochman H, Lawrence J G and Groisman E A 2000 Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature 405, 299-304.
- Oda Y and Ouchi K 1989 Principal-Component Analysis of the Characteristics Desirable in Baker's Yeasts. Applied and Environmental Microbiology 55, 1495-1499.
- Odee D W, Haukka K, McInroy S G, Sprent J I, Sutherland J M and Young J P W 2002 Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. Soil Biology and Biochemistry 34, 801-811.
- Odee D W, Sutherland J M, Kimiti J M and Sprent J I 1995 Natural rhizobial populations and nodulation status of woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. Plant and Soil 173, 211-224.
- Odee D W, Sutherland J M, Makatiani E T, McInroy S G and Sprent J I 1997 Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. Plant and Soil 188, 65-75.
- Oldroyd G E D 2001 Dissecting Symbiosis: Developments in Nod Factor Signal Transduction. Annals of Botany 87, 709-718.
- Oldroyd G E D and Downie J A 2004 Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. Nature Reviews Molecular Cell Biology 5, 566-576.

- Oldroyd G E D and Downie J A 2008 Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annual Review of Plant Biology* 59, 519-546.
- Oliveira V L, Schmidt V D B and Bellei M M 1997 Patterns of arbuscular- and ecto- mycorrhizal colonization of *Eucalyptus dunnii* in southern Brazil. *Annales des Sciences Forestières* 54, 473-481.
- Olsen G J 2001 The history of life. *Nature Genetics* 28, 197-198.
- Olsen S R, Cole C V, Watanabe F S and Dean L A 1954 Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. *In* USDA Circular 939. U.S. Department of Agriculture, Washington D.C.
- Ophel K and Kerr A 1990 *Agrobacterium vitis* sp. nov. for Strains of *Agrobacterium* biovar 3 from Grapevines. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40, 236-241.
- Palmer K M and Young J P W 2000 Higher Diversity of *Rhizobium leguminosarum* Biovar *viciae* Populations in Arable Soils than in Grass Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2445-2450.
- Palmieri M and Swatzell L J 2004 Mycorrhizal fungi associated with the fern *Cheilanthes lanosa*. *Northeastern Naturalist* 11, 57-66.
- Parker M A 1999 Mutualism in Metapopulations of Legumes and Rhizobia. *The American Naturalist* 153, 48-60.
- Parker S R 1997 Sequence Navigator. Multiple sequence alignment software. *In* Sequence Data Analysis Guidebook, Ed S R Swindell. pp 145-154. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Parniske M and Downie J A 2003 Plant biology: locks, keys and symbioses. *Nature* 425, 569-570.
- Patriarca E J, Tatè R, Ferraioli S and Laccarino M 2004 Organogenesis of legume root nodules. *International Review of Cytology* 234, 201-262.
- Patt T E, Cole G C and Hanson R S 1976 *Methylobacterium*, a New Genus of Facultatively Methylophilic Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 26, 226-229.
- Pawlowski K and Bisseling T 1996 Rhizobial and Actinorhizal Symbioses. *Plant Cell* 8, 1899-1913.
- Pedrosa F O, Benelli E M, Yates M G, Wasseem R, Monteiro R A, Klassen G, Steffens M B, Souza E M, Chubatsu L S and Rigo L U 2001 Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. *Journal of Biotechnology* 91, 189-195.
- Peng G, Yuan Q, Li H, Zhang W and Tan Z 2008 *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 2158-2163.
- Peng G, Zhang W, Luo H, Xie H, Lai W and Tan Z 2009 *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1650-1655.
- Pennington R T, Richardson J E and Lavin M 2006 Insights into the historical construction of species-rich biomes from dated plant phylogenies, neutral ecological theory and phylogenetic community structure. *New Phytologist* 172, 605-616.

- Perret X, Staehelin C and Broughton W J 2000 Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 180-201.
- Perriere G and Gouy M 1996 WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* 78, 364-369.
- Peter H, Burkovski A and Kramer R 1996 Isolation, characterization, and expression of the *Corynebacterium glutamicum* betP gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine. *Journal of Bacteriology* 178, 5229-5234.
- Peters N K and Verma D P 1990 Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe relations. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3, 4-8.
- Phillips J M and Hayman D S 1970 Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55, 158-161.
- Plenchette C, Perrin R and Duvert P 1989 The concept of soil infectivity and method for its determination as applied to endomycorrhizas. *Canadian Journal of Botany* 67, 12-115.
- Polhill R M, Raven P H and Stirton C H 1981 Evolution and systematics of the Leguminosae. *In* *Advances in Legume Systematics, part 1*, Eds R M Polhill and P H Raven. pp 1-26. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Ponsonnet C and Nesme X 1994 Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. *Archives in Microbiology* 161, 300-309.
- Provorov N, Vorobyov N and Andronov E 2008 Macro- and microevolution of bacteria in symbiotic systems. *Russian Journal of Genetics* 44, 6-20.
- Provorov N A 1998 Coevolution of rhizobia with legumes: Facts and hypotheses. *Symbiosis* 24, 337-367.
- Provorov N A 1994 The interdependence between taxonomy of legumes and specificity of their interaction with rhizobia in relation to evolution of the symbiosis. *Symbiosis* 17, 183-200.
- Pueppke S G and Broughton W J 1999 *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 293-318.
- Quan Z-X, Bae H-S, Baek J-H, Chen W-F, Im W-T and Lee S-T 2005 *Rhizobium daejeonense* sp. nov. isolated from a cyanide treatment bioreactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 2543-2549.
- Racher K I, Culham D E and Wood J M 2001 Requirements for Osmosensing and Osmotic Activation of Transporter ProP from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 40, 7324-7333.
- Radutoiu S, Madsen L H, Madsen E B, Felle H H, Umehara Y, Gronlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N and Stougaard J 2003 Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425, 585-592.
- Radutoiu S, Madsen L H, Madsen E B, Jurkiewicz A, Fukai E, Quistgaard E M H, Albrektsen A S, James E K, Thirup S and Stougaard J 2007 LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. *EMBO Journal* 26, 3923-3935.

- Rai A N, Soderback E and Bergman B 2000 *Cyanobacterium*–plant symbioses. *New Phytologist* 147, 449-481.
- Ramirez-Bahena M H, Garcia-Fraile P, Peix A, Valverde A, Rivas R, Igual J M, Mateos P F, Martinez-Molina E and Velazquez E 2008 Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 2484-2490.
- Ramirez-Bahena M H, Peix A, Rivas R, Camacho M, Rodriguez-Navarro D N, Mateos P F, Martinez-Molina E, Willems A and Velazquez E 2009 *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1929-1934.
- Rangin C, Brunel B, Cleyet-Marel J-C, Perrineau M-M and Bena G 2008 Effects of *Medicago truncatula* genetic diversity, rhizobial competition, and strain effectiveness on the diversity of a natural *Sinorhizobium* species community. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 5653-5661.
- Räsänen L A, Sprent J I and Lindström K 2001 Symbiotic properties of sinorhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis* nodules in Sudan and Senegal. *Plant and Soil* 235, 193-210.
- Raubuch M and Beese F 2005 Influence of soil acidity on depth gradients of microbial biomass in beech forest soils. *European Journal of Forest Research* 124, 87-93.
- Requena N, Perez-Solis E, Azcon-Aguilar C, Jeffries P and Barea J-M 2001 Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 495-498.
- Richards L A 1954 Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils. *Soil Science* 78, 154.
- Rivas R, Laranjo M, Mateos P F, Oliveira S, Martinez-Molina E and Velazquez E 2007 Strains of *Mesorhizobium amorphae* and *Mesorhizobium tianshanense*, carrying symbiotic genes of common chickpea endosymbiotic species, constitute a novel biovar (*ciceri*) capable of nodulating *Cicer arietinum*. *Letters in Applied Microbiology* 44, 412-418.
- Rivas R, Velazquez E, Willems A, Vizcaino N, Subba-Rao N S, Mateos P F, Gillis M, Dazzo F B and Martínez-Molina E 2002 A new species of *Devosia* that forms a nitrogen-fixing rootnodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5217-5222.
- Rivas R, Willems A, Palomo J L, Garcia-Benavides P, Mateos P F, Martinez-Molina E, Gillis M and Velazquez E 2004 *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1271-1275.
- Rivas R, Willems A, Subba-Rao N S, Mateos P F, Dazzo F B, Kroppenstedt R M, Martinez-Molina E, Gillis M and Velazquez E 2003 Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Systematic and Applied Microbiology* 26, 47-53.
- Roberts E, Sethi A, Montoya J, Woese C R and Luthey-Schulten Z 2008 Molecular signatures of ribosomal evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 13953-13958.

- Robinson J and Harris S A 2000 A plastid DNA phylogeny of the genus *Acacia* Miller (*Acaciaeae*, *Leguminosae*). *Botanical Journal of the Linnean Society* 132, 195-222.
- Roche P, Maillet F, Plazanet C, Debelle F, Ferro M, Truchet G, Prome J C and Denarie J 1996 The common nodABC genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 15305-15310.
- Rogel M A, Hernandez-Lucas I, Kuykendall L D, Balkwill D L and Martinez-Romero E 2001 Nitrogen-fixing nodules with *Ensifer adhaerens* harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3264-3268.
- Rogers M E, Grieve C M and Shannon M C 2003 Plant growth and ion relations in lucerne (*Medicago sativa* L.) in response to the combined effects of NaCl and P. *Plant and Soil* 253, 187-194.
- Romdhane S B, Nasr H, Samba-Mbaye R, Neyra M and Ghorbal M H 2005 Diversity of *Acacia tortilis* rhizobia revealed by PCR/RFLP on crushed root nodules in Tunisia. *Annals of Microbiology* 55, 249-258.
- Romdhane S B, Nasr H, Samba-Mbaye R, Neyra M, Ghorbal M H and De Lajudie P 2006 Genetic diversity of *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* rhizobia in Tunisia assessed by 16S and 16S-23S rDNA genes analysis. *Journal of Applied Microbiology* 100, 436-445.
- Rome S, Fernandez M P, Brunel B, Normand P and Cleyet-Marel J C 1996 *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 972-980.
- Rossello-Mora R 2006 DNA-DNA reassociation methods applied to microbial taxonomy and their critical evaluation. *In* *Molecular Identification, Systematics and Population Structure of Prokaryotes*, Ed E Stackebrandt. pp 23-50. Springer, Berlin.
- Rouvier C, Prin Y, Reddell P, Normand P and Simonet P 1996 Genetic diversity among Frankia strains nodulating members of the family Casuarinaceae in Australia revealed by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis with crushed root nodules. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 979-985.
- Rubenhagen R, Ronsch H, Jung H, Kramer R and Morbach S 2000 Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *Journal of Biological Chemistry* 275, 735-741.
- Ruiz-Diez B, Fajardo S, Puertas-Mejia M, Felipe M and Fernandez-Pascua M 2009 Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. *Archives of Microbiology* 191, 35-46.
- Ruiz-Lozano J M and Azcón R 2000 Symbiotic efficiency and infectivity of an autochthonous arbuscular mycorrhizal *Glomus* sp. from saline soils and *Glomus deserticola* under salinity. *Mycorrhiza* 10, 137-143.
- Sadio S 1986 Etude pédologique des facteurs de mortalité des essences forestières introduites en milieux sales au Sénégal. *In* *Reboisement des Niayes et du Sine-Saloum*. pp 105. ORSTOM, Dakar, Sénégal.
- Sadio S 1991 Pédogénese et potentialités forestières des sols sulfatés acides salés des tannes du Sine Saloum, Sénégal. ORSTOM, Bondy, France. 269 p.

- Sadowsky M J and Graham P H 1998 Soil biology of the Rhizobiaceae. *In* The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-associated bacteria, Eds H P Spaink, A Kondorosi and P J J Hooykaas. pp 155–172. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Saier M H, Jr. 1994 Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleaned evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 58, 71-93.
- Saitou N and Nei M 1987 The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
- Sall S N, Masse D, Ndour N Y B and Chotte J-L 2006 Does cropping modify the decomposition function and the diversity of the soil microbial community of tropical fallow soil? *Applied Soil Ecology* 31, 211-219.
- Sanger F, Air G M, Barrell B G, Brown N L, Coulson A R, Fiddes C A, Hutchison C A, Slocombe P M and Smith M 1977 Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265, 687-695.
- Santiago G M, Garcia Q and Scotti M R 2002 Effect of post-planting inoculation with *Bradyrhizobium* sp and mycorrhizal fungi on the growth of Brazilian rosewood, *Dalbergia nigra* Allem. ex Benth., in two tropical soils. *New Forests* 24, 15-25.
- Santoro M M, Liu Y, Khan S M A, Hou L X and Bolen D W 1992 Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochemistry* 31, 5278-5283.
- Sarr A, Neyra M, Houeibib M, Ndoye I, Oihabi A and Lesueur D 2005 Rhizobial Populations in Soils from Natural *Acacia senegal* and *Acacia nilotica* Forests in Mauritania and the Senegal River Valley. *Microbial Ecology* 50, 152-162.
- Sawada H, Kuykendall L D and Young J M 2003 Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *The Journal of General and Applied Microbiology* 49, 155-179.
- Saxena A, Shende R and Grover M 2006 Interactions among beneficial microorganisms. *In* *Microbial Activity in the Rhizosphere*. pp 121-137.
- Schlaman H R, Lugtenberg B J and Okker R J 1992 The NodD protein does not bind to the promoters of inducible nodulation genes in extracts of bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Journal of Bacteriology* 174, 6109-6116.
- Scholla M H, Moorefield J A and Elkan G H 1984 Deoxyribonucleic Acid Homology Between Fast-Growing Soybean-Nodulating Bacteria and Other Rhizobia. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34, 283-286.
- Schrire B D, Lavin M and Lewis G P 2005 Global distribution patterns of the Leguminosae: insights from recent phylogenies. *Biologiske Skrifter* 55, 375-422.
- Schultze M and Kondorosi A 1998 Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual Review of Genetics* 32, 33-57.
- Schultze M, Kondorosi E, Ratet P, Buire M and Kondorosi A 1994 Cell and molecular biology of Rhizobium-plant interactions. *International Review of Cytology* 156, 1-75.

- Segovia L, Pinero D, Palacios R and Martinez-Romero E 1991 Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 426-433.
- Segovia L, Young J P W and Martinez-Romero E 1993 Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* Biovar *Phaseoli* Type I Strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43, 374-377.
- Sepkoski J J 1974 Quantified coefficients of association and measurement of similarity. *Mathematical Geology* 6, 135-152.
- Serraj R 2002 Response of symbiotic nitrogen fixation to drought and salinity. *Physiology and Molecular Biology of Plant* 8, 77-86.
- Sevilla M, Burris R H, Gunapala N and Kennedy C 2001 Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif- mutants strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 358-366.
- Sheng M, Tang M, Chen H, Yang B, Zhang F and Huang Y 2008 Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza* 18, 287-296.
- Silveira J A G, Melo A R B, Viégas R A and Oliveira J T A 2001 Salinity-induced effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. *Environmental and Experimental Botany* 46, 171-179.
- Silveira J A G, Viegas R d A, da Rocha I M A, Moreira A C d O M, Moreira R d A and Oliveira J T A 2003 Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. *Journal of Plant Physiology* 160, 115-123.
- Simms E L and Taylor D L 2002 Partner Choice in Nitrogen-Fixation Mutualisms of Legumes and Rhizobia. *Integrative and Comparative Biology* 42, 369-380.
- Singleton P W and Bohlool B B 1984 Effect of salinity on nodule formation by soybean. *Plant Physiology* 74, 72-76.
- Singleton P W, El Swaify S A and Bohlool B B 1982 Effect of salinity on rhizobium growth and survival. *Applied and Environmental Microbiology* 44, 884-890.
- Sluijs A, Schouten S, Pagani M, Woltering M, Brinkhuis H, Sinninghe Damste J S, Dickens G R, Huber M, Reichert G J, Stein R, Matthiessen J, Lourens L J, Pedentchouk N, Backman J and Moran K 2006 Subtropical Arctic Ocean temperatures during the Palaeocene/Eocene thermal maximum. *Nature* 441, 610-613.
- Smith S and Read D 1997 *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, New York.
- Sneath P H A 1957 The Application of Computers to Taxonomy. *Journal of General Microbiology* 17, 201-226.
- Sneath P H A and Sokal R R 1973 *Numerical Taxonomy: the Principles and Practice of Numerical Classification*. Freeman, San Francisco. 573 p.
- Sokal R R and Sneath P H A 1963 *Principles of numerical Taxonomy*. Freeman, W H, San Francisco. 359 p.

- Soltis D E, Soltis P S, Chase M W, Mort M E, Albach D C, Zanis M, Savolainen V, Hahn W H, Hoot S B, Fay M F, Axtell M, Swensen S M, Prince L M, Kress J W, Nixon K C and Farris J S 2000 Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* 233, 381-461.
- Soltis D E, Soltis P S, Morgan D R, Swensen S M, Mullin B C, Dowd J M and Martin P G 1995 Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 92, 2647-2651.
- Somasegaran P and Hoben H J 1994 *Handbook for Rhizobia*. Springer-Verlag, New York.
- Soussi M, Lluch C and Ocana A 1999 Comparative study of nitrogen fixation and carbon metabolism in two chick-pea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under salt stress. *Journal of Experimental Botany* 50, 1701-1708.
- Soussi M, Ocana A and Lluch C 1998 Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Experimental Botany* 49, 1329-1337.
- Spaink H P 2000 Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Review of Microbiology* 54, 257-288.
- Spaink H P, Wijffelman C A, Pees E, Okker R J H and Lugtenberg B J J 1987 Rhizobium nodulation gene nodD as a determinant of host specificity. *Nature* 328, 337-340.
- Sprent J I 2007 Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytologist* 174, 11-25.
- Sprent J I 2001 *Nodulation in Legumes*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Sprent J I 1989 Which steps are essential for the formation of functional legume nodules? *New Phytologist* 111, 129-153.
- Sprent J I and James E K 2008 Legume-rhizobial symbiosis: an anorexic model? *New Phytologist* 179, 3-5.
- Sprent J I, Odee D W and Dakora F D 2009 African legumes: a vital but under-utilized resource. *Journal of Experimental Botany*, erp342.
- Squartini A, Struffi P, Doring H, Selenska-Pobell S, Tola E, Giacomini A, Vendramin E, Velazquez 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1267-1276.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity G M, Grimont P A D, Kampfer P, Maiden M C J, Nesme X, Rossello-Mora R, Swings J, Truper H G, Vauterin L, Ward A C and Whitman W B 2002 Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1043-1047.
- Stackebrandt E and Liesack W 1993 Nucleic acids and classification. *In Handbook of New Bacterial Systematics*, Ed A G O'Donnell. pp 151-194. Academic Press, London, UK.

- Stanley J and Cervantes E 1991 Biology and genetics of the broad host range *Rhizobium* sp. NGR234. *Journal of Applied Bacteriology* 70, 9-19.
- Stepkowski T, Swiderska A, Miedzinska K, Czaplinska M, Swiderski M, Biesiadka J and Legocki A B 2003 Low sequence similarity and gene content of symbiotic clusters of *Bradyrhizobium* sp. WM9 (*Lupinus*) indicate early divergence of "lupin" lineage in the genus *Bradyrhizobium*. *Ant van Leeuw* 84, 115-124.
- Stevenson F J 1986 The internal cycle of nitrogen in soil. *In* Cycles and soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients, Ed F J Stevenson. pp 155-216. Wiley, New York.
- Suarez M F, Avila C, Gallardo F, Canton F R, Garcia-Gutierrez A, Claros M G and Canovas F M 2002 Molecular and enzymatic analysis of ammonium assimilation in woody plants. *Journal of Experimental Botany* 53, 891-904.
- Subba-Rao N S, Mateos P F, Baker D, Pankratz H, Palma J, Dazzo F B and Sprent J I 1995 The unique root-nodule symbiosis between *Rhizobium* and the aquatic legume, *Neptunia natans* (L. f.) Druce. *Planta* 196, 311-320.
- 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*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2818-2825.
- Sullivan J T and Ronson C W 1998 Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 5145-5149.
- Sullivan J T, Trzebiatowski J R, Cruickshank R W, Gouzy J, Brown S D, Elliot R M, Fleetwood D J, McCallum N G, Rossbach U, Stuart G S, Weaver J E, Webby R J, De Bruijn F J and Ronson C W 2002 Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *Journal of Bacteriology* 184, 3086-3095.
- Suominen L, Roos C, Lortet G, Paulin L and Lindstrom K 2001 Identification and Structure of the *Rhizobium galegae* Common Nodulation Genes: Evidence for Horizontal Gene Transfer. *Molecular Biology and Evolution* 18, 907-916.
- Surange S, Wollum A I, Kumar N and Nautiyal C 1997 Characterization of *Rhizobium* from root nodules of leguminous trees growing in alkaline soils. *Canadian Journal of Microbiology* 43, 891-894.
- Sutherland J M, Odee D W, Muluvi G M, McInroy S G and Patel A 2000 Single and multi-strain rhizobial inoculation of African acacias in nursery conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 323-333.
- Swelim D M, Hashem F M, Kuykendall L D, Hegazi N I and Abdel-Wahab S M 1997 Host specificity and phenotypic diversity of *Rhizobium* strains nodulating *Leucaena*, *Acacia*, and *Sesbania* in Egypt. *Biology and Fertility of Soils* 25, 224-232.
- 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.

- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S 2007 MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.
- 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.
- Teklay T, Nordgren A and Malmer A 2006 Soil respiration characteristics of tropical soils from agricultural and forestry land-uses at Wondo Genet (Ethiopia) in response to C, N and P amendments. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 125-133.
- Terefework Z, Kajjalainen 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*. *Journal of Biotechnology* 91, 169-180.
- Terefework Z, Nick G, Suomalainen S, Paulin L and Lindstrom K 1998 Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 349-356.
- Thiao M, Neyra M, Isidore E, Sylla S and Lesueur D 2004 Diversity and effectiveness of rhizobial strains from *Gliricidia sepium* native to Reunion Island, Kenya and New Caledonia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, 703-709.
- Thioulouse J, Chessel D, Dolédec S and Olivier J-M 1997 ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing* 7, 75-83.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins D G 1997 The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25, 4876-4882.
- Thrall P H, Bever J D and Slattery J F 2008 Rhizobial mediation of *Acacia* adaptation to soil salinity: evidence of underlying trade-offs and tests of expected patterns. *Journal of Ecology* 96, 746-755.
- Thrall P H, Millsom D A, Jeavons A C, Waayers M, Harvey G R, Bagnall D J and Brockwell J 2005 Seed inoculation with effective root-nodule bacteria enhances revegetation success. *Journal of Applied Ecology* 42, 740-751.
- Thrall P H, Slattery J F, Broadhurst L M and Bickford S 2007 Geographic patterns of symbiont abundance and adaptation in native Australian *Acacia*-rhizobia interactions. *Journal of Ecology* 95, 1110-1122.
- Tian C F, Wang E T, Wu L J, Han T X, Chen W F, Gu C T, Gu J G and Chen W X 2008 *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 2871-2875.
- Timmers A C, Auriac M C and Truchet G 1999 Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* 126, 3617-3628.
- Timmers A C J, Soupène E, Auriac M-C, de Billy F, Vasse J, Boistard P and Truchet G 2000 Saprophytic Intracellular Rhizobia in Alfalfa Nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 1204-1213.

- Tobe K, Li X and Omasa K 2000 Seed germination and radicle growth of a halophyte, *Kalidium capsicum* (Chenopodiaceae). *Annals of Botany* 85, 391-396.
- Toledo I, Lloret L and Martinez-Romero E 2003 *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a New *Sinorhizobium* Species Nodulating Native *Acacia* spp. in Mexico. *Systematic and Applied Microbiology* 26, 54-64.
- Torto-Alalibo T, Collmer C W, Lindeberg M, Bird D, Collmer A and Tyler B M 2009 Common and contrasting themes in host cell-targeted effectors from bacterial, fungal, oomycete and nematode plant symbionts described using the Gene Ontology. *BMC Microbiology* 9 Suppl 1, S3.
- Trappe J M, Molina R and Castellano M 1984 Reactions of mycorrhizal fungi and mycorrhiza formation to pesticides. *Annual Review of Phytopathology* 22, 331-359.
- Trinick M J and Galbraith J 1976 Structure of root nodules formed by *Rhizobium* on the non-legume *Trema cannabina* var. *scabra*. *Archives of Microbiology* 108, 159-166.
- Triplett E W 2000 Prokaryotic nitrogen fixation – a model system for the analysis of a biological process. Horizon Scientific Press, Norfolk, UK. 800 p.
- Trouvelot A, Fardeau J C, Plenchette C, Gianinazzi S and Gianinazzi-Pearson V 1986 Nutritional balance and symbiotic expression in mycorrhizal wheat. *Physiologie Vegetale* 24, 300.
- Trujillo M E, Willems A, Abril A, Planchuelo A-M, Rivas R, Ludena D, Mateos P F, Martinez-Molina E and Velazquez E 2005 Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1318-1327.
- Tsien H C, Dreyfus B L and Schmidt E L 1983 Initial stages in the morphogenesis of nitrogen-fixing stem nodules of *Sesbania rostrata*. *Journal of Bacteriology* 156, 888-897.
- Tun-Garrido C, Bustos P, Gonzalez V and Brom S 2003 Conjugative transfer of p42a from *rhizobium etli* CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by quorum sensing. *Journal of Bacteriology* 185, 1681-1692.
- Ueda K, Seki T, Kudo T, Yoshida T and Kataoka M 1999 Two Distinct Mechanisms Cause Heterogeneity of 16S rRNA. *Journal of Bacteriology* 181, 78-82.
- Valverde A, Igual J M, Peix A, Cervantes E and Velazquez E 2006 *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 2631-2637.
- Valverde A, Velazquez E, Fernandez-Santos F, Vizcaino N, Rivas R, Mateos P F, Martinez-Molina E, Igual J M and Willems A 2005 *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1985-1989.
- Valverde A, Velazquez E, Gutierrez C, Cervantes E, Ventosa A and Igual J M 2003 *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1979-1983.
- van Berkum P, Beyene D, Bao G, 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]. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 13-22.

- van Berkum P and Eardly B D 2002 The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* Is a Nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. Applied and Environmental Microbiology 68, 1132-1136.
- van Berkum P and Fuhrmann J J 2000 Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50, 2165-2172.
- van Berkum P, Terefework Z, Paulin L, Suomalainen S, Lindstrom K and Eardly B D 2003 Discordant Phylogenies within the *rrn* Loci of Rhizobia. Journal of Bacteriology 185, 2988-2998.
- van Der Heide T and Poolman B 2000 Glycine betaine transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity. Journal of Bacteriology 182, 203-206.
- van der Heijden M G A, Klironomos J N, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A and Sanders I R 1998 Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. Nature 396, 69-72.
- van Rhijn P and Vanderleyden J 1995 The Rhizobium-plant symbiosis. Microbiological Reviews 59, 124-142.
- Vandamme P and Coenye T 2004 Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 2285-2289.
- 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. Systematic and Applied Microbiology 25, 507-512.
- Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K and Swings J 1996 Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiological Reviews 60, 407-438.
- Vauterin L, Yang P and Swings J 1996 Utilization of Fatty Acid Methyl Esters for the Differentiation of New *Xanthomonas* Species. International Journal of Systematic Bacteriology 46, 298-304.
- Vega-Hernández M C, Pérez-Galdona R, Dazzo F B, Jarabo-Lorenzo A, Alfayate M C and León-Barrios M 2001 Novel infection process in the indeterminate root nodule symbiosis between *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste) and *Bradyrhizobium* sp. New Phytologist 150, 707-721.
- Velazquez E, Igual J M, Willems A, Fernandez M P, Munoz E, Mateos P F, Abril A, Toro N, Normand P, Cervantes E, Gillis M and Martinez-Molina E 2001 *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51, 1011-1021.
- Venekamp J H 1989 Regulation of cytosol acidity in plants under conditions of drought. Physiologia Plantarum 76, 112-117.
- Vestberg M, Saari K, Kukkonen S and Hurme T 2005 Mycotrophy of crops in rotation and soil amendment with peat influence the abundance and effectiveness of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi in field soil. Mycorrhiza 15, 447-458.
- Vicente O, Boscain M, Naranjo M A, Estrella E, Bellé J M and Soriano P 2004 Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (Plantaginaceae). Journal of Arid Environments 58, 463-481.

- Vidal C, Chantreuil C, Berge O, Maure L, Escarre J, Bena G, Brunel B and Cleyet-Marel J-C 2009 *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metalcolous soil in Languedoc, France. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 850-855.
- Villagra P E and Cavagnaro J B 2005 Effects of salinity on the establishment and early growth of *Prosopis argentina* and *Prosopis alata* seedlings in two contrasting soils: Implications for their ecological success. *Austral Ecology* 30, 325-335.
- Vincent J M 1970 A Manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Biological Programme. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Vinuesa P, Leon-Barrios M, Silva C, Willems A, Jarabo-Lorenzo A, Perez-Galdona R, Werner D and Martinez-Romero E 2005 *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 569-575.
- von Maydell H-J 1983 Arbres et arbustes du Sahel, leurs caractéristiques et leurs utilisations. Verlag Josef Margraf Weikersheim, Allemagne. 531 p.
- Wais R J, Keating D H and Long S R 2002 Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Physiology* 129, 211-224.
- Wang E T, Tan Z Y, Willems A, Fernandez-Lopez M, Reinhold-Hurek B and Martinez-Romero E 2002 *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 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*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 687-699.
- Wang E T, van Berkum P, Sui X H, Beyene D, Chen W X and Martinez-Romero E 1999 Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49 Pt 1, 51-65.
- Wang F Q, Wang E T, Liu J, Chen Q, Sui X H, Chen W F and Chen W X 2007 *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1192-1199.
- Wardle D A, Yeates G W, Barker G M and Bonner K I 2006 The influence of plant litter diversity on decomposer abundance and diversity. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1052-1062.
- 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. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37, 463-464.

- Weber J, Ducouso M, Tham F Y, Nourissier-Mountou S, Galiana A, Prin Y and Lee S K 2005 Co-inoculation of *Acacia mangium* with *Glomus intraradices* and *Bradyrhizobium* sp. in aeroponic culture. *Biology and Fertility of Soils* 41, 233-239.
- Wei G, Chen W, Young J P and Bontemps C 2009 A new clade of *Mesorhizobium* nodulating *Alhagi sparsifolia*. *Systematic and Applied Microbiology* 32, 8-16.
- 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1575-1583.
- 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*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 2231-2239.
- Welsh D T 2000 Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Reviews* 24, 263-290.
- Wernegreen J J and Riley M A 1999 Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. *Molecular Biology and Evolution* 16, 98-113.
- Wickens G E, Seif El Din A G, Sita G and Nahal I 1995 Role of *Acacia* species in the rural economy of dry Africa and the near East. FAO Forestry Dept., Rome (Italy). 138 p.
- Willems A, Coopman R and Gillis M 2001 Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridizations in *Bradyrhizobium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 623-632.
- Wilson A C, Carlson S S and White T J 1977 Biochemical evolution. *Annual Review of Biochemistry* 46, 573-639.
- Woese C R 1987 Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51, 221-271.
- Woese C R 2000 Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 8392-8396.
- Woese C R and Fox G E 1977 Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 74, 5088-5090.
- Woese C R, Kandler O and Wheelis M L 1990 Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87, 4576-4579.
- Wood D W, Setubal J C, Kaul R, Monks D E, Kitajima J P, Okura V K, Zhou Y, Chen L, Wood G E, Almeida N F, Jr., Woo L, Chen Y, Paulsen I T, Eisen J A, Karp P D, Bovee D, Sr., Chapman P, Clendenning J, Deatherage G, Gillet W, Grant C, Kutayavin T, Levy R, Li M J, McClelland E, Palmieri A, Raymond C, Rouse G, Saenphimmachak C, Wu Z, Romero P, Gordon D, Zhang S, Yoo H, Tao Y, Biddle P, Jung M, Krespan W, Perry M, Gordon-Kamm B, Liao L, Kim S, Hendrick C, Zhao Z Y, Dolan M, Chumley F, Tingey S V, Tomb J F, Gordon M P, Olson M V and Nester E W 2001 The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294, 2317-2323.

- Xu L M, Ge C, Cui Z, Li J and Fan H 1995 *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 706-711.
- 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) comb. nov. *Microbiology and Immunology* 36, 1251-1275.
- Yang J, Kloepper J W and Ryu C-M 2009 Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science* 14, 1-4.
- 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 2219-2230.
- Yap W H, Zhang Z and Wang Y 1999 Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon. *Journal of Bacteriology* 181, 5201-5209.
- Yokota S 2003 Relationship between salt tolerance and proline accumulation in Australian acacia species. *Journal of Forest Research* 8, 89-93.
- Young J M 2003 The genus name *Ensifer Casida* 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination "*Sinorhizobium adhaerens*" (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 2107-2110.
- 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*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 89-103.
- Young J P, Crossman L C, Johnston A W, Thomson N R, Ghazoui Z F, Hull K H, Wexler M, Curson A R, Todd J D, Poole P S, Mauchline T H, East A K, Quail M A, Churcher C, Arrowsmith C, Cherevach I, Chillingworth T, Clarke K, Cronin A, Davis P, Fraser A, Hance Z, Hauser H, Jagels K, Moule S, Mungall K, Norbertczak H, Rabinowitsch E, Sanders M, Simmonds M, Whitehead S and Parkhill J 2006 The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biology* 7, R34.
- Young J P W 1992 Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. *In* *Biological Nitrogen Fixation*, Eds G Stacey, R H Burris and H J Evans. pp 43-86. Chapman and Hall, New York.
- Young J P W and Johnston A W B 1989 The evolution of specificity in the legume-rhizobium symbiosis. *Trends in Ecology and Evolution* 4, 341-349.
- Young P J W and Haukka K E 1996 Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytologist* 133, 87-94.
- Zahran H H 2001 Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology* 91, 143-153.

- Zahrán H H 1999 Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 968-989.
- Zak J C, Willig M R, Moorhead D L and Wildman H G 1994 Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 1101-1108.
- Zakhia F, Jeder H, Willems A, Gillis M, Dreyfus B and de Lajudie P 2006 Diverse bacteria associated with root Nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH -like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microbial Ecology* 51, 375-393.
- Zavarzin G A 1961 [Budding bacteria]. *Mikrobiologiya* 30, 952-975.
- Zeng N 2003 Atmospheric science. Drought in the Sahel. *Science* 302, 999-1000.
- 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. *Letters in Applied Microbiology* 30, 351-357.
- Zhang G, Peng G, Wang E, Yan H, Yuan Q, Zhang W, Lou X, Wu H and Tan Z 2008 Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufipogon* and description of *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. nov. *Archives of Microbiology* 189, 431-439.
- Zhang X-X, Kosier B and Priefer U B 2001 Genetic diversity of indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolates nodulating two different host plants during soil restoration with alfalfa. *Molecular Ecology* 10, 2297-2305.
- Zhang X-X, Turner S L, Guo X-W, Yang H-J, DeBelle F, Yang G-P, Denarie J, Young J P W and Li F-D 2000 The Common nodulation genes of *Astragalus sinicus* Rhizobia are conserved despite chromosomal diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2988-2995.
- Zhang X, Harper R, Karsisto M and Lindström K 1991 Diversity of rhizobium bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 41, 104-113.
- Zou N, Dart P J and Marcar N E 1995 Interaction of salinity and rhizobial strain on growth and N₂-fixation by *Acacia ampliceps*. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 409-413.
- Zuckerkindl E and Pauling L B 1965 Evolutionary divergence and convergence in proteins. *In* *Evolving Genes and Proteins*, Eds V Bryson and H J Vogel. pp 97-166. Academic Press, New York.
- Zuckerkindl E and Pauling L B 1962 Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity. *In* *Horizons in Biochemistry*, Eds M Kasha and B Pullman. pp 189-225. Academic Press, New York.
- Zurdo-Pineiro J L, Rivas R, Trujillo M E, Vizcaino N, Carrasco J A, Chamber M, Palomares A, Mateos P F, Martínez-Molina E and Velázquez E 2007 *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 784-788.

ANNEXES**ANNEXE 1 : Préparation des solutions**TAE 50X

Tris-Base 242 g
 Acide acétique glacial 57,1 ml
 EDTA (0,5 M, pH 8) 10 ml
 Eau MilliQ 1000 ml
 Autoclaver 20 min à 120°C

DNTP 2,5 mM

dATP (100 mM) 10 µl
 dCTP (100 mM) 10 µl
 dGTP (100 mM) 10 µl
 dTTP (100 mM) 10 µl
 Eau milliQ stérile 360 µl

Amorces

Pour diluer à 1/15 une solution mère à 300 pmol et obtenir une solution à 20 pmol utilisable pour les mélanges réactionnels PCR.

Amorces (300 pmol) 10 µl
 Eau milliQ stérile 360 µl
 dGTP (100 mM) 10 µl
 dTTP (100 mM) 10 µl
 Conserver à -20°C.

TE 8

Tris-Base 6,057 g (0,05 M)
 EDTA disodique 7,448 g (0,02 M)
 Qsp 1000 ml
 pH 8 (avec HCl 1M)

EDTA 0,5 M, pH 8 (solution mère)

EDTA 93,075 g
 Eau déminéralisée 300 ml
 Qsp 500 ml
 Ajuster le pH à 8 avec des cristaux de NaOH
 Stériliser à 120°C pendant 20 min.

TAE 50X

Tris-Base 242 g
 Acide acétique glacial 57,1 ml
 EDTA (0,5 M, pH 8) 10 ml
 Eau MilliQ 1000 ml
 Autoclaver 20 min à 120°C

TBE 10X

Tris-Base 108 g
 Acide borique 55 g
 Na₂EDTA, 2H₂O 7,44 g
 H₂O 1000 ml
 Autoclaver 20 min à 120°C

Acétate de sodium 3M pH 5,2

Acétate de sodium 102 g
 Eau déminéralisée 200 ml
 Ajuster le volume à 500 ml puis ajuster le pH à 5,2 avec de l'acide acétique
 glacial et stériliser à 120°C pendant 20 min.

DNTP 2,5 mM

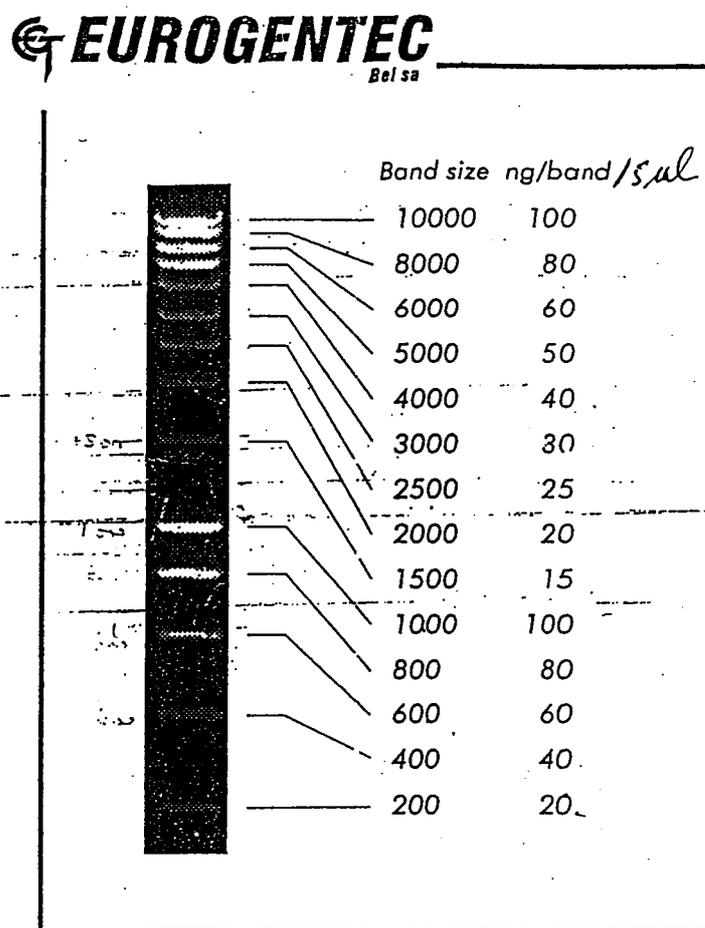
dATP (100 mM) 10 µl
 dCTP (100 mM) 10 µl
 dGTP (100 mM) 10 µl
 dTTP (100 mM) 10 µl
 Eau milliQ stérile 360 µl

Amorces

Pour diluer à 1/15 une solution mère à 300 pmol et obtenir une solution à 20 pmol utilisable
 pour les mélanges réactionnels PCR.

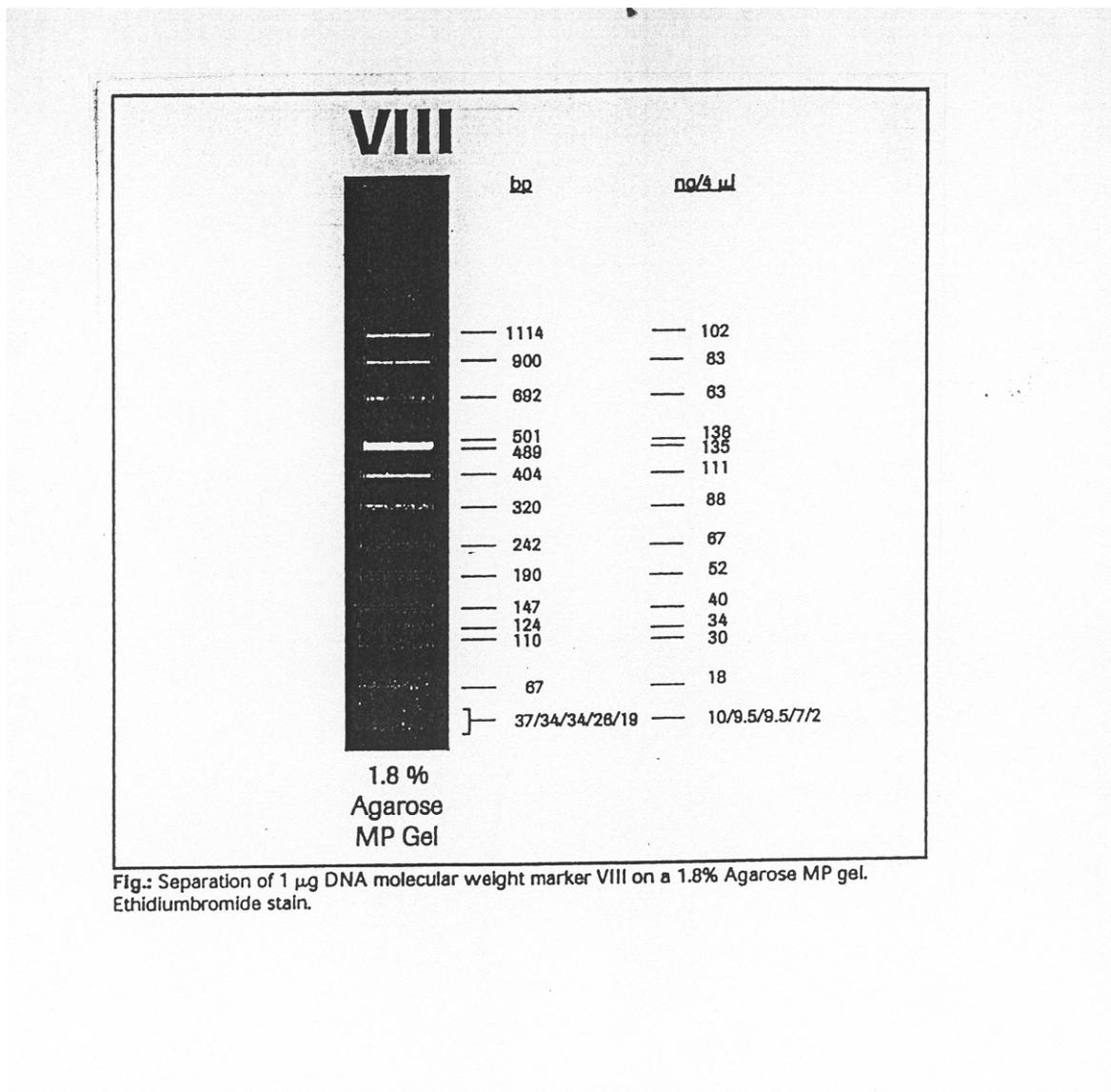
Amorces (300 pmol) 10 µl
 Eau milliQ stérile 360 µl
 dGTP (100 mM) 10 µl
 dTTP (100 mM) 10 µl
 Conserver à -20°C.

ANNEXE 2 : Marqueur de poids moléculaire



Marqueur de poids moléculaire " Smart Ladder " (Eurogentec)

Marqueur de poids moléculaire "Marqueur VIII" (Eurogentec)



Mélange de fragments préparés par digestion de l'ADN de pUCBM21 par les endonucléases de restriction *Hpa* II, *Dra* I et *Hind* III. Après électrophorèse sur gel d'agarose MP coloré au bromure d'éthidium. La concentration du produit est de 250 μ g/ μ l.

ANNEXE 3 : Substrats organiques utilisés pour établir les profils cataboliques des sols

Substrats organiques	Concentration (mM)	Substrats organiques	Concentration (mM)
Acides aminés		Acides carboxyliques	
L-Arginine	15	acide citrique	100
L-Asparagine	15	acide fumarique	100
L-Cystéine	15	DL-acide malique	100
L-Glutamine	15	L-acide ascorbique	100
L-Histidine	15	acide malonique	100
L-Lysine	15	D-acide quinique	100
L-Phénylalanine	15	acide succinique	100
L-Sérine	15	acide tartrique	100
L-Tyrosine	15	acide kétoglutarique,	100
		acide oxalique	100
		acide gallique	100
		acide pantothénique	100
Amines			100
D-Glucosamine	15		
L-glutamine	15		
		Acides aromatiques	
		Acide gallique	100
Hydrates de carbone			
D-Glucose	75		
D-Mannose	75	Polymères	
D-Saccharose	75	Cyclodextrine	100
		Twen 80	100