

UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
(UCAD)

Année : 2003

N° 83



Faculté des Sciences et Techniques
Département de Biologie Végétale

THÈSE DE DOCTORAT D'ÉTAT
-ÈS-
SCIENCES NATURELLES

(spécialité : Microbiologie)

Sur le sujet

CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET GENOTYPIQUE DES RHIZOBIUMS, OPTIMISATION DU POTENTIEL FIXATEUR D'AZOTE ET EVALUATION DE LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE EN MILIEU NATUREL CHEZ *PTEROCARPUS ERINACEUS* POIR. (VENN) ET *P. LUCENS* LEPR.

Présentée et soutenue publiquement le 22 février 2003

par

El. Samba Ndao SYLLA

devant la commission d'examen composée de :

Président : Amadou Tidiane Ba, Professeur, FST / UCAD, Dakar
Examineurs : Bernard Dreyfus, Directeur de recherche, IRD, Montpellier
Aïssatou Gaye Diallo, Professeur, FMPO / UCAD, Dakar
Yaye Kène Gassama Dia, Maître de Conférences, FST / UCAD, Dakar
Rapporteurs : Ibrahima Ndoye, Maître de Conférences, FST / UCAD, Dakar
Philippe de Lajudie, Chargé de Recherche, IRD, Montpellier

Ce travail a reçu le prix IFS/DANIDA/2002

Dédicaces

*A la mémoire
de mon frère Mabèye*

A mon père

A ma mère

A ma femme Khady

A Mabèye junior et à Mamy Rokhaya

A mes frères et soeurs

A mes amis

Remerciements

Ce travail a été le fruit d'une collaboration entre le Département de Biologie végétale de l'UCAD, le Laboratoire de Microbiologie des Sols de l'IRD Dakar et le Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes IRD/INRA/CIRAD/ENSAM, Montpellier. Il me plaît d'exprimer mes sincères remerciements aux autorités de ces institutions.

A Monsieur le Professeur Amadou Tidiane Ba qui nous fait l'honneur de présider ce jury. Votre esprit d'ouverture nous a facilité le travail en partenariat. Soucieux de la rigueur et de l'objectivité, vos critiques, observations et suggestions nous ont permis d'améliorer ce travail. Soyez assuré de notre attachement à l'esprit de vos enseignements.

J'ai une pensée particulière à Monsieur Bernard Dreyfus, Directeur de Recherche Responsable de l'UR 40 " Symbioses Tropicales et Méditerranéennes " qui nous confié ce sujet. Il a dirigé successivement notre thèse de doctorat de 3^{ème} cycle et notre thèse de doctorat d'État. Aujourd'hui, en associant notre équipe de Dakar à l'UR 40, il fait preuve d'actions concrètes de ce partenariat d'un genre nouveau souhaité pour l'Afrique.

A Madame le Professeur Aïssatou Gaye Diallo, pour la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de faire partie de ce jury malgré un emploi du temps très chargé. Je vous en saurais gré.

Nous exprimons toute notre reconnaissance à Madame le Professeur Yaye Kéne Gassama Dia qui nous a fait l'insigne honneur de consacrer de son temps si précieux pour participer à ce jury.

A Monsieur le Professeur Ibrahima Ndoye, nous pouvons témoigner de l'intérêt que vous portez à ce sujet. Le cadre relationnel que nous avons tissé a facilité nos échanges autour de ce travail. Je vous en remercie vivement.

A Monsieur Philippe de Lajudie, nous vous remercions d'avoir accepté de juger ce travail que vous connaissez bien pour nous avoir épaulé depuis le début de notre recherche.

Nous exprimons notre profonde gratitude à tous les enseignants et techniciens du Département de Biologie végétale, de l'UCAD ; à tous les chercheurs, techniciens et stagiaires du Laboratoire de Microbiologie de l'IRD, Dakar ; à tous les chercheurs techniciens et stagiaires du Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes de Montpellier.

Ce travail a reçu le soutien financier de la Fondation Internationale pour la Science (Ref. bourse 2259/1), du Fonds National de Recherches Agricoles et Agro- alimentaires (Ref. 28AP/01SS310800) et du projet INCO ENRICH.

Que tous ceux, qui nous ont apporté leur soutien, sous une forme ou une autre, trouvent ici nos remerciements les plus sincères.

ABRÉVIATIONS

AFN :	Arbre fixateur d'azote
bv. :	biovar
CILSS :	Comité international de lutte contre la sécheresse au Sahel
CIRAD :	Centre international de recherche pour le développement
CSE :	Centre de suivi écologique
dNTP :	désoxynucléotide triphosphate
DO :	densité optique
EDTA :	acide éthylène diamine tétra-acétique
EMBL :	European molecular biological library
FAO :	Food and agriculture organisation
FBA :	Fixation biologique de l'azote
FMPO :	Faculté de Médecine, Pharmacie et Odontologie
FST :	Faculté des Sciences et Techniques
GENBANK :	Genomic Bank
IGS :	Internal gene spacer
IRD :	Institut Français de Recherche Développement (ex. ORSTM)
ISRA :	Institut Sénégalais de Recherches Agricoles
Kb :	kilobase
LMG :	Laboratoire de microbiologie de l'Université de Ghent
LSTM :	Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes
NaPBS :	Sodium phosphate buffered saline
NAS :	National Academy of Sciences
P/v :	Poids/volume
PAGE :	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
PCR :	Polymerisation Chain Reaction
rDNA :	ADN codant pour le rRNA
RFLP :	Restriction fragment length polymorphism
RNase :	ARN polymerase
rRNA :	ARN ribosomal
SDS :	Sodium dodecyl sulfate
tDNA :	ADN codant pour les ARN de transfert
tRNA :	ARN de transfert
TY :	Tryptone Yeast
UCAD :	Université Cheikh Anta Diop
UPGMA :	Unweighted pair group average
UV – Vis :	Ultraviolet – visible
V/V :	Volume/volume
YM :	Yeast Manitol
YMA :	Yesat Manitol Agar

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLEAUX	N° ORDRE	PAGE
Classification actuelle des Rhizobiums	1	18
Souches utilisées	2	26
Amorces utilisées	3	35
Propriétés physico chimiques des sols utilisés	4	39
Taux d'occupation des nodules	5	61
%N, $\delta^{15}\text{N}$ et %Ndfa	6	64
Biomasse foliaire et densité des arbres.....	7	66
Rendement en azote total et en azote fixé / plante / hectare	8	66
PLANCHE PHOTOS	1	4
FIGURES		
Données phénotypiques et génotypiques utilisées pour la classification	1	12
Niveau de résolution des techniques utilisées pour la classification	2	13
Cartographie des gènes dans le chromosome bactérien	3	15
Schéma descriptif du principe de la PCR	4	33
Cycle d'amplification (PCR) du gène 16SrDNA	5	35
Cycle d'amplification (PCR) de l'intergène 16S-23SrDNA	6	35
Position d'amorçage des différents primers utilisés	7	36
Dendrogramme des groupes phénotypiques obtenus par SDS-PAGE et des profils de restriction 16SrDNA	8	48
Dendrogramme basé sur l'analyse des séquences de gène 16S rDNA	9	51
Dendrogramme basé sur l'analyse des séquences de l'IGS 16S-23S rDNA	10	53
Biomasse des nodules, % mycorhization, hauteur des plantes	11, 12, 13	56
Poids sec des plantes, N% dans les plantes, P% dans les plantes	15, 16,17	59
IGS 16S-23SrDNA, profils de restriction enzymatique des souches...	17	62
DOCUMENTS ANNEXES		
Séquences de gène 16S rDNA obtenues	1	
Séquences de gène IGS 16S-23S rDNA obtenues	2	
Liste des articles tirés de la thèse	3	

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	1
1.1. GÉNÉRALITÉS	1
1.2. OBJECTIFS	7
1.3. PRÉSENTATION DU PLAN DE TRAVAIL	7
1.4. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	8
1.4.1. Les microorganismes fixateurs d'azote	8
1.4.1.1. Les fixateurs libres	8
1.4.1.2. Les associations plantes-microorganismes fixateurs d'azote	9
1.4.2. La taxonomie des <i>rhizobiaceae</i>	10
1.4.2.1. Concepts de base de la taxonomie des <i>Rhizobiaceae</i>	10
1.4.2.2. Concept actuel de la taxonomie des <i>Rhizobiaceae</i>	11
1.4.2.3. L'approche génotypique de la taxonomie bactérienne	11
1.4.2.4. L'évolution de la classification des <i>Rhizobiaceae</i>	16
1.4.3. La sélection de souches de rhizobium	19
1.4.4. L'amélioration du potentiel symbiotique des rhizobiums et la nutrition des arbres	21
1.4.5. La fixation biologique de l'azote (FBA) chez les AFN	23
1.4.5.1. Les nodules des AFN	23
1.4.5.2. Le système racinaire des AFN	23
1.4.5.3. L'immobilisation et la remobilisation de l'azote par les AFN	23
1.4.5.4. L'Influence de l'âge des arbres sur la FBA	24
1.4.5.5. L'estimation de la FBA chez les AFN	24
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
2.1. CARACTÉRISATION DES RHIZOBIUMS	26
2.1.1. Caractérisation phénotypique : analyse des protéines totales de la cellule bactérienne	29
2.1.1.1. Préparation des extraits protéiques	30
2.1.1.2. Préculture des bactéries	30
2.1.1.3. Production de biomasse bactérienne	30
2.1.1.4. Récolte des bactéries	30
2.1.1.5. Extraction des protéines bactériennes	31
2.1.1.6. Séparation des protéines sur gel polyacrylamide	31
2.1.1.7. Analyse des profils protéiques ou électrophorégrammes	31
2.1.2. Caractérisation génotypique	32
2.1.2.1. Extraction d'ADN génomique des rhizobiums	32
2.1.2.2. Analyse du polymorphisme des fragments de restriction PCR-RFLP	33
2.1.2.3. Séquençage des gènes 16S rDNA et IGS 16S-23S rDNA	34
2.1.2.5. Analyse et alignement des séquences	37
2.1.2.4. Établissement d'une banque de séquences	38
2.2. CULTURE EN SERRE ET INOCULATION DES JEUNES PLANTS DE <i>PTEROCARPUS</i> AVEC RHIZOBIUM ET <i>GLOMUS MOSSEA</i>	40
2.2.1. Préparation des sols de culture	40
2.2.2. Origine des semences	40
2.2.3. Les inoculums de rhizobium et de champignon mycorhizien	40
2.2.4. Culture des plantes et inoculation	41
2.2.4.1. Condition de culture des jeunes plants	41
2.2.4.2. Dispositif expérimental	41
2.2.5. Estimation du potentiel symbiotique des plants	41
2.2.6. Estimation de la croissance des jeunes plants et détermination de la composition en N et P	42
2.2.7. Mise en évidence de la compétitivité des rhizobiums	42
2.2.7.1. Extraction d'ADN à partir de broyats de nodules	42
2.2.7.2. Identification et détection des rhizobiums	43

2.3. ESTIMATION DE LA FBA DANS UN ÉCOSYSTEME NATUREL : MÉTHODE DU TRAÇAGE ISOTOPIQUE NATUREL	43
2.3.1. Principe et méthode du traçage isotopique ¹⁵ N naturel	43
2.3.2. Sites de prélèvement du matériel utilisé	44
2.3.3. Échantillonnage d'organes végétaux	45
2.3.4. Analyse des échantillons	45
2.3.5. Estimation de la biomasse des plantes	47
2.3.6. Analyse statistique	47
3. RÉSULTATS	49
3.1. CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE ET GÉNOTYPIQUE DES RHIZOBIUMS ISOLÉS DE <i>PTEROCARPUS ERINACEUS</i> ET <i>P. LUCENS</i>	49
3.1.1. Analyse des protéines totales SDS-PAGE	49
3.1.2. PCR-RFLP du gène 16S rDNA	50
3.1.3. Analyse des séquences de gène 16S rDNA.	52
3.1.4. Analyse des séquences de l'intergène 16S-23S rDNA	54
3.2. OPTIMISATION DU POTENTIEL SYMBIOTIQUE ET DE LA CROISSANCE DES JEUNES PLANTS DE <i>P. ERINACEUS</i>	57
3.2.1. Nodulation des plantes et biomasse des nodules	57
3.2.2. Pourcentage de mycorhization des jeunes plantes	57
3.2.3. Croissance des jeunes plantes	58
3.2.4. Estimation de la teneur en N et P des plantes	58
3.2.5. Estimation de la compétitivité des inoculums de rhizobiums	60
3.3. ESTIMATION DE LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE DANS UNE POPULATION NATURELLE DE <i>P. LUCENS</i> AU SENEGAL : UTILISATION DU TRAÇAGE ISOTOPIQUE NATUREL EN ¹⁵N	65
3.3.1. Moyennes estimées des % N, ‰ ¹⁵ N et % Ndfa dans les feuilles	65
3.3.2. Moyenne estimée de la biomasse foliaire des arbres	67
3.3.3. Moyenne estimée de l'azote total et de l'azote dérivé de la FBA	67
4. DISCUSSION	68
4.1. CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE DES RHIZOBIUMS	68
4.2. CARACTÉRISATION GÉNOTYPIQUE DES RHIZOBIUMS	68
4.3. OPTIMISATION DU POTENTIEL SYMBIOTIQUE ET DE LA CROISSANCE DES JEUNES PLANTS DE <i>P. ERINACEUS</i>	71
4.4. OPTIMISATION DE LA NUTRITION EN N ET P DES JEUNES PLANTS	72
4.5. MISE EN ÉVIDENCE DE LA COMPÉTITIVITÉ DES RHIZOBIUMS	73
4.6. ESTIMATION DE LA FBA DANS UNE POPULATION NATURELLE DE <i>P. LUCENS</i>	74
5. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	78
6. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	80

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLEAUX	N° ORDRE	PAGE
Classification actuelle des Rhizobiums	1	18
Souches utilisées	2	26
Amorces utilisées	3	35
Propriétés physico chimiques des sols utilisés	4	39
Taux d'occupation des nodules	5	61
%N, $\delta^{15}\text{N}$ et %Ndfa	6	64
Biomasse foliaire et densité des arbres.....	7	66
Rendement en azote total et en azote fixé / plante / hectare	8	66
PLANCHE PHOTOS	1	4
FIGURES		
Données phénotypiques et génotypiques utilisées pour la classification	1	12
Niveau de résolution des techniques utilisées pour la classification	2	13
Cartographie des gènes dans le chromosome bactérien	3	15
Schéma descriptif du principe de la PCR	4	33
Cycle d'amplification (PCR) du gène 16SrDNA	5	35
Cycle d'amplification (PCR) de l'inter gène 16S-23SrDNA	6	35
Position d'amorçage des différents primers utilisés	7	36
Dendrogramme des groupes phénotypiques obtenus par SDS-PAGE et des	8	48
Dendrogramme basé sur l'analyse des séquences de gène 16S rDNA	9	51
Dendrogramme basé sur l'analyse des séquences de l'IGS 16S-23S rDNA	10	53
Biomasse des nodules, % mycorhization, hauteur des plantes	11, 12, 13	56
Poids sec des plantes, N% dans les plantes, P% dans les plantes	15, 16,17	59
IGS 16S-23SrDNA, Profils de restriction enzymatique des souches...	17	62
DOCUMENTS ANNEXES		
Séquences de gène 16S rDNA obtenues	1	
Séquences de gène IGS 16S-23S rDNA obtenues	2	
Liste des article tirés de la thèse	3	

ABRÉVIATIONS

AFN :	Abre fixateur d'azote
bv. :	biovar
CILSS :	Comité international de lutte contre la sécheresse au Sahel
CIRAD :	Centre international de recherche pour le développement
CSE :	Centre de suivi écologique
dNTP :	désoxynucléotide triphosphate
DO :	densité optique
EDTA :	acide éthylène diamine tétra-acétique
EMBL :	European molecular biological library
FAO :	Food and agriculture organisation
FBA :	Fixation biologique de l'azote
FM :	Faculté de Médecine et Pharmacie
FST :	Faculté des Sciences et Techniques
GENBANK :	Genomic Bank
IGS :	Internal gene spacer
IRD :	Institut Français de Recherche Développement (ex. ORSTM)
ISRA:	Institut Sénégalais de Recherches Agricoles
Kb :	kilobase
LMG :	Laboratoire de microbiologie de l'Université de Ghent
LSTM :	Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes
N.A.S.	National Academy of Sciences
NaPBS :	Na phosphate buffered saline
P/v :	Poids/volume
PAGE :	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
PCR :	Polymerisation Chain Réaction
rDNA :	ADN codant pour le rRNA
RFLP :	Restriction fragment length polymorphism
RNase :	enzyme reconnaissant des séquences nucléotidiques dans l'ARN.
rRNA :	ARN ribosomal
SDS :	Sodium dodecyl sulfate
tDNA :	ADN codant pour les tRNA
tRNA :	ARN de transfert
UCAD :	Université Cheikh Anta Diop
UPGMA :	Unweighted pair group average
UV – Vis :	Ultraviolet – visible
V/V :	Volume/volume

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

1.1. GÉNÉRALITÉS

Dans les régions tropicales arides et semi-arides, le déficit en eau, la dégradation et la pauvreté des sols constituent des contraintes agronomiques majeures. Le déficit hydrique engendre la sécheresse qui sévit dans ces régions depuis plusieurs décennies. La dégradation des sols résulte du recul de la végétation arborée et de la surexploitation des terres cultivables. Les sols dégradés sont continuellement soumis à l'érosion et à un appauvrissement en éléments minéraux et organiques dont l'azote.

L'azote sous forme combinée constitue une des composantes principales de la matière vivante. L'alimentation azotée de la plupart des plantes provient de la minéralisation de l'azote organique du sol. L'ammoniac produit lors de cette minéralisation est en majeure partie oxydé en nitrates par les bactéries nitrifiantes. Ces bactéries nitrifiantes peuvent réduire ultérieurement les nitrates en azote gazeux, ce qui constitue une perte importante d'azote vers l'atmosphère. Dans l'air, l'azote est présent en très grande quantité sous forme gazeuse (N_2), mais l'azote gazeux n'est pas directement accessible aux animaux et aux végétaux supérieurs. C'est par le processus de la Fixation Biologique de l'Azote (FBA) que des bactéries du sol, associées ou non à des plantes, parviennent à transformer l'azote gazeux en azote combiné assimilable par les végétaux et les animaux. À l'échelle du globe, la quantité d'azote moléculaire ainsi recyclé est estimée à environ 100 à 200 millions de tonnes par an dont la moitié provient des associations symbiotiques rhizobium-légumineuses (Hardy, 1975). De manière globale, les quantités d'azote fixé annuellement compensent largement les pertes dues à la dénitrification. Cette compensation bien que suffisante en générale pour la totalité du globe est très variable suivant les régions.

Pour corriger le déficit en azote des sols, l'application d'engrais azotés est longtemps demeurée la solution préconisée. Cette technique malgré ses avantages, comporte plusieurs inconvénients qui limitent leur utilisation à grande échelle en agriculture dans les pays en voie de développement. En effet, leur production industrielle, leur transport et leur épandage demandent beaucoup de moyens qui ne sont pas disponibles dans les pays à faible revenu. Quand ils sont appliqués, leur rendement reste faible car l'azote effectivement

assimilé par la plante est estimé à 40 - 50%, le reste étant lessivé ou dénitrifié. En outre, leur application massive peut entraîner la pollution de nappes d'eau souterraines par les nitrates provoquant ainsi des problèmes d'environnement et de santé des populations.

Aussi, concilier maintien des rendements agricoles et protection de la nature suppose le recours à des moyens qui permettent de limiter la consommation d'engrais. C'est pourquoi les politiques de développements agricoles attachent désormais une importance croissante aux approches qui permettent d'intensifier la production agricole en maintenant la fertilité des sols. Ainsi, depuis le sommet mondial de la terre sur l'Environnement et le Développement (1992), les politiques de développement sont inspirées par le concept de "développement durable". Elles ont conduit à la mise en place d'un objectif commun à tous les acteurs impliqués au domaine de l'agriculture, imposant des modes de production durables, assurant le maintien et l'amélioration de la fertilité des sols; limitant les intrants au strict nécessaire ; garantissant la qualité nutritionnelle des produits et contribuant indirectement, mais effectivement à la préservation des ressources naturelles dans toute leur diversité.

Parmi les stratégies susceptibles de contribuer au succès de la gestion durable des écosystèmes agricoles, forestiers, et pastoraux, une des plus prometteuses est certainement celle qui consiste à maîtriser et à développer la FBA. Elle peut être combinée pour remplacer, parfois en grande partie (mais partiellement dans le cas des cultures intensives) l'application des engrais azotés, ces derniers représentant 50% de la consommation d'énergie en agriculture.

Il est évident que l'utilisation des systèmes fixateurs plante-microorganismes dans les écosystèmes agricoles et agro-forestiers compenserait avantageusement au moins partiellement, le recours aux engrais azotés tout en assurant la pérennité de l'approvisionnement en azote des sols (Dommergues *et al.*, 1999). L'inoculation des semis de légumineuses avec des rhizobiums est une pratique de plus en plus utilisée dans les agrosystèmes. Au Brésil, l'inoculation du Soja avec des souches de *Bradyrhizobium elkanii* et de *B. japonicum* a permis de diminuer les coûts de production d'environ 1,3 milliards de dollars US (Siquiera et Franco, 1988).

Depuis une quinzaine d'années, notamment dans les régions tropicales et méditerranéennes, les espèces d'arbres fixatrices d'azote (AFN) sont de plus en plus intégrées dans les systèmes agricoles et forestiers. Les AFN procurent aux populations locales, fourrage et bois d'énergie. Ils sont également utilisés

comme brise-vent ou comme haies-vivès autour des exploitations agricoles. Dans les systèmes de cultures en couloir, les AFN peuvent apporter jusqu'à 300 kg.ha⁻¹ (Dommergues *et al.*, 1999). Les potentialités fixatrices d'azote des AFN sont donc comparables à celles des herbacées, mais les AFN présentent, en plus, des avantages dont les principaux sont les suivants :

- ils apportent au sol des quantités élevées de carbone à la fois sous forme de litière et sous forme de résidus de racines, contribuant au maintien et au renouvellement du stock de matière organique ;

- ils ramènent en surface les nutriments des horizons profonds grâce à leurs enracinements;

- ils protègent les sols contre l'érosion ;

- ils modifient favorablement le climat.

Plus qu'en zone tempérée, dans les régions tropicales, la végétation ligneuse de manière générale constitue une source économique considérable et joue un rôle très important dans la conservation des sols et la protection de l'environnement. Il est évident que si les AFN ne sont pas les seules espèces possédant ces qualités, elles n'en jouent pas moins un rôle de premier plan en raison de leur indépendance vis-à-vis de leur alimentation en azote qui sous les tropiques constitue un des facteurs limitant de la production végétale. Cependant, le rôle des AFN pourrait être encore plus important, lorsque l'on parviendra à maîtriser et à améliorer leurs potentialités spécifiques.

Afin de maximiser les rendements de la FBA, les efforts de recherche se sont initialement focalisés dans l'isolement et la sélection de souches de rhizobium pouvant servir d'inoculum dans les systèmes agricoles. Ce stade a conduit au développement d'un commerce d'inoculum dans certains pays d'Europe et d'Amérique du Nord. Cependant, la pratique de l'inoculation si elle est souvent bénéfique ailleurs, elle a connu des échecs dans les pays tropicaux, pour des raisons qui ne sont pas toujours élucidées, notamment lors de l'inoculation des arbres (Brunck *et al.*, 1990 ; Neves et Rumjanek, 1997). Parmi les causes possibles de ces échecs, la faible compétitivité des souches inoculées par rapport aux souches indigènes est souvent évoquée. De nombreuses recherches ont été initiées afin d'estimer, de cataloguer, de préserver et de contrôler la diversité des Microorganismes Fixateurs d'Azote dans les écosystèmes. Malgré ces efforts notables dans le domaine, les symbioses et les microorganismes symbiotiques sont loin d'être tout à fait connus. Par exemple, peu de méthodes



P. erinaceus Poir. (Sylla, 1996)



P. erinaceus : en peuplement, parc Niokolokoba (Sylla, 1996)



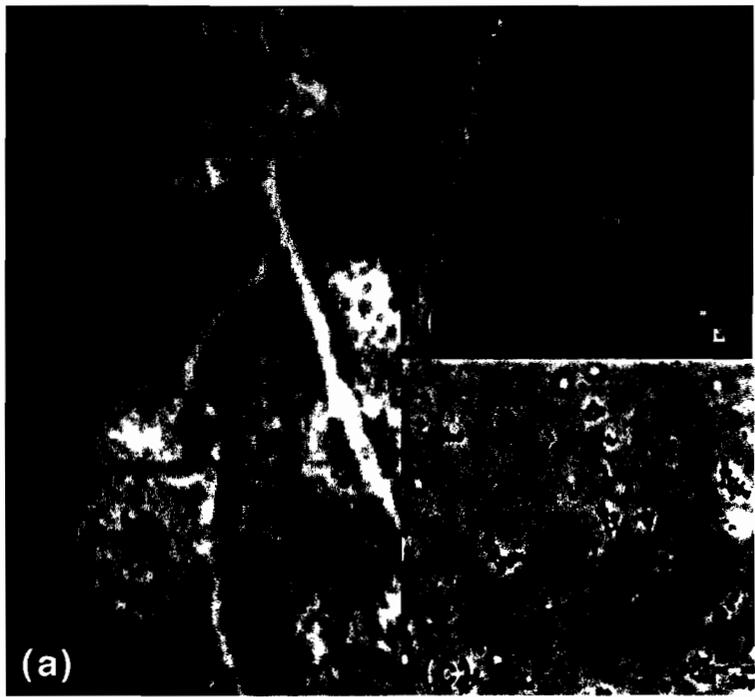
P. lucens Lepr. (Sylla 1996)



P. lucens : en peuplement, réserve du Ferlo (Sylla, 1996)



Quelques usages faits des arbres
(photo CSE , 1996)



Nodules *in vivo* (a) et *in vitro* (b) provoqués par des
rhizobiums (c) au niveau des racines de *Pterocarpus* spp.

PLANCHE PHOTOS

ont été développées pour suivre dans les sols le comportement de ces micro-organismes, dont la caractérisation a été pendant longtemps fastidieuse, et a souvent été réduite à l'attribution d'un numéro de collection.

Selon Allen et Allen (1981), environ 15 % des espèces de légumineuses était connus pour leur propriété symbiotique avec les rhizobiums. Parmi les espèces de rhizobium décrites, seules quelques-unes sont isolées de nodules de légumineuses tropicales. Ce sont *R. tropici* (Martinez-Romero *et al.*, 1991) ; *S. saheli* (Segovia *et al.*, 1993) ; *S. teranga* (de Lajudie *et al.*, 1994). Le déficit de connaissance est attribué au fait que les légumineuses d'origine tropicale sont encore très peu explorées. De ce fait, les légumineuses tropicales sont encore insuffisamment exploitée au plan de la diversité microbienne et constituent donc des ressources économiques et écologiques utiles et appréciables pour le développement de l'agriculture.

Pterocarpus erinaceus et *P. lucens* font partie des légumineuses arbres fixateurs d'azote que l'on trouve dans les écosystèmes naturelles soudano sahéliens et sahéliens. Au Sénégal, on rencontre les deux espèces dans deux zones climatiques et écologiques très distinctes et très différentes.

Pterocarpus erinaceus (planche photos) forme des peuplements dans les forêts de la partie soudanienne au sud-est du pays où leur densité peut atteindre 1 686 arbres ha⁻¹ (Fredericksen et Lawesson, 1992). Elle se développe sur des sols ferrugineux tropicaux et silico-argileux où la pluviométrie moyenne annuelle est comprise entre 800 et 1 000 mm.

Pterocarpus lucens (planche photos) forme des peuplements dans la savane boisée de la partie sahélienne au Nord-Est du pays. Dans ces formations, la densité des populations atteint 1202 arbres ha⁻¹ (Fredericksen et Lawesson, 1992). Les populations se rencontrent surtout sur les sols ferrugineux tropicaux et silico-argileux des bordures de la vallée morte du Ferlo où la pluviométrie moyenne est comprise entre 200 et 500 mm .

Dans la partie soudano-sahélienne, au Centre et à l'Est du pays, il existe quelques reliques des deux espèces.

Au Sénégal, *Pterocarpus erinaceus* et *Pterocarpus lucens* constituent des ressources très importantes pour les populations locales.

Pterocarpus erinaceus communément appelé *venn*, donne l'un des meilleurs bois d'œuvre d'Afrique occidentale. Susceptible d'un beau poli, résistant et lourd, il est employé pour la fabrication de meubles, d'objets artisanaux et domestiques. Le bois de *Pterocarpus lucens* moins volumineux, présente les mêmes qualités. Il sert surtout à confectionner des objets à usages domestiques et artisanaux.

Du point de vue énergétique, le bois de *Pterocarpus* a un très haut pouvoir calorifique.

L'intérêt fourrager des deux espèces est rapporté par de nombreux auteurs (Hernaux, 1980; Cissé *et al.*, 1984; Couteron *et al.*, 1992). Leur présence est signalée dans les parcours des pâturages sahéliens et soudano-sahéliens où leurs feuilles servent de fourrage aérien d'appoint pendant la saison sèche, lorsque la ressource herbacée devient rare.

Les *Pterocarpus* sont des arbres qui peuvent servir de brise-vent et qui par leur puissant réseau racinaire peuvent empêcher l'érosion en immobilisant le sol. Les observations *in situ* ont montré que *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens* s'associent en symbiose avec des rhizobiums qui forment des nodules sur leurs racines. Cette dernière qualité leur permettrait non seulement subvenir en partie à leur propre besoin en azote mais aussi d'améliorer la qualité du sol tout en évitant leur érosion. A notre connaissance, très peu de travaux ont été réalisés sur la symbiose rhizobium-*Pterocarpus*. Les travaux préliminaires que nous avons menés dans ce cadre (Sylla *et al.*, 1996, 1997 et 1998) ont permis :

- de révéler la présence régulière de nodules au niveau des racines des horizons superficiels de *Pterocarpus erinaceus* et de *P. lucens* dans leur aire naturelle de répartition;

- de constituer d'une collection de 70 souches de rhizobiums isolées de nodules racinaires des arbres adultes dans la partie sahélienne et dans la partie soudanienne du Sénégal (les copies de ces souches sont disponibles dans les collections de l'IRD/UCAD, Dakar ; LMG de Ghent et LSTM de Montpellier) ;

- de montrer une diversité phénotypique parmi ces souches de rhizobiums capables de noduler *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens*;

- de mettre en évidence des souches à haut potentiel fixateur et qui utilisables dans le cadre des programme de développement;

-de déterminer le potentiel fixateur d'azote des jeunes plants de *Pterocarpus* et de *P. lucens* cultivés en serre.

L'ensemble de ces travaux préliminaires axés sur la caractérisation des rhizobiums ont donné des résultats souvent intéressants, mais demandaient à être plus complets et plus précis. D'autre part, ces études ont permis de sélectionner des souches de rhizobium efficaces mais dont nous ignorons leurs capacités d'adaptation et leur compétitivité en pépinière et au champ. Il est évident que de meilleures connaissances sur le comportement des endophytes dans le sol, en conditions contrastées, augmenteraient les chances de réussite de la technique d'inoculation des arbres.

1.2. OBJECTIFS

La présente étude a pour objectif général de renforcer les connaissances sur la diversité des rhizobiums, ainsi que sur le biofonctionnement des symbioses rhizobium-légumineuses et leur apport dans les écosystèmes. Elle constitue une suite des travaux que nous avons déjà réalisés. Elle a pour objectifs spécifiques :

- de caractériser au plan phénotypique et génotypique les rhizobiums isolés de *Pterocarpus erinaceus* et de *P. lucens* au Sénégal;
- d'optimiser le potentiel symbiotique des rhizobiums, la croissance et la FBA des jeunes plants de *Pterocarpus* cultivés en serre;
- d'évaluer la quantité d'azote fixé dans une population naturelle de *Pterocarpus*.

1.3. PRÉSENTATION DU PLAN DE TRAVAIL

Le travail est présenté en 7 parties :

La première partie est consacrée à l'introduction générale et comporte essentiellement une revue bibliographique sur :

- la diversité des rhizobiums et leur classification actuelle, les gènes ribosomiaux, l'investigation génomique et son importance en systématique et en écologie microbienne;
- la fixation biologique de l'azote et les approches proposées pour l'amélioration du potentiel fixateur d'azote des AFN ;

La deuxième partie est consacrée aux méthodes de recherche ainsi qu'aux matériels utilisés ;

La troisième partie présente les résultats obtenus ;

La quatrième est consacrée à la discussion sur les résultats ;

La cinquième partie est consacrée à la conclusion et aux perspectives de la recherche sur le sujet.

La sixième partie comporte la liste références bibliographique ;

La septième partie est constituée par les annexes et comporte les séquences de gènes définies dans le cadre de ce travail ainsi que la liste des publications tirées de la thèse.

1.4. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.4.1. Les microorganismes fixateurs d'azote

La fixation biologique de l'azote, est uniquement réalisée par des Procaryotes associés ou non à des végétaux supérieurs. Parmi ceux-ci on distingue les fixateurs libres et les fixateurs symbiotiques.

1.4.1.1. Les fixateurs libres

Les fixateurs libres comprennent des genres bactériens très divers :

-des bactéries aérobies chimioorganotrophes (*Azotobacter*, *Azospyrillum*, *Acetobacter*, *Diazotrophillum*);

-des bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) ou aérobies facultatives (*Klebseilla*, *Pseudomonas*, *Bacillus*);

-des bactéries phototrophes à photosynthèse anoxygénique (*Rhodobacter*, *Rhodospyrillum*) et des Cyanobactéries (*Synechococcus*).

Des bactéries telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus* ou certaines espèces de *Pseudomonas* ont été isolées de la rhizosphère de graminées cultivées ou sauvages. Leur contribution directe à la production végétale ou à la fertilité des sols est difficile à évaluer.

1.4.1.2. Les associations plantes-microorganismes fixateurs d'azote

Les associations plantes-microorganismes fixateurs d'azote les plus efficaces sont les associations symbiotiques, dans lesquelles, le microorganisme induit l'apparition de structures différenciées appelées nodules chez l'hôte végétal. Dans de telles associations, le microsymbionte fournit une grande partie de l'azote nécessaire à la croissance de la plante. La plante subvient aux besoins énergétiques de la bactérie en fournissant des substances carbonées résultant de la photosynthèse; elle fournit en outre un micro environnement très particulier nécessaire à la fixation de l'azote et synthétise les enzymes permettant l'assimilation rapide de l'ammoniaque produit. Parallèlement, à l'intérieur du nodule, les bactéries se différencient en bactéroïdes capables de réduire l'azote moléculaire N_2 en NH_3 , au sein des nodules en maturité. Il existe plusieurs exemples de symbiose induisant la formation de nodules chez l'hôte végétal.

-Les symbioses *Frankia*-plantes actinorhiziennes où, les bactéries actinomycètes du genre *Frankia* infectent les racines de plantes dites actinorhiziennes des genres *Elaeagnus*, *Alnus* et *Casuarina*. Ils forment des nodules au niveau des racines et dans lesquels, des filaments bactériens se développent à l'intérieur des cellules. Celles-ci se différencient en vésicules sièges de la fixation de l'azote.

-Les cyanobactéries hétérocystées (algues bleues) développent des symbioses avec un grand nombre de plantes : *Nostoc* et *Celothrix* chez les Lichens; *Anabaena* chez les champignons, les fougères ainsi que certains arbres. La symbiose *Anabaena-Azolla* est utilisée depuis longtemps comme engrais vert dans les rizières.

-Les symbioses rhizobium-légumineuses sont les plus étudiées. La plante hôte appartient à la famille des *Leguminosae*, à l'exception du genre *Parasponia* (Allen et Allen, 1981) et les bactéries, à l'état de bactéroïdes, fixent l'azote dans un organe différencié de la plante appelé nodule, nodosité. La majorité des légumineuses sont nodulées au niveau de leurs racines. La double nodulation des racines et des tiges n'est rencontrée que chez quelques légumineuses tropicales qui appartiennent aux genres *Neptunia* (Schaede, 1940), *Sesbania* (Dreyfus et Dommergues, 1981), *Aeschynomene* (Alazard, 1985; Becker *et al.*, 1988) et *Discolobium* (Loureiro *et al.*, 1994). Les nodules sont le siège des échanges entre les deux partenaires symbiotiques. La bactérie y réalise la réduction de l'azote moléculaire atmosphérique N_2 en ammoniac NH_3 . L'énergie nécessaire à cette réaction est fournie sous forme de composés carbonés par la plante. Les rhizobiums appartiennent exclusivement à la sous-classe des alpha-

Proteobactéries. Récemment, un nouveau groupe de bactéries méthylothropes associées aux crotalaires a été décrit (Sy *et al.*, 2001). De manière plus surprenante, Moulin *et al.* (2001) ont décrit une espèce du genre *Buckolderia* appartenant à la sous-classe des Beta-Proteobactéries capable de former des nodules efficaces chez des légumineuses

1.4.2. La taxonomie des *rhizobiaceae*

1.4.2.1. Concepts de base de la taxonomie des *Rhizobiaceae*

Le premier concept de la classification des rhizobiums a été fondé sur des performances symbiotiques des couples hôtes-bactéries. Elle révéla que des plantes avaient une spécificité d'interaction avec certains Rhizobiums et inversement (Jordan et Allen, 1974). Ainsi les espèces de légumineuses susceptibles d'être infectées par une même espèce de Rhizobium constituent un *groupe d'inoculation croisée* et les souches de Rhizobium capables de noduler les plantes appartenant à l'un de ces groupes sont considérées comme étant de la même espèce. De ce concept est également établie la notion de *groupe d'efficacité* des souches qui fixent d'importantes quantités d'azote en association avec diverses espèces de plantes nodulées. Ces deux concepts de groupe ont longtemps constitué le fondement de base de la taxonomie des *Rhizobiaceae*. Ainsi dans la huitième édition du *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1974), seul un genre, *Rhizobium*, et six espèces sont décrits : *R. meliloti*; *R. phaseoli*; *R. leguminosarum*; *R. trifolii*; *R. lupini* et *R. japonicum*. Ces espèces ont été identifiées sur la base de leur spectre d'hôte. Par la suite, les chercheurs se sont rendu compte que beaucoup d'exceptions ont failli à cette règle, fondée sur les performances symbiotiques, par exemple, la souche NGR 234 capable de noduler plus d'une trentaine d'espèces de légumineuses ainsi que la non légumineuse *Parasponia*. Aussi, certaines espèces de légumineuses sont-elles nodulées par différentes espèces de Rhizobium. Ainsi le critère de groupe d'inoculation croisé cessa d'être considéré dans la première édition du *Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology* (Jordan, 1984).

Sur la base de la vitesse de croissance *in vitro* sur YMA (Yeast Manitol Agar), les rhizobiums ont été reclassés dans deux genres que sont le genre *Rhizobium* pour les souches à croissance rapide et le genre *Bradyrhizobium* pour les souches à croissance lente (Jordan *et al.*, 1982). Cette modification a ouvert l'ère moderne de la classification des *Rhizobiaceae* avec des changements qui se produisent jusqu'à nos jours. La disparité des genres par rapport à leur vitesse de croissance a été confirmée dans les études ultérieures. Les critères

phénotypiques tels, la vitesse de croissance ainsi que le temps de génération en culture ont servi à la description d'autres taxons de rhizobium. Les membres du genre *Bradyrhizobium*, l'espèce *Bradyrhizobium liaoningense*, et le genre *Mesorhizobium* sont respectivement de type "croissance lente", "croissance très lente" et "croissance intermédiaire". Dans une autre approche phénotypique, l'analyse numérique des protéines totales, SDS-PAGE, a permis de classer la majorité des souches type "croissance très lente" isolées de légumineuses des forêts du Brésil dans le groupe des espèces de *Bradyrhizobium* mais ne précise pas leur appartenance à l'espèce *B. liaoningense* (Moreira *et al.*, 1993).

1.4.2.2. Concept actuel de la taxonomie des *Rhizobiaceae*

Pour les études pratiques et l'utilisation des souches, les méthodes actuelles de phylogénie utilisent un ensemble de techniques modernes ayant des pouvoirs discriminants très variés. Elles ont permis de mieux comprendre les relations intra- et inter-génériques qui existaient entre les espèces des genres *Bradyrhizobium* et *Rhizobium*. Ainsi, les récents développements de la taxonomie des *Rhizobiaceae* ont abouti à la définition de nouvelles espèces sur la base d'une association d'informations comprenant à la fois des données phénotypiques et génotypiques (figure 1), sans négliger les critères distinctifs particuliers (performances symbiotiques, sensibilité aux antibiotiques...), secondaires pour la taxonomie mais essentielles pour l'utilisation pratique des microorganismes. Il introduit le concept de taxonomie polyphasique utilisé pour désigner des taxons à tous les niveaux (Murray *et al.* 1990). La figure 2 indique le niveau de résolution des techniques utilisées en taxonomie bactérienne (Vandamme *et al.* 1996).

1.4.2.3. L'approche génotypique de la taxonomie bactérienne

Elle est basée sur l'analyse des gènes et fait appel à des techniques qui ciblent directement les molécules d'ADN et d'ARNr. Parmi celles-ci, il y a :

La détermination du pourcentage guanine + cytosine (% G+C) de l'ADN

C'est une méthode génotypique classique, considérée comme standard dans la description des taxons bactériens. D'une manière générale, le pourcentage observé ne dépasse pas 3 % pour une espèce définie et pas plus de 10 % pour un genre (Stackebrandt et Liesack, 1993). Ce taux varie entre 24 et 76 % dans le monde bactérien.

GENOTYPIC INFORMATION

DNA

Total DNA:

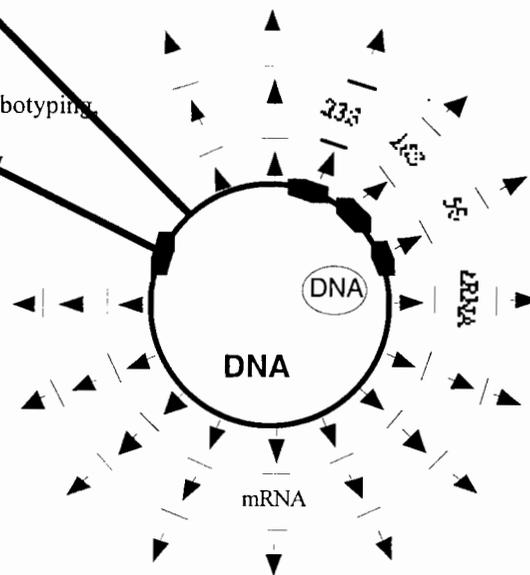
Restriction fragment patterns (RFLP)
% G+C
DNA-DNA hybridizations

DNA segments:

DNA probes
DNA sequencing
PCR based DNA fingerprinting (Ribotyping,
ARDRA, RAPD, AFLP, -SRFA)

RNA

DNA / rRNA hybridizations
Base sequencing
LMW RNA profiles



Protein

Electrophoretic patterns of total cellular
or cell envelope proteins (1D or 2D)
Enzyme patterns
(multilocus enzyme electrophoresis)
Amino acid sequencing (cytochrome, ferredoxin)

Chemotaxonomic markers

Cellular fatty acids
Mycolic acids
polar lipids
Quinones
Polyamines
Cell wall compounds
Exopolysaccharides

Expressed features

Morphology
Physiology
biochemistry
Enzymology
Serology (monoclonal, polyclonal)

PHENOTYPIC INFORMATION

Figure 1: Données phénotypiques et génotypiques utilisées pour l'identification et la classification des bactéries (Vandamme *et al.* 1996).

TECHNIQUES

NIVEAUX TAXONOMIQUES

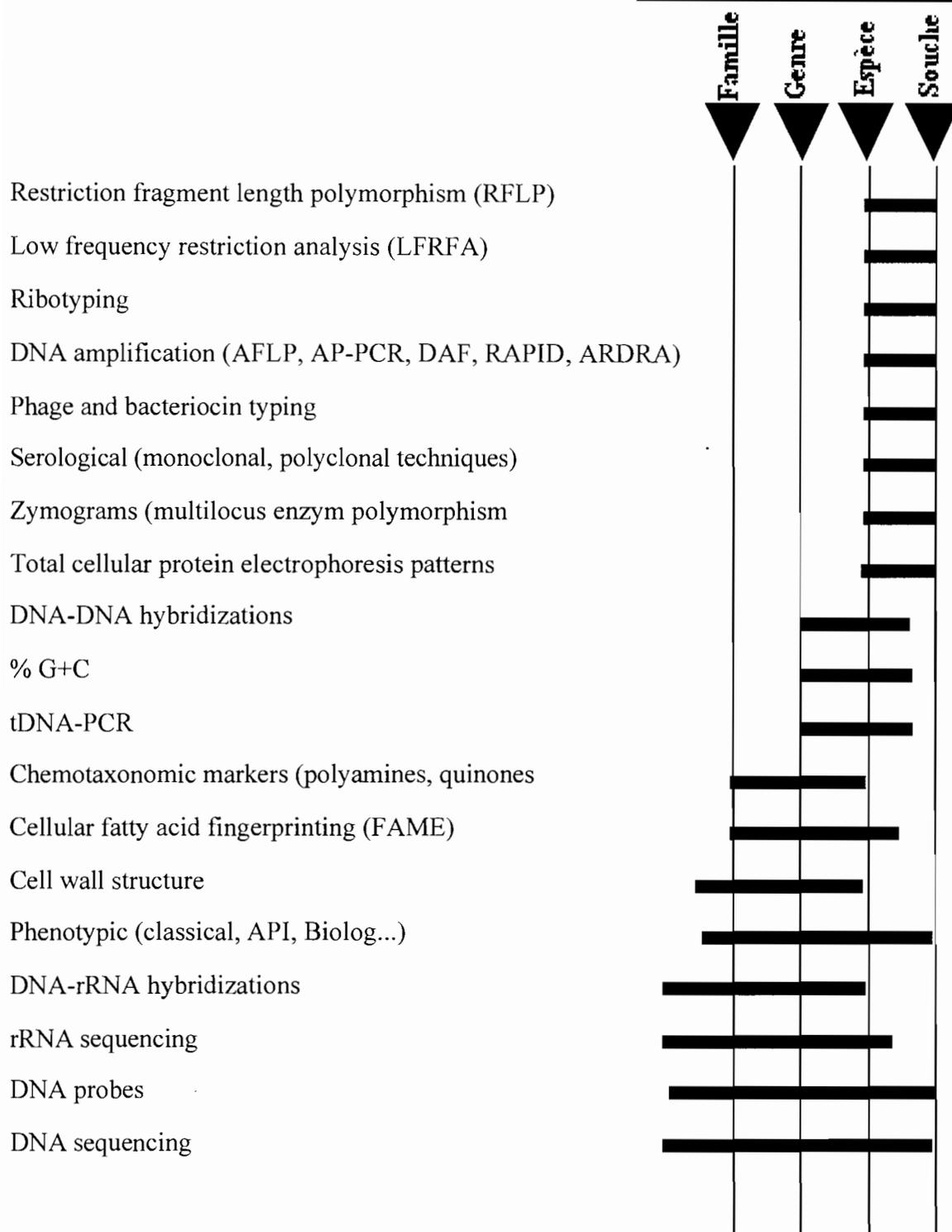


Figure 2 : Niveaux de résolution des différentes techniques utilisées pour la caractérisation des bactéries (Vandamme *et al.* 1996).

L'hybridation ADN/ADN

Le pourcentage d'hybridation ADN/ADN et la baisse de la stabilité thermique de l'hybride sont utilisés pour décrire l'espèce (Wayne *et al.*, 1987). Le taux d'hybridation ADN/ADN est un indicateur de la similarité des séquences entre les génomes entiers qui sont comparés (Grimont, 1980). D'après Stackebrandt et Goebel (1994), deux organismes qui ont 70% d'homologie ADN présentent au moins 90% d'identité de séquence. Plusieurs techniques d'hybridation ont été décrites. Parmi celles ci, la méthode de détermination des taux de renaturation initiale par spectrophotométrie est la plus utilisée (De Ley *et al.*, 1970). Récemment, des techniques miniaturisées plus rapides et nécessitant moins d'ADN ont été décrites (Jahnke, 1994).

Les analyses de séquences

La technique moléculaire la plus fiable est le séquençage total du génome. Elle permet de disposer de la totalité de l'information génétique d'un organisme. Cependant elle reste trop lourde pour être appliquée à un ensemble d'isolats bactériens. Dans ce domaine, les travaux de Woese et Fox (1977) puis Woese (1991), ont permis d'avoir un aperçu plus important de la phylogénie des Procaryotes. L'utilisation des amorces conservées et de Transcriptase reverse pour séquencer des gènes cibles impliqués dans la synthèse des ARNr a permis la plus grande avancée sur la phylogénie des bactéries. L'intérêt du séquençage des gènes rRNA est que les séquences rRNA peuvent être déposées dans des banques de données spécialisées (GENBANK, EMBL...) pour servir à la communauté scientifique. Elles constituent les éléments de comparaison dans les études phylogénétiques et servent à la recherche de " sondes ", oligonucléotides spécifiques pour la détection d'un taxon ou d'un groupe de taxons. Une grande variété d'oligosondes à différents niveaux de spécificité ont été développés et utilisées en écologie microbienne (Laguerre *et al.*, 1994 ; Oliviera *et al.* 1997). Aujourd'hui, la plus importante base de données de la phylogénie des rhizobiums et de toutes les bactéries en général est constituée par les séquences de gènes codant pour les gènes ribosomiaux (rARN).

Les gènes ribosomaux dans la caractérisation des bactéries

Les acides nucléiques ribosomaux (rRNAs) sont considérés comme les biopolymères les plus utiles dans les études de biosystématique et d'écologie microbienne. Les gènes rRNA (rDNA) sont universellement distribués, et généralement bien conservés, avec de plus ou moins grandes variabilités à différentes sections de la molécule (Lane *et al.* 1985). Les rRNAs bactériens sont classés en fonction de leur taux de sédimentation en centrifugation, ainsi au niveau du chromosome bactérien, on distingue les gènes 5S, 16S, ou 23S (figure 3).

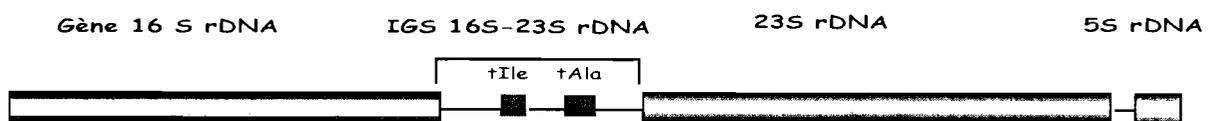


Figure 3 : Cartographie des gènes dans le chromosome bactérien

Le 16S rRNA est la plus petite sous-unité de ribosome. Il est cependant la molécule qui a été la plus étudiée. La phylogénie basée sur l'analyse numérique des séquences d'ARNr 16S corrobore la subdivision des rhizobiums en plusieurs genres (Young *et al.*, 1991 ; Yannick et Yama Soto, 1993). En effet, ces données montrent la répartition des symbiotes des légumineuses dans les branches phylogénétiques alpha et β de la sous-classe des Proteobactéries. Ainsi, cette technique a montré pour la première fois, que les genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* sont très éloignés l'un de l'autre et sont apparentés avec des bactéries non symbiotiques. L'analyse des séquences de 16S rRNA, confirma la proximité phylogénétique entre le genre *Agrobacterium* et *Rhizobium* tel que pensé Fred *et al.* (1932), et révèle leur divergence par rapport à *Azohizobium* et *Bradyrhizobium*. Ces dernières étant plus proches de Bactéries de la subdivision des alpha-Proteobacteria (*Afipia*, *Blastobacter* et *Rhodopseudomonas*). Cependant, du fait de la faible variabilité des séquences de gène 16S rDNA entre les différentes espèces de rhizobium, ce site offre peu de possibilités pour la désignation de "sondes" spécifiques. Par exemple, Les oligosondes spécifiques obtenus par alignement des séquences 16S rDNA de *Rhizobium tropici* et de *R. leguminosarum* ne permettent pas d'exclure *Agrobacterium rhizogenes* (Coutinho *et al.* 2000). Pour la même raison, des "sondes" n'ont pu

être déterminées dans les séquences 16S rDNA d'espèces de *Bradyrhizobium* du fait de leur grande similitude avec *Rhodopseudomonas palustris*.

La grande sous-unité d'ARNr, qui est le 23S est caractérisée par de grandes variations de séquences dans la molécule lorsqu'elle est comparée au 16S rDNA. Euvguenieva et Selenska (1995) ont désigné une sonde spécifique au gène 23S rDNA de *Bradyrhizobium japonicum*. Ces auteurs ont analysé l'ensemble des séquences du gène 23S rDNA de *B. japonicum* mais aussi celles d'autres espèces qui lui sont proches. Une zone de séquence particulièrement variable a été identifiée à l'extrémité 5' du gène 23S rDNA chez *Rhizobium* et *Agrobacterium* (Euvguenieva et Selenska, 1995). Cette zone pourrait servir de cible pour la désignation des amorces et des oligosondes.

L'intergène 16S-23S est la zone génomique la plus prometteuse pour désigner les oligoséquences d'amorçage ainsi que les oligosondes. Cette région contient les tRNA que sont les segments d'ADN avec des séquences nucléotidiques très variables (Oliveira *et al.*, 1999). Selon les espèces ou les souches, il existe des variations considérables des séquences de ces segments et de leurs tailles (Gütler et Stanisich, 1996).

Dans certains cas, une simple PCR de l'IGS 16S-23S utilisant des amorces cibles spécifiques de l'IGS permet de révéler des variations de taille. La digestion enzymatique des produits d'amplification (PCR-RFLP) génère des polymorphismes qui reflètent la variation de séquences entre taxons étudiés. La PCR-RFLP de l'ADNr 16S a été utilisée avec succès (Gaunt *et al.*, 2001) pour étudier la diversité des souches de différents genres du groupe des alpha-Proteobactéries. La PCR-RFLP de l'IGS 16S-23S a été utilisée avec succès dans l'identification et la détection des souches de *Bradyrhizobium* (Gütler et Stanisich, 1996 ; Laguerre *et al.* 1996 ; Willems *et al.*, 2001a, b). A l'aide de cette technique, ces auteurs ont mis en évidence la diversité phylogénétique des souches de *Bradyrhizobium*. D'après Kundig *et al.* (1995), cette technique s'applique de manière plus adéquate chez *B. japonicum* car, l'espèce ne comporte qu'une seule copie de gènes ribosomiaux.

1.4.2.4. L'évolution de la classification des *Rhizobiacea*

La génétique moléculaire, développée depuis deux décennies procura les moyens de reposer la taxonomie microbienne sur les relations phylogénétiques. La systématique moléculaire a apporté une cassure dans la taxonomie des *Rhizobiacea*. Les résultats de reclassification successive et l'introduction de

nouveau taxa ont conduit à la subdivision actuelle de la famille des *Rhizobiaceae* en 10 genres et 30 espèces contrastant avec les 4 genres décrits dans le Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Jordan, 1984). La phylogénie des rhizobiums, confirma les relations proches entre le genre *Agrobacterium* et *Rhizobium* déjà suggérée par Fred *et al.* (1932), et montre leur distance relative par rapport à *Azohizobium* et *Bradyrhizobium*. Ces dernières étant plus proches de Bactéries de la subdivision des Beta-Proteobacteria (*Afipia*, *Blastobacter* et *Rhodopseudomonas*). Le genre *Azorhizobium* comprend une seule espèce *Azorhizobium caulinodans*, identifiée par Dreyfus *et al.* (1988). *Azorhizobium caulinodans* est isolé de nodules de tige de *Sesbania rostrata*.

En 1982, Jarvis identifia dans le genre *Rhizobium* trois espèces : *R. loti*, *R. meliloti* et des espèces types *R. leguminosarum*, regroupant trois biovars. Par la suite, cinq autres espèces ont été décrites : *R. galegae*, isolé de *Galegae officinalis* et *Galegae orientalis* (Lindström, 1989), *R. huakuii* isolé de *Astragalus sinicus* (Chen *et al.*, 1991), *R. leguminosarum* biov. *phaseoli* type II reclassé *R. tropici* (Martinez *et al.*, 1991), *R. leguminosarum* biov. *phaseoli* type I reclassé *R. etli* (Segovia *et al.*, 1993). En Octobre 1994 un nouveau genre, *Sinorhizobium* fut décrit et sur la base des résultats de taxonomie polyphasique, de Lajudie *et al.* (1994) proposèrent une reclassification de *R. meliloti* dans le genre *Sinorhizobium*. Dès lors *R. meliloti* devient *Sinorhizobium meliloti* comb. nov. Deux nouvelles espèces, *Sinorhizobium saheli* et *Sinorhizobium teranga* ont été créées parmi les souches nouvellement isolées du Sénégal. Récemment, d'autres espèces de *Rhizobium* ont été décrites : *R. ciceri* (Nour *et al.*, 1994); *R. hainanensis* (Chen *et al.*, 1994); *R. tianshanense* (Chen *et al.*, 1995); *R. mediterraneum* (Nour *et al.*, 1995); groupe U (a, b, c) (de Lajudie *et al.* 1994). Jarvis *et al.* (1997), puis Lajudie *et al.* (1998) proposèrent successivement, la création d'un cinquième genre *Mesorhizobium*, puis d'un sixième genre *Allorhizobium*. Sy *et al.* (2001) décrivent la souche type de rhizobium méthylotrophe et créent le genre *Methylobacteria*. Dans la même année, Moulin *et al.* (2001) décrivent la souche de *Burkolderia* sp. nodulant la légumineuse *Macroptilium*. De manière beaucoup plus surprenante, deux autres espèces appartenant à deux genres du groupe des Beta-proteobacteria se retrouvent dans la famille des *Rhizobiaceae*. Il s'agit de *Ralstonia taiwanensis* (Chen *et al.*, 2001) nodulant la légumineuse *Mimosa pudica* et de *Blastobacter denitrificans* (Van Berckum et Eardly, 2002) nodulant *Aeschynomene indica*.

Tableau 1: Classification des bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* .

Genres	Espèces	Plantes hôtes	Références
<i>Rhizobium</i>	<i>R. leguminosarum</i>		Jordan, 1984
	biovar <i>viciae</i>	<i>Pisum, vicia, Lathyrus, Lens</i>	Jordan, 1984
	biovar <i>trifolii</i>	<i>Trifolium sp.</i>	Jordan, 1984
	biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Jordan, 1984
	<i>R. galegae</i>		Lindström, 1989
	biovar <i>orientalis</i>	<i>Galega orientalis</i>	Lindström, 1989
	biovar <i>officinalis</i>	<i>Galega officinalis</i>	Lindström, 1989
	<i>R. tropici</i> type IIA	<i>Phaseolus vulgaris L., Leucaena</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
	<i>R. tropici</i> type IIB	<i>Phaseolus vulgaris L., Leucaena</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Segovia <i>et al.</i> , 1993
	<i>R. hainanensis</i>	<i>Desmodium sinuatum</i>	Chen <i>et al.</i> , 1994
	<i>R. gallicum</i>		
	biovar <i>gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997
	biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997
	<i>R. giardinii</i>		
	biov. <i>giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997
Biov. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997	
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica L.</i> Ledebour	van Berkum <i>et al.</i> , 1998	
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	Wang <i>et al.</i> , 1998	
<i>R. yanglingense</i>	<i>Coronilla, Amphicarpae</i>	Tan <i>et al.</i> , 2001	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. loti</i>	<i>Lotus sp.</i>	Jarvis <i>et al.</i> , 1982 ; Jarvis <i>et al.</i> , 97
	<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Chen <i>et al.</i> , 1991 ; Jarvis <i>et al.</i> , 97
	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1994 ; Jarvis <i>et al.</i> , 97
	<i>M. tianshanense</i>	13 espèces de Leg. tropicales	Chen <i>et al.</i> , 1995 ; Jarvis <i>et al.</i> , 97
	<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1995 ; Jarvis <i>et al.</i> , 97
	<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia, prosopis</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998
	<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang <i>et al.</i> , 1999
	<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	Velazquez <i>et al.</i> , 2001
<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>	Jordan, 1984 ; Eardly <i>et al.</i> , 1990 de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
	<i>S. fredii</i>	<i>Glycine max, Glycine soja</i>	Chen <i>et al.</i> , 1988 ;
	<i>S. sahelense</i>	<i>Sesbania sp.</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
	biov. <i>acaciae</i>	<i>Acacia sp.</i>	Haukka <i>et al.</i> 1998
	biov. <i>sesbaniae</i>	<i>Sesbania sp.</i>	Haukka <i>et al.</i> 1998
	<i>S. terangae</i>		
	biov. <i>acaciae</i>	<i>Acacia sp.</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994 ;
	biov. <i>sesbaniae</i>	<i>Sesbania sp.</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994 ;
	<i>S. medicae</i>	<i>Medicago trunculata</i>	Eardly <i>et al.</i> , 1990 ; 1996
<i>S. arboris</i>	<i>Acacia senegal</i>	Nick <i>et al.</i> , 1999	
<i>S. kostiense</i>	<i>Prosopis chilensis</i>	Nick <i>et al.</i> , 1999	
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max, G. soja</i>	Jordan, 1982
	<i>B. sp.</i>	<i>Vigna, Lupinus, Mimosa, Acacia, Aeschynomene sp.</i>	Jordan, 1982 ; Dupuy <i>et al.</i> , 1994 ; Alazard, 1985 ; Young, 1991
	<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	Kuykendall <i>et al.</i> , 1992
	<i>B. liaoningensis</i>	<i>Glycine max, G. soja</i>	Xu <i>et al.</i> , 1995
<i>Allorhizobium</i>	<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998
<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
	<i>A. sp.</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Rinaudo <i>et al.</i> , 1991
<i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria sp.</i>	Sy <i>et al.</i> , 2001
<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia sp.</i>	<i>Macroptilium sp.</i>	Moulin <i>et al.</i> 2001
<i>Ralstonia</i>	<i>R. taiwanensis</i>	<i>Mimosa sp.</i>	Chen <i>et al.</i> 2001
<i>Blastobacter</i>	<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene indica</i>	Van Berkum <i>et al.</i> Eardly, 2002

Ainsi, de plus en plus, on se rend compte que les *Rhizobiaceae* constituent une famille très hétérogène et leur taxonomie est remise en cause. Des auteurs ont même affirmé que les Rhizobiums seraient phylogénétiquement confondus à certaines bactéries cliniques telle *Afipia felis* et autres bactéries phytopathogènes telles *Mycoplana* et *Bartonella* (Willems et Collins, 1993; Yanagi et Yamasato, 1993). La position taxonomique de beaucoup d'isolats de légumineuses tropicales reste à clarifier (Dupuy *et al.*, 1994; Moreira *et al.*, 1998; Doignon-Bourcier *et al.*, 1999; Molouba *et al.*, 1999). Tout récemment, Young *et al.* (2001) ont proposé le regroupement de *Rhizobium*, *Allorhizobium* et *Agrobacterium* en un seul genre révisé qui serait nommé *Rhizobium*. En dehors des trois espèces *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* et *B. liaoningense* (Kuykendall *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1995) que comporte le genre *Bradyrhizobium*, Willems *et al.*, (2001) ont identifié huit autres espèces génomiques parmi des isolats de nodules d'*Aeschynomene*, d'*A. albida* et d'autres légumineuses natives du Sénégal.

Le tableau 1 indique l'état actuel de la classification des bactéries de la famille des *Rhizobiaceae*. Cette classification évolue avec les résultats nouveaux obtenus avec les souches nouvellement isolées chez les légumineuses non encore étudiées, mais aussi avec la performance des techniques d'investigation.

1.4.3. La sélection de souches de rhizobium

Les critères généralement considérés comme déterminants dans la sélection de rhizobiums sont au nombre de trois. Ils sont basés d'une part, sur les relations de ces bactéries avec la plante (compatibilité), avec le sol (adaptation) et d'autre part sur l'aptitude de ces bactéries à devancer les autres dans la compétition pour l'infection (compétitivité).

La compatibilité d'une souche de rhizobium vis-à-vis d'une plante est déterminée par l'infectivité et l'effectivité de la souche. Ces deux critères varient considérablement avec les souches, mais seules sont dites compatibles les souches à la fois infectives et effectives. L'infectivité d'une souche de rhizobium est estimée par la biomasse des nodules formés par unité de surface ou par plante. Cependant, dans le cas de certains AFN, il existe une variation saisonnière de la nodulation qui fait qu'à une certaine période de l'année, ou sur certains type de sol, les nodules sont absents (Barnet *et al.* 1985 ; Ladha *et al.* 1993). Il est établi que l'infectivité dépend de la structure chimique des facteurs Nod impliqués dans les processus de reconnaissance rhizobium / plante hôte.

Dans ces conditions, il est envisageable de fonder la sélection sur l'analyse des facteurs Nod (Lortet *et al.*, 1996) ;

Les souches effectives sont sélectionnées par des tests d'efficience sur plante cultivée en condition optimale *in vitro*. Dans un système tripartite rhizobium / plante / sol, une souche de bactérie adaptée à un sol donné est une souche capable de remplir la double fonction exigée par sa sélection (infectivité et effectivité), tout en persistant dans le sol. Selon Dommergues *et al.* (1999), les grandes différences entre les valeurs de la fixation potentielle et les valeurs de la fixation réelle observée sur le terrain sont dues à l'effet des facteurs adverses dans le sol et qui sont aussi appelés facteurs limitants (Smith et Wollum, 1991). Ce sont des facteurs de nature physique, chimique ou biologique.

La compétitivité d'une souche de rhizobium introduite est définie par son aptitude à dominer les souches natives du sol pour infecter la plante hôte et former avec celle-ci une symbiose effective. Cependant des échecs de l'inoculation ont été souvent enregistrés même lorsque des bactéries parfaitement compatibles ont été utilisées comme inoculum. Dans ces cas, l'examen des nodules avec des méthodes de marquage a montré que ces échecs résultaient de l'incapacité de la souche introduite à occuper les nodules en raison de la présence de souches natives souvent peu effectives. Dans la compétition avec la souche introduite par inoculation, la souche native possède des atouts qui sont liés, soit à leur supériorité numérique soit à leur adaptation bien établie à l'environnement édaphique ou à leur compatibilité plus marquée avec la plante hôte. La compétition entre bactéries symbiotiques est donc un phénomène complexe. Ainsi, de nombreux auteurs (Bauer et Cetano-Anollès, 1990; Dommergues *et al.* 1999) suggèrent que les tests de sélection des souches compétitives destinées à l'inoculation soit faits en présence de souches natives. La compétitivité d'une souche de bactérie symbiotique est représentée par le pourcentage de nodules occupés par cette souche ou par l'index de compétitivité (Amarger et Lobreau, 1982).

Parallèlement aux méthodes modernes développées dans la systématique des rhizobiums, des techniques modernes sont en train d'être développées pour l'identification et la détection de souche sélectionnées et introduites dans le sol. Ce sont des techniques moléculaires impliquant des marqueurs stables et spécifiques. Parmi celles-ci, la technique de PCR-RFLP, qui a montré sa fiabilité et sa reproductibilité pour le positionnement taxonomique de souches nouvellement isolées. Elle a été adaptée à l'analyse directe des souches de *Frankia* présentes dans des broyats nodules de Casuarinacées (Rouvier *et al.*,

1996) puis à la caractérisation directe des rhizobiums dans les nodules de légumineuses (Demba-Diallo, 1999). Cette technique a permis d'initier des études fructueuses sur la compétition entre souches de rhizobium pour la nodulation de diverses espèces de légumineuses. Elle reste cependant relativement longue et coûteuse. Par ailleurs, le développement exponentiel des banques de séquences génomiques apparaît comme une base fantastique pour la mise au point d'outils de caractérisation spécifique de souches. Il s'agit des techniques d'hybridation utilisant des oligosondes spécifiques pour la détection des inoculums dans le sol ou dans les nodules.

1.4.4. L'amélioration du potentiel symbiotique des rhizobiums et la nutrition des arbres : rôle potentiel des champignons endomycorhiziens

En effet, les nodules formés par la symbiose ne peuvent se développer et fixer l'azote que si la plante hôte dispose, en plus de l'eau, de quantités suffisantes d'éléments nutritifs impliqués dans le processus biochimique de la fixation d'azote. Pour acquérir ces éléments, les racines des AFN (arbres fixateurs d'azote), comme celles des autres plantes peuvent s'associer avec les champignons symbiotiques pour former des racines spécialisées appelées mycorhizes (Gianinazzi-Pearson, 1996). Par conséquent, pour les AFN qui croissent sur des sols peu fertiles, la formation de mycorhizes peut être très utile pour assurer un bon fonctionnement de la symbiose (Gianinazzi-Pearson et Diem, 1982). L'amélioration du potentiel fixateur d'azote des AFN pourrait résulter des actions complémentaires et synergiques développées par les partenaires microbiens de la symbiose.

Les travaux sur les interactions compétitives entre champignon mycorhizien et rhizobium sont encore rares. Les champignons mycorhiziens sont très peu spécifiques, en théorie, les champignons mycorhiziens à vésicule arbusculaire (MAV) des six genres connus (*Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Sclerocystis*, *Scutellospora* et *Entrospora*), peuvent infecter tous les AFN pour former des mycorhizes. Diem *et al.*, (1981) puis Diop *et al.* (1994) ont montré qu'au Sénégal, *Casuarina equisetifolia* et *A. albida* étaient infectés par des champignons MVA des genres *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* et *Sclerocystis*. Cornet et Diem (1982); Habte et Soedarjo (1996) ont montré que les légumineuses forestières telles que *Acacia* spp., *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala*, *Prosopis* spp. étaient toutes sensibles à différents degrés à l'infection par les champignons MAV.

Certaines espèces d'AFN, comme *Leucaena leucocephala*, *Albizia ferruginea* et *Enterolobium cyclocarpum* étaient très dépendantes des mycorhizes pour croître sur des sols déficients en phosphore. Ces espèces très dépendantes de la symbiose mycorhizienne se distinguent des autres par leur exigence en phosphore dans le sol, alors que les concentrations de cet élément dans leurs tissus restent faibles (Manjunath et Habte, 1992).

Les effets favorables des mycorhizes sur la croissance des végétaux en milieu pauvre d'une part et sur l'amélioration de certaines propriétés du sol d'autre part sont bien connus. Ces effets résultent du fait que les champignons mycorhiziens, de par leur capacité à pousser simultanément dans les racines et dans le sol, peuvent intervenir dans plusieurs processus physiologiques et écologiques (Smith et Read, 1996). Ces processus sont :

- l'optimisation de la nutrition de la plante et la production de phytohormones de la rhizogénèse ;
- l'amélioration de la tolérance de la plante hôte aux facteurs adverses (acidité, salinité, toxicité manganique ou aluminique ... ;
- la protection contre les champignons phytopathogènes ;
- le transfert des nutriments ;
- l'amélioration des propriétés physiques et chimiques du sol.

Le rôle majeur du partenaire fongique se résume à l'amélioration de la nutrition minérale de la plante hôte par l'absorption des nutriments peu mobilisables et non accessibles par les racines (Gianninazzi-Pearson et Smith, 1993). Le champignon reçoit en retour des substances carbonés sous forme de photosynthétats fournis par la plante. Par conséquent, Smith et Read (1996) pensent que le fonctionnement d'une mycorhize est fondamentalement basé sur la capacité du champignon symbiotique à acquérir les nutriments organiques et minéraux dans le sol, à les transporter dans les hyphes jusqu'aux vésicules *in planta* et à les transférer dans les cellules.

Les champignons MVA sont encore considérés comme des microorganismes symbiotiques obligatoires et leur culture *in vitro*, en masse, n'est pas encore réalisable (Le Tacon *et al.*, 1983 ; Bécard *et al.*, 1992). C'est pour cette raison que pour produire l'inoculum de ces champignons, on utilise des fragments de

hyphes, des spores, des racines mycorhizées (Ba *et al.*, 2001 ; Duponnois *et al.*, 2002).

1.4.5. La fixation biologique de l'azote (FBA) chez les AFN

Comme les plantes annuelles fixatrices d'azote, les arbres fixateurs d'azote (AFN) contribuent à l'approvisionnement des écosystèmes en éléments et organiques divers. Mais, ils présentent un certain nombre de caractéristiques qui les différencient des plantes annuelles à enracinement superficiel.

1.4.5.1. Les nodules des AFN

Les nodules des arbres sont fortement lignifiés et restent longtemps sur les racines. Ils peuvent survivre à l'état de vie ralentie pendant la saison sèche et pourraient constituer des réservoirs d'inoculum dans le sol en assurant la survie et le maintien des rhizobiums introduits (Reddel *et al.*, 1993). Cet avantage est cependant hypothétique et sa validité mériterait d'être étudiée.

1.4.5.2. Le système racinaire des AFN

Contrairement aux plantes annuelles, chez les AFN, la FBA est prolongée bien après la saison des pluies, grâce à l'extension en profondeur de leurs racines, qui permet la remontée de l'eau et parfois même portent des nodules dans leurs horizons les plus profonds (Dupuy *et al.* 1992). Cet avantage justifie l'utilité des AFN dans le maintien de la qualité des sols surtout en zone semi-aride.

1.4.5.3. L'immobilisation et la remobilisation de l'azote par les AFN

De manière incontestable, Il est admis que les AFN occupent une place importante en tant que réservoirs (pools) d'azote, agents de la redistribution de l'azote dans les écosystèmes

Chez les arbres, qu'ils soient ou non fixateurs, l'azote assimilé (provenant du sol ou de la fixation) peut être immobilisé sous forme de réserves dans les organes de la plante, puis remobilisés et subir des translocations dans différents organes. Dans les tissus des arbres, la concentration en azote a tendance à fluctuer avec les périodes de végétation (phénologie). Une partie de l'azote des feuilles migre vers les rameaux avant la chute des feuilles en automne (Dommergues *et al.*, 1999). Le phénomène inverse s'observe au printemps. Domenach et Kurdali (1989) ont effectivement montré qu'à la fin de la période de pousse des feuilles, 10% de l'azote total des feuilles provenait de la remobilisation de l'azote des réserves. Pour éviter l'influence de l'apport

d'azote des réserves dans les études isotopiques, ces auteurs recommandent ainsi le choix des échantillons de jeunes pousses destinés à l'analyse.

1.4.5.4. L'Influence de l'âge des arbres sur la FBA

La fixation de l'azote varie tout au long de la vie de l'arbre. Insignifiante lorsque l'arbre est au stade de jeune plant, cette activité augmente plus ou moins rapidement avec la croissance de la plante. Selon les espèces et en fonction du milieu, l'activité fixatrice d'azote peut diminuer ou même s'annuler, lorsque l'arbre atteint un certain âge.

1.4.5.5. L'estimation de la FBA chez les AFN

Quoique l'économie de l'azote et le maintien de la fertilité azotée des sols soient depuis longtemps perçus comme des objectifs prioritaires de la recherche, nous ne connaissons que rarement la quantité d'azote fixée dans les écosystèmes. Or la connaissance de la quantité d'azote fixé dans un écosystème est une donnée essentielle non seulement sur le plan appliqué pour connaître les rendements de l'apport d'azote, mais aussi sur le plan fondamental pour valider des technologies d'amélioration de la plante ou des microorganismes associés. Mais cette évaluation est délicate, car il n'est pas facile de différencier l'azote provenant des différentes sources. De nombreuses méthodes ont été proposées et ont fait l'objet de nombreuses revues (Giller et Wilson, 1991 ; Hardarson et Danso, 1993). Nous présentons ici quelques-unes, en évoquant simplement les avantages et inconvénients de leur application au cas des AFN.

a) L'ARA (activité réductrice d'acétylène) est la méthode la plus largement utilisée pour estimer l'azote fixé biologiquement (Roskoski, 1982; Högberg et Kvarnstrom, 1982). C'est une méthode indirecte, simple, rapide, économique et sensible. Elle s'avère précieuse sur le terrain et dans le screening initial de grands nombres de systèmes fixateurs de potentiel inconnu (Balandreau et Dommergues, 1971). Cependant, L'ARA présente deux inconvénients majeurs qui limitent sa précision dans l'estimation de l'azote total fixé (Mitchin *et al.*, 1983) :

-son caractère ponctuel ne reflète pas la fixation biologique de l'azote dans le temps (Fried *et al.*, 1983);

-le rapport de conversion 3 qui n'est pas applicable dans tous les cas (Rennie *et al.*, 1978; Hansen *et al.*, 1987).

b) La méthode par différence de rendements en N₂ permet d'obtenir la quantité d'azote fixé biologiquement en faisant la différence entre la teneur en azote total des plantes fixatrices (inoculées) et celle des plantes non fixatrices (non-inoculées). Son postulat de base est que les plantes fixatrices et les témoins doivent absorber la même quantité d'azote au niveau de leur racine. Il fournit un résultat quantitatif assez précis, mais présente des inconvénients majeurs lorsque le milieu de culture est riche en azote et que l'assimilation n'est pas égale entre la plante fixatrice et la plante de référence, (Danso *et al.*, 1986).

c) La comparaison des poids secs des plantes (Roskoski, 1981; Högberg et Kvarnstrom, 1982), ainsi que la production d'uréides basée sur la composition en azote des produits de la sève brute (Mc Clure *et al.*, 1980; Herridge, 1982) sont deux méthodes qui ne permettent pas de distinguer les rentrées d'azote provenant de la symbiose de celles provenant des nitrates du sol.

d) Les méthodes de mesure les plus performantes pour quantifier l'azote provenant de la symbiose ont été développées avec l'utilisation de marqueurs isotopiques ¹⁵N (Fried et Midleboe, 1977; Witty, 1983). Parmi celles ci la dilution isotopique ¹⁵N et *A value* (Fried et Broeschart, 1975; Fried et Midleboe, 1977; Vose *et al.*, 1982; Cornet *et al.*, 1985; Danso *et al.*, 1986; Ndoye et Dreyfus, 1988; Sanginga *et al.*, 1989). Ces méthodes isotopiques donnent des estimations directes de la fixation biologique et intégrale en fonction du temps. En plus de l'aspect quantitatif et de la capacité de distinguer la contribution des différentes sources azotées, elles présentent un aspect qualitatif permettant de déterminer les effets synergiques et dépressifs de différents traitements sur la fixation. Leur avantage dans les Sciences du sol se justifie surtout par les possibilités de leur utilisation non seulement en condition contrôlée, mais au champ. Elles présentent aussi des inconvénients liés au choix inhérent de la plante témoin et au coût élevé du matériel d'analyse. Aucune des différentes méthodes ne s'impose de manière générale. Les méthodes isotopiques sont très puissantes et fournissent des données les plus fiables de l'azote total fixé biologiquement en condition naturelle. Les autres n'en sont pas moins importantes. Le choix d'une méthode dépend finalement des objectifs de recherche et surtout de la disponibilité des moyens.

**MATERIEL
& METHODES**

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. CARACTÉRISATION DES RHIZOBIUMS

Les souches de rhizobium utilisées au cours de cette étude, ainsi que leur origine sont énumérées dans le tableau 2. Les méthodes d'étude utilisées sont phénotypique (analyse des protéines totales bactériennes) et génotypique (polymorphisme des fragments de restriction du gène 16S rDNA, analyse des séquences de gène 16S rDNA, analyse des séquences de l'intergène 16S-23S rDNA).

Tableau 2 : Nomenclature des souches utilisées

Souches (Vitesse de croissance)	Code LMG	Plante d'isolement	Origine géographique	
Souches à croissance rapide isolées de <i>Pterocarpus</i> spp.				
ORS 207		<i>P. erinaceus</i>	Camp du lion Niokolokoba	Sénégal
ORS 210	LMG 15199	<i>P. erinaceus</i>	Camp du lion Niokolokoba	Sénégal
ORS 211	LMG 15200	<i>P. erinaceus</i>	Camp du lion Niokolokoba	Sénégal
ORS 212		<i>P. erinaceus</i>	Camp du lion Niokolokoba	Sénégal
ORS 214	LMG 15203	<i>P. erinaceus</i>	Mbolor II Niokolokoba	Sénégal
ORS 215	LMG 15204	<i>P. erinaceus</i>	Badoye, Niokolokoba	Sénégal
ORS 217	LMG 15206	<i>P. erinaceus</i>	Mare auxabeilles Niokolokoba	Sénégal
ORS 220	LMG 15208	<i>P. erinaceus</i>	Dindéfello, Niokolokoba	Sénégal
ORS 227	LMG 15214	<i>P. erinaceus</i>	Camp du lion Niokolokoba	Sénégal
ORS 230	LMG 15216	<i>P. erinaceus</i>	36 km, Est Linguère, Ferlo	Sénégal
ORS 231	LMG 15217	<i>P. erinaceus</i>	36 km, Est Linguère, Ferlo	Sénégal
ORS 235		<i>P. lucens</i>	6 km, Nord Yonoféré, Ferlo	Sénégal
ORS 239	LMG 15222	<i>P. lucens</i>	15 km, Nord Yonoféré, Ferlo	Sénégal
ORS 240	LMG 15223	<i>P. lucens</i>	15 km, Nord Yonoféré, Ferlo	Sénégal
ORS 242	LMG 15225	<i>P. lucens</i>	15 km, Nord Yonoféré, Ferlo	Sénégal
ORS 243	LMG 15226	<i>P. lucens</i>	15 km, Nord Yonoféré, Ferlo	Sénégal
ORS 246	LMG 15227	<i>P. lucens</i>	15 km, Nord Yonoféré, Ferlo	Sénégal
ORS 247	LMG 15228	<i>P. lucens</i>	15 km, Nord Yonoféré, Ferlo	Sénégal
ORS 248	LMG 15229	<i>P. lucens</i>	15 km, Nord Yonoféré, Ferlo	Sénégal
ORS 251	LMG 15230	<i>P. lucens</i>	7 km, S-W, Vélingara, Ferlo	Sénégal
ORS 252		<i>P. lucens</i>	7 km, S-W, Vélingara, Ferlo	Sénégal
ORS 253	LMG 15232	<i>P. erinaceus</i>	8 km, S-W, Vélingara, Ferlo	Sénégal
ORS 255	LMG 15234	<i>P. erinaceus</i>	18 km, S-W, Vélingara, Ferlo	Sénégal
ORS 256		<i>P. lucens</i>	10 km, Nord, Vélingara, Ferlo	Sénégal
ORS 257	LMG 15236	<i>P. lucens</i>	7 km, S-W, Vélingara, Ferlo	Sénégal
ORS 259	LMG 15237	<i>P. lucens</i>	6 km, Nord Yonoféré, Ferlo	Sénégal
ORS 260		<i>P. lucens</i>	15 km, Nord Yonoféré, Ferlo	Sénégal
ORS 261	LMG 15239	<i>P. lucens</i>	6 km, Nord Yonoféré, Ferlo	Sénégal
Souches à croissance lente isolées de <i>Pterocarpus</i> spp.				
ORS 196	LMG 15188	<i>P. lucens</i>	6 km, Nord Yonoféré, Ferlo	Sénégal
ORS 198		<i>P. erinaceus</i>	Camp du lion, Niokolokoba	Sénégal
ORS 199	LMG 15190	<i>P. erinaceus</i>	X Patte d'Oie, Niokolokoba	Sénégal
ORS 200		<i>P. erinaceus</i>	X Patte d'Oie, Niokolokoba	Sénégal
ORS 201	LMG 15192	<i>P. erinaceus</i>	Pont Ouassadou, Niokolokoba	Sénégal
ORS 203	LMG 15193	<i>P. erinaceus</i>	Pont Nierico, Niokolokoba	Sénégal
ORS 204	LMG 15194	<i>P. erinaceus</i>	Pont Nierico, Niokolokoba	Sénégal

ORS 206	LMG 15196	<i>P. erinaceus</i>	Pont Nierico, Niokolokoba	Sénégal
ORS 208		<i>P. erinaceus</i>	Camp du lion, Niokolokoba	Sénégal
ORS 221	LMG 15209	<i>P. erinaceus</i>	Camp du lion, Niokolokoba	Sénégal
ORS 222		<i>P. erinaceus</i>	Malapa Oubadji, Niokolokoba	Sénégal
ORS 223	LMG 15211	<i>P. erinaceus</i>	Dindéfelo, Niokolokoba	Sénégal
ORS 226	LMG 15213	<i>P. erinaceus</i>	Mare aux abeilles, Niokolo.	Sénégal
ORS 228	LMG 15215	<i>P. lucens</i>	31 km, Est Linguère, Ferlo	Sénégal
ORS 232		<i>P. lucens</i>	6 km, Nord Yonoféré, Ferlo	Sénégal
ORS 233		<i>P. lucens</i>	6 km, Nord Yonoféré, Ferlo	Sénégal
ORS 238		<i>P. lucens</i>	6 km, Nord Yonoféré, Ferlo	Sénégal
ORS 241	LMG 15224	<i>P. lucens</i>	15 km, Nord Yonoféré, Ferlo	Sénégal
ORS 244		<i>P. lucens</i>	15 km, Nord Yonoféré, Ferlo	Sénégal
ORS 245		<i>P. lucens</i>	15 km, Nord Yonoféré, Ferlo	Sénégal
ORS 263		<i>P. lucens</i>	10 km, Nord Vélingara, Ferlo	Sénégal
ORS 264		<i>P. lucens</i>	18 km, S-W Vélingara, Ferlo	Sénégal

Quelques genres et espèces utilisés comme références

Agrobacterium (separate taxa)

NCPFB 1771	LMG 233A		
<i>Agrobacterium</i> biovar 1			
B6 ^T	LMG 187 ^{TA}		
B2 A	LMG 268A		
ATCC 19358 ^T	LMG 140 ^{TA}		

Agrobacterium biovar 2

ATCC 13335	LMG 156 ^{TA}		
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>			
ATCC 11325 ^T	LMG 150 ^{TA}		
<i>Agrobacterium vitis</i>			
PAN AG 61	LMG 257A		

Azorhizobium caulinodans

FY 12	LMG 11352	<i>Sesbania rostrata</i>	Sénégal
ORS 478	LMG 11820	<i>Sesbania rostrata</i>	Sénégal
ORS 571T	LMG 6465 ^T	<i>Sesbania rostrata</i>	Sénégal
ORS 486?	LMG11822	<i>Sesbania rostrata</i>	Sénégal

Bradyrhizobium japonicum

NZP 5533	LMG 6136	<i>Glycine max</i>	USA
NZP 5549 ^T	LMG 6138 ^T	<i>Glycine hispida</i>	Japon
Cb 756	LMG 8319		
NZP 2314	LMG 6129		
NZP 2309	LMG 6128		

Bradyrhizobium elkanii

NZP 5531 ^T	LMG 6134 ^T	<i>Glycine max</i>	USA
NZP 5532	LMG 6135	<i>Glycine max</i>	USA

Bradyrhizobium sp.
(Gr. 1ND, Gr. 12FM.)

Br. 29	LMG 9520		Brésil
Br. 6011	LMG 9514	<i>Lonchocarpus costatus</i>	Brésil
Br. 6009	LMG 9512	<i>Lonchocarpus costatus</i>	Brésil
Br 8402	LMG 10015	<i>Dalbergia riparia</i>	Brésil
INPA 260	LMG 1090	<i>Dalbergia riparia</i>	Brésil
MAR 411	LMG 14300		
ORS 184	LMG 10723	<i>Acacia albida</i>	Sénégal
ORS 188	LMG 10727	<i>Acacia albida</i>	Sénégal
ORS 347	LMG 10298	<i>Aeschynomene indica</i>	Sénégal
ORS 306	LMG 11797	<i>Aeschynomene indica</i>	Sénégal

ORS Pa 44	LMG 11928	<i>Prosopis africana</i>	Sénégal
<i>Mesorhizobium</i> sp. <i>cicer</i>			
IC-60	LMG 14995	<i>Cicer arietinum</i>	Espagne
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>			
UPM Ca 142	LMG 14990	<i>Cicer arietinum</i>	Espagne
<i>Rhizobium galegae</i>			
HAMBI 540 ^T	LMG 6214	<i>Galegae orientalis</i>	Finlande
HAMBI 1147	LMG 6215	<i>Galegae orientalis</i>	Finlande
<i>Rhizobium leguminosarum</i>			
biovar <i>viciae</i>			
NZP 561	LMG 6122		
biovar <i>viciae</i>			
ATCC 10004 ^T	LMG 8817	<i>Pisum sativum</i>	
biovar <i>phaseoli</i>			
ATCC 14482	LMG 8819	<i>Phaseolus</i> L.	
<i>Rhizobium tropici</i>			
CFN 299	LMG 9517	<i>Phaseolis vulgaris</i>	Brésil
<i>Rhizobium</i> sp. (Gr.5, Gr.7 et Gr.15 FM.)			
Br 809	LMG 9950	<i>Leucaena leucocephala</i>	Brésil
Br. 8803	LMG 10022	<i>Glyricidia sepium</i>	Brésil
INPA 95A	LMG 10134	<i>Leucaena pulvurulenta</i>	Brésil
INPA 133B	LMG 10062	<i>Leucaena leucocephala</i>	Brésil
<i>Mesorhizobium loti</i>			
NZP 2213	LMG 6125	<i>Lotus corniculatus</i>	Nouvelle Zélande
NZP 2230	LMG 6126	<i>Lotus maroccanus</i>	Maroc
USDA 208	LMG 6219		
<i>Mesorhizobium plurifarum</i>			
INPA 129 A	LMG 6123	<i>Lotus divaricatus</i>	Nouvelle Zélande
NZP 2037	LMG 6123	<i>Lotus divaricatus</i>	Nouvelle Zélande
ORS 1004	LMG 7848	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal
ORS 1014t2	LMG 7849	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal
ORS 1029	LMG 11889	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal
ORS 1040	LMG 11898	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal
ORS 1032 ^T	LMG 11892 ^T	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal
<i>Mesorhizobium ciceri</i>			
UPM Ca 7 ^T	LMG 14989	<i>Cicer arietinum</i>	Espagne
IC 2091	LMG 15086	<i>Cicer arietinum</i>	Espagne
<i>Mesorhizobium huakuii</i>			
IAM 14158 ^T	LMG 14107	<i>Astragalus sinicus</i>	Chine
<i>Mesorhizobium huakuii</i>			
UPM Ca142	LMG14990		
<i>Sinorhizobium fredii</i>			
USDA 191	LMG 6217		
USDA 205 ^T	LMG 8317 ^T		
<i>Sinorhizobium saheli</i> (suite tableau 2)			
ORS 600	LMG 11864 (YM)	<i>Sesbania pachycarpa</i>	Sénégal
ORS 611	LMG 8310	<i>Sesbania grandiflora</i>	Sénégal
ORS 609 ^T	LMG 7837 ^{Td}	<i>Sesbania cannabina</i>	Sénégal
ORS 609t2	LMG 8309	<i>Sesbania cannabina</i>	Sénégal

ORS 12=Pj12	LMG 7835	<i>Prosopis juliflora</i>	Sénégal
<i>Sinorhizobium teranga</i>			
ORS 1009	LMG 7834	<i>Acacia laeta</i>	Sénégal
ORS 1013	LMG 7844T1	<i>Acacia senegal</i>	Sénégal
ORS 1025	LMG 11885		
ORS 1045	LMG 11901	<i>Acacia raddiana</i>	Sénégal
<i>Sinorhizobium meliloti</i>			
NZP 4009	LMG 6130	<i>Medicago sativa</i>	Australie
NZP 4027 ^T	LMG 6133	<i>Medicago sativa</i>	Australie

ATCC, American type Culture collection. Rockville, Md.; Br. Strain from CNPBS/EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa em Biologia do solo, Seropedica, Rio de Janeiro, Brasileira de Pesquisa Agropecaria; CDC, Centers for Disease Control, Atlanta, Ga. ; CFN, Centro de investigacion sobre Fijacion de Nitrogeno, Universidad Nacional Autonomade Mexico, cuernavaca, Mexico; HAMBI, Culture Collection of the Departement of Microbiology, University of Helsinki, Finland; IAM Institute of Applied Microbiology, the University of Tokyo, Japan; IC et UPM, Departamento de Microbiologia, E.T.S. de Ingenieros Agronomos, Universidad Politecnica, Madrid, Spain; INPA, National Institute of Amazonia Reserch, Manaus Brésil; LMG, Collection of Bacteria of the Laboratorium voor microbiologie, University of Ghent, Belgium; NCPPB, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, U.K.; NZP, Culture Collection of the Departement for Scientific Research and Industrial, Biochemistry Division, Palmerson North, New Zealand; ORS , Collection de l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération, dakar, Sénégal; pan, Panagopoulos, Crete, greece; USDA, united States Department of Agriculture, Beltsville, Md.

2.1.1. Caractérisation phénotypique : analyse des protéines totales de la cellule bactérienne

Le principe de l'électrophorèse SDS-PAGE, consiste en la séparation des protéines d'une souche bactérienne suivant leur mobilité dans un champ électrique, sur un support de gel de polyacrylamide. Il en résulte un électrophorégramme ou profil protéique complexe dont chaque bande est composée de plusieurs polypeptides de structures différentes mais de mobilité identique. Cet électrophorégramme est caractéristique de la souche étudiée. Il est en effet très reproductible et s'est avérée être une technique très puissante de caractérisation, qui donne surtout une information sur l'analogie des souches appartenant aux mêmes genres, espèces ou sous espèces. Elle permet également de reconnaître des souches individuelles dans la même espèce. Le classement obtenu par électrophorèse protéique se trouve semblable à celui établi par la technique d'hybridation ADN / ADN.

Pour élargir les données acquises sur la diversité phénotypique des rhizobiums isolés de *Pterocarpus erinaceus* et de *P. lucens* au Sénégal (Sylla, 1996), l'analyse des protéines totales a été réalisée pour 50 souches de rhizobium de notre collection. Leurs profils protéiques ont été analysés en association avec ceux des souches de référence de la banque de données du Laboratoire de Microbiologie de Gand/Belgique. Les souches de référence appartiennent à

différents groupes et/ou espèces de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*., *Mesorhizobium* et *Agrobacterium*.

2.1.1.1. Préparation des extraits protéiques

Les extraits protéiques bactériens sont préparés suivant la méthode décrite par Kiredjan *et al.* (1986).

Pour réaliser l'électrophorèse d'extraits protéiques bactériens, il est nécessaire de disposer d'au moins 50 à 60 mg de biomasse bactérienne de chaque souche. Pour une bonne reproductibilité du système permettant l'étude comparative, le milieu de culture standard doit être riche et tamponné, afin d'optimiser la croissance bactérienne dans des conditions de pH constant pendant la durée de la culture. Pour *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, nous utilisons le milieu TY (Tryptone Yeast) tamponné. Sur ce milieu, les bactéries produisent peu de polysaccharides, gênants pour l'extraction des protéines.

2.1.1.2. Préculture des bactéries

La quantité d'une öse de bactéries a été inoculée sur un milieu TY tamponné gélosé en tube de verre. Ce procédé a été répété encore deux fois à chaque fois que la culture stock en YMA est âgée de plus d'une semaine.

2.1.1.3. Production de biomasse bactérienne

Au bout de 48 heures (pour les pour les souches à croissance rapide) et 72 heures (pour les pour les pour les souches à croissance rapide), la culture sur TY (Triptone Yeast) incliné a été homogénéisée dans 3 ml de solution de tampon phosphate stérile 0,01 M, pH 7.

Cette suspension a été employée pour inoculer des milieux TY tamponné gélosé stériles en boîtes de Pétri (3 à 5 boîtes par souche). L'inoculum a été uniformément réparti à la surface de l'agar puis les boîtes ont été incubées pendant 48 à 72 heures à 28° C.

2.1.1.4. Récolte des bactéries

Les bactéries ont été récoltées en fin de phase exponentielle dans une suspension de tampon phosphate de sodium 0,01 M pH 7,3 (appelé NaPBS). Elles ont été recueillies après filtration, puis centrifugées pendant 10 minutes à 8.000 rpm (sorvall RC2B, rotor type SS34). Les cellules ont été ensuite lavées (resuspendues) et récoltées (recentrifugées) 2 fois dans le même tampon.

2.1.1.5. Extraction des protéines bactériennes

Après les deux cycles de lavage, le surnageant a été éliminé et les bactéries forment un culot au fond du tube. Au moins 50 à 60 mg de la biomasse bactérienne de chaque souche a été mise en suspension (dans des tubes Eppendorf) dans 0,9 ml de tampon STB (0,062 M Tris HCl) pH 6,8.

La lyse des cellules a été effectuée après addition de 0,1 ml de SDS 20%, et chauffage des échantillons pendant 10 minutes à 95°C. Les extraits protéiques ont été immédiatement refroidis dans de la glace puis centrifugés pendant 5 minutes dans une centrifugeuse de type Eppendorf. Le surnageant a été alors partagé en deux. Une partie a été conservée à -80°C, et l'autre partie destinée à l'usage courant, gardée à -20° C.

2.1.1.6. Séparation des protéines sur gel polyacrylamide

Les protéines ont été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) et en présence de SDS (Laemmli, 1970) à l'aide du matériel de type Hoeffler SE 600 ou LKB 2001 (gels verticaux).

2.1.1.7. Analyse des profils protéiques ou électrophorégrammes

Une première analyse visuelle des profils d'extraits protéiques bactériens a été réalisée sur des gels de contrôle. Elle a permis non seulement d'ajuster les concentrations de dépôts dans les puits du gel mais aussi de regrouper les profils électrophorétiques similaires pour une deuxième électrophorèse des mêmes extraits. En outre le dépôt de 7 µl d'un extrait protéique d'une souche de référence (souche de *Psychrobacter immobilis* LMG1125) et de 3 µl de protéines de poids moléculaire connu (marqueurs protéiques Sigma), a permis de vérifier la reproductibilité et le bon déroulement de l'électrophorèse. L'extrait protéique de la souche LMG1125 et les marqueurs de poids moléculaire ont été appliqués respectivement 4 et 2 fois sur chaque gel à analyser.

Les gels définitifs ont été d'abord scannés. La saisie des données (scannérisation), la standardisation et l'analyse comparative des gels ont été effectuées à l'aide du programme GELCOMPAR. Toutes les bandes protéiques ont été comparées deux à deux et les similarités entre profils ont été calculées en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson (r). Les résultats ont été présentés sous forme de dendrogramme.

Ce sont des souches représentatives des différents groupes de rhizobiums isolés de *Pterocarpus* définis sur la base de leur caractéristique phénotypique (Sylla, 1996).

2.1.2. Caractérisation génotypique

Les techniques basées sur l'analyse du génome sont réalisées sur des extraits d'ADN du génome bactérien.

2.1.2.1. Extraction d'ADN génomique des rhizobiums

Les bactéries sont cultivées pendant 48 à 72 heures sous agitation à 37 ° C sur milieu YM. Les cultures (5ml) sont ensuite centrifugées (10 à 14 000rpm), puis les cellules sont lavées une fois avec du TE (Tampon Tris HCl, 10 mM; EDTA, 1mM; pH8). Les cellules sont ensuite lysées par incubation pendant 30 min à 37 °C dans 500 µl de TE contenant du lysozyme à 1mg/ml. Par la suite, 30 µl de SDS 10 % et 10 µl de protéinase K à 20 mg/ ml sont ajoutés au mélange pour dénaturer les protéines.

Après une nuit d'incubation à 37°C, un mélange de 20 µl de SDS 10 % et 130 µl de NaCl 5M est alors ajouté. Une agitation (vortex) permet de précipiter les protéines, et une centrifugation après 30 min d'incubation dans la glace permet de séparer les protéines (culot) à l'ADN contenu dans le surnageant. Afin d'éliminer toutes traces de protéines et de lipide, le surnageant récupéré est soumis à deux séries de deux lavages (5 min à 5000 rpm), d'abord avec un mélange de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25/24/1; v/v/v), puis avec du chloroforme-alcool isoamylique (24/1; v/v).

L'ADN est ensuite précipité par addition de 70 µl d'acétate de sodium (3 M à pH 5,2) et de 1 ml d'isopropanol. Après centrifugation, l'ADN est lavé avec de l'éthanol 70 %, puis séché avant d'être repris dans 50 µl de Tris 10 mM, pH 8. Cette étape est suivie de la phase de traitement de l'ADN à la RNase A (2,5 µl à 0,4 mg/ml) pendant 2 heures à 37 °C. L'ADN est de nouveau précipité, lavé à l'éthanol 70 % et conservé à 4 °C pour dissolution complète avant d'être finalement stocké à -20° C.

Pour les six souches dont les séquences ont été étudiées, la pureté de l'ADN extrait a été contrôlée par la mesure du spectre d'absorption à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS BECKMAN DU 40. L'ADN est considéré comme pure lorsque le rapport DO 260 nm / DO 280nm est compris entre 1,8 et 2 et le rapport DO 234/ DO 260 est voisin de 0,5 (Heyndrickx *et al.*, 1996).

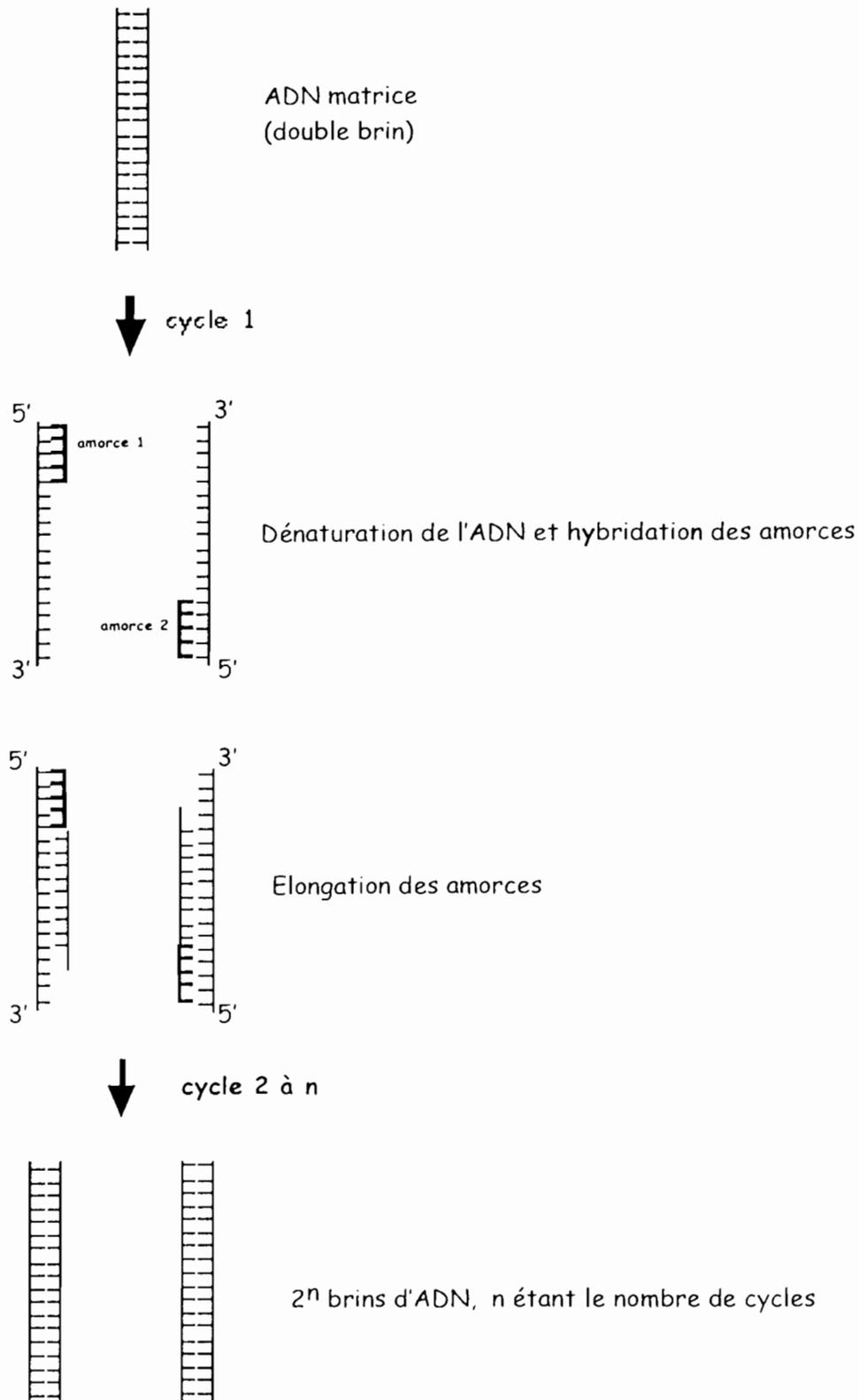


Figure 4 : Principe de l'amplification de l'ADN par la réaction de polymérase en chaîne (PCR)

2.1.2.2. Analyse du polymorphisme des fragments de restriction PCR-RFLP

Amplification de l'ADN par PCR

Le principe de la méthode d'amplification d'ADN *in vitro* consiste à hybrider un ADN dénaturé à deux amorces oligonucléotides qui permettent la copie du brin d'ADN qu'ils encadrent (Saiki *et al.*, 1988). Chaque couple d'amorces est composé d'un oligomère complémentaire de l'extrémité 3' du monobrin d'ADN à amplifier et d'un autre oligonucléotide complémentaire de l'extrémité 3' du brin anti-parallèle. La polymérisation est réalisée en présence de désoxy nucléotides triphosphates dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), d'ADN polymérase (Taq) et de MgCl₂. La Taq est une enzyme thermorésistante isolée de *Thermus aquaticus* (Mulis et Faloona, 1987), une bactérie qui se développe à haute température.

Les réactions de PCR ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur Applied Biosystems : Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer) dans un volume réactionnel total de 25 µl. Ce volume réactionnel est une mixture composée de 50ng d'extrait ADN génomique; 2,5 mM de chaque désoxy nucleotide triphosphate (dNTPs), 10 mM Tris-HCl, (pH 9 à température du laboratoire); 50 mM de KCl; 1,5 mM MgCl₂; 20mM de chacun des deux amorces et 1 U de Taq polymerase. La synthèse des brins complémentaires se réalise suivant un régime de 35 cycles. Chaque cycle comporte une succession de trois étapes principales (figure 4) que sont la dénaturation, l'hybridation et la polymérisation.

La dénaturation thermique de l'ADN matrice bicaténaire permet la séparation des deux brins complémentaires antiparallèles orientés 5'-3' et 3'-5';

L'hybridation consiste en l'appariement des deux amorces spécifiques complémentaires à chacun des deux brins de l'ADN matrice.

L'élongation se fait à partir des extrémités 3'OH libres des amorces par polymérisation enzymatique de précurseurs désoxyribonucléotides.

La température d'hybridation (th) et la durée d'élongation (te) dépendent de la taille du fragment à amplifier. Ces paramètres sont respectivement égales à 60°C et 30s pour l'amplification du 16S rDNA et à 55°C et 30s pour l'amplification de l'IGS rDNA (voir figures 5 et 6).

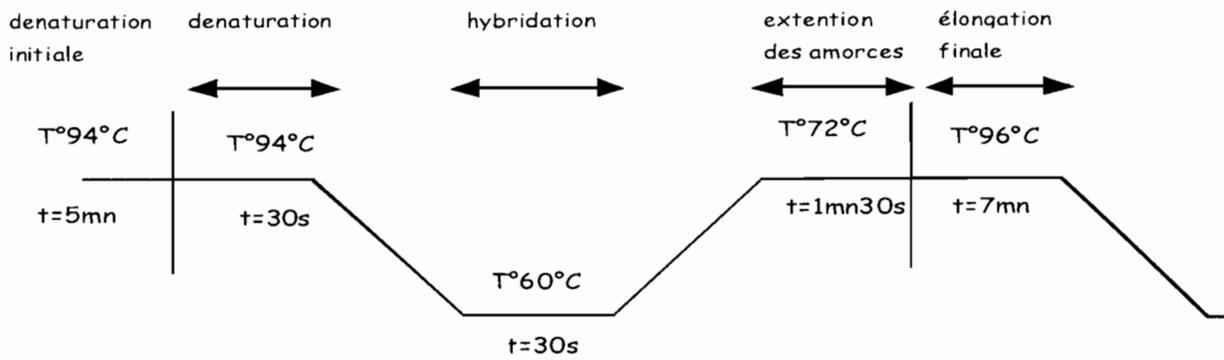


Figure 5 : Cycle d'amplification du gène 16S rDNA

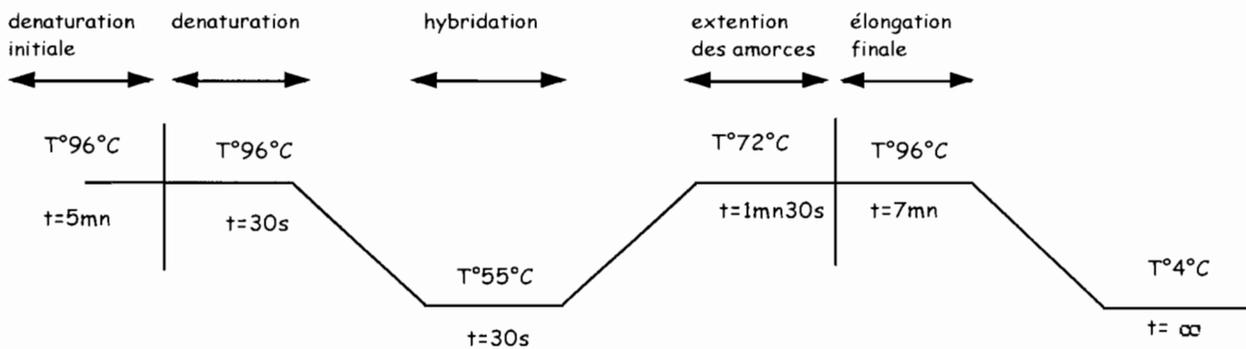


Figure 6 : Cycle d'amplification de l'intergène 16S-23S rDNA

Tableau 3 . Amorces (*primers*) utilisées pour la PCR et les réactions de séquence

Primer name	Primer sequence (5' - 3')	Target Gene	Reference
FGPS6	(5'-GGA-GAG-TTA-GAT-CTT-GGC-TCA-G-3')	16SrDNA	Normand <i>et al.</i> (1992)
FGPS 1509	(5'-AAG-GAG-GGG-ATC-CAG-CCG-CA-3')	16SrDNA	Normand <i>et al.</i> (1992)
16S 370f	(5'-GGC-AGC-AGT-GGG-GAA-TAT-TG-3')	16SrDNA	Sy <i>et al.</i> (2001)
16S-1080rev	(5'-GGG-ACT-TAA-CCC-AAC-ATC-T-3')	16SrDNA	Sy <i>et al.</i> (2001)
16S 870f	(5'-CCT-GGG-GAG-TAC-GGT-CGC-AAG-3')	16SrDNA	Sy <i>et al.</i> (2001)
16S 1924 rev	(5'-GGC-ACG-AAG-TTA-GCC-GGG-GC-3')	16SrDNA	Sy <i>et al.</i> (2001)
FGPL 132-38	(5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3')	IGS rDNA	Ponsonnet <i>et al.</i> (1994)
FGPS 1490-72	(5'-TGCGGCTGGATCCCCTCCTT-3')	IGS rDNA	Normand <i>et al.</i> (1996)

Les amorces utilisées varient également selon la taille du fragment à amplifier. La liste des amorces ou *primers* pour les réactions d'amplification est présentée au tableau 3. La figure 7 indique les positions d'amorçage des *primers* au niveau des séquences de gène 16S et de l'intergène 16S-23S.

La mise en évidence des produits de PCR est réalisée en faisant migrer 5 μ l d'amplifiat par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %), dans un tampon TBE 1X (Tris-HCl 1,1 p/v; Na₂EDTA 0,1 % p/v·2H₂O; acide borique b 0,55 %

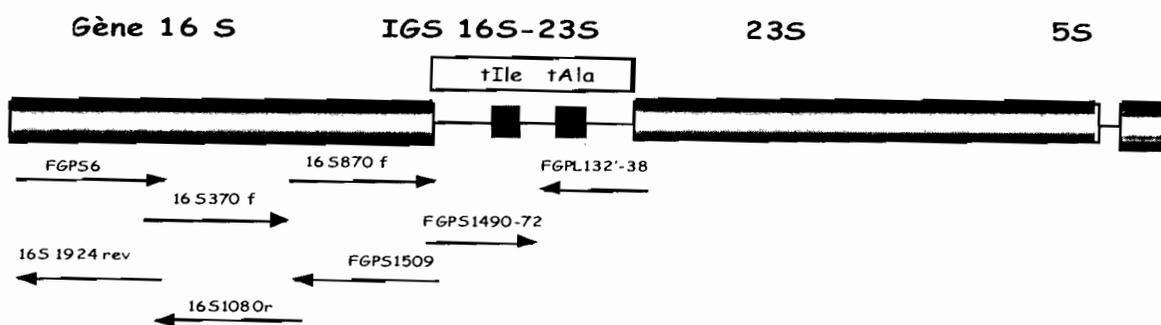


Figure 7 : position d'amorçage des *Primers* utilisés

p/v), pendant 30 min à 120 volts. Les profils PCR sont ensuite révélés par coloration au bromure d'éthidium (1 μ g/ml) pendant 30 min. Un marqueur de taille moléculaire 100 pb DNA est mis à migrer parallèlement aux produits de PCR, pour servir d'échelle. De même, un échantillon sans ADN est mis à migrer pour servir de témoins négatifs. La visualisation des profils dans le gel est effectuée sous lumière UV.

Digestion des produits d'amplification

Les produits de PCR issus de l'amplification des fragments 16S rDNA et des fragments de l'IGS 16S-23S ont été digérés en utilisant deux enzymes de restrictions (endonucléases) reconnaissant des sites de restriction spécifiques. Il s'agit de l'enzyme *HaeIII* et de l'enzyme *MspI* dont les sites de restriction sont respectivement GG/CC et C/CGG (Amersham, Phamacia Biotech).

Conditions expérimentales

Les produits d'amplification sont digérés pendant 5 heures à 37 °C, dans un tube Eppendorf de 0,5 ml. Le volume réactionnel est composé de 15µl, soit 7,5 à 10 µl de produit de PCR; 1,5µl de tampon 10X, 1µl d'enzyme et de l'eau stérile.

Au bout de 5 heures d'incubation, la totalité du produit de digestion est mélangée avec 5µl de bleu de charge et déposée sur gel horizontal

Séparation des fragments de restriction par électrophorèse

Le principe de l'électrophorèse consiste en la séparation des produits digérés suivant leur poids moléculaire, sur un support de gel d'agarose.

Les fragments de restriction ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (2,5%) Metaphor type II. La migration est réalisée dans une cuve d'électrophorèse de type Hoeffler SE 600 ou LKB 2001 (gels horizontaux) contenant un tampon TBE. La migration a lieu pendant 3 heures à une tension de 80 volts. Un marqueur de poids moléculaire "Ladder 100" (Amersham Pharmacia) est mis à migrer parallèlement pour servir d'échelle de taille moléculaire aux produits digérés.

La vitesse de migration de chaque fragment de restriction étant fonction de sa taille. Les fragments de petites tailles migrent plus rapidement que celles de grandes tailles. Il en résulte un électrophorégramme ou profil de restriction comportant plusieurs bandes dont chacune représente un segment d'ADN dont la taille est déterminée par le marqueur de poids moléculaire (PM). Ainsi l'ADN amplifié par PCR puis digéré en fragments de tailles moléculaires variables révèle un polymorphisme de longueur de fragments de restriction, distinctif de genres d'espèces ou parfois d'isolats.

Les étapes de la révélation des électrophorégrammes ainsi que leur visualisation ont lieu suivant le procédé décrit dans le paragraphe précédent. L'analyse de la diversité entre souches a été réalisée sur la base d'une comparaison visuelle des profils RFLP obtenus.

2.1.2.3. Séquençage des gènes 16S rDNA et IGS 16S-23S rDNA

Le séquençage des produits de PCR a été réalisé à l'aide d'un séquenceur automatique à électrophorèse capillaire ABI Prism 310 Genetic Analyser de Perkin Elmer. Le kit utilisé pour les réactions de séquence est le Big Dye Terminator cycle sequencing kit contenant la polymérase ampli Taq FS (Perkin

Elmer). Le mélange de la réaction de séquence comprend : 50 à 250 mg d'ADN à séquence, 1 µl d'amorce à 3,2 pmole, 4µl de solution de réaction de séquence (dNTPs, AmpliTaq DNA polymérase, FS, rTh pyrophosphatase, MgCl₂, tampon) et 2µl de tampon 5 x Tris base 400mM, MgCl₂·6H₂O 10mM, pH 9). Le volume final est rajusté à 20 µl avec de l'eau stérile. Les programmes utilisées pour la réaction de séquence sont celles présentée aux figures 5 et 6.

Les produits des réactions de séquence sont ensuite précipités dans 50 µl d'éthanol absolu et 2 µl d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2. Après 10 min. d'incubation, à température ambiante, le mélange est centrifugé pendant 30 min ; à 14 000 rpm, le culot lavé avec 250 µl d'éthanol 70 %, puis séché à l'air libre. Il est ensuite repris dans 25 µl de tampon TSR (Template Suppressing Reagent), bouilli pendant 4 min., puis refroidi rapidement dans de la glace avant d'être introduit dans le séquenceur.'

2.1.2.5. Analyse et alignement des séquences

Toutes les séquences obtenues ont été corrigées à partir des électrophorogrammes, en utilisant le logiciel **Sequence navigator** (Applied Biosystem inc.) L'assemblage des séquences (front et reverse) pour obtenir le sequence consensus a été réalisé à l'aide du logiciel **Auto assembler 2.1** (PE Applied Biosystem).

Les pourcentages d'homologie avec les séquences de référence disponibles dans Genbank ont été déterminés selon la procédure Blast (Altschul *et al.*, 1990). Les séquences ont été alignées en utilisant le logiciel Clustal X (Thomson *et al.*, 1997). L'analyse des séquences alignées et la construction des arbres phylogénétiques ont été réalisées selon la méthode du Neighbor joining (Saitou *et al.*, 1987) et visualisés à partir du logiciel Njplot (Perrière *et al.*, 1996).

2.1.2.4. Établissement d'une banque de séquences

Les séquences alignées ont été déposées dans Genbank en utilisant le logiciel Sequin. Chacune des séquences de gène soumises a reçu un numéro d'accession.

Table 4: Propriétés physicochimiques des sols étudiés.

PARAMÈTRES	VALEURS			
	ÉCHANTILLONS DE SOL			
	DAHRA	YOFF	BAMBEY	NIOKOLO
Texture				
argiles (%)	28,10	5,0	11,3	13,6
Limons (%)	15,6	5,5	21,5	23,2
Sable (%)	56,3	89,5	67,2	63,2
Cations solubles (még./100g)				
Ca ²⁺	2,16	1,95	2,56	nd
Mg ²⁺	0,47	0,42	0,82	nd
K ⁺	0,14	0,15	0,07	nd
Na ⁺	0,23	0,06	0,03	nd
Mn ²⁺	0,07	0,01	0,03	nd
Al ³	0,00	0,00	0,00	nd
H ⁺	0,01	0,00	0,00	nd
S még./100g	3,00	2,58	3,48	nd
Capacité cationique d'échange, CCE (még./100g)	2,89	3,09	4,50	nd
S/CCE taux de saturation (V%)	-	83,4	77	nd
pH				
pH Co	5,56	6,44	6,39	nd
pH H ₂ O (P/V=1/2,5)	5,65	7,70	6,40	7,30
pH KCl (P/V=1/2,5)	4,80	6,75	4,80	6,15
Matière organique (%)	0,40	0,46	0,64	0,68
Carbone (%)	0,23	0,27	0,37	0,39
N total (‰)	0,44	0,28	0,49	0,44
C/N	7,5	9,64	7,55	8,86
P total (ppm)^a	16,3	10,8	20,6	18,8

Les analyses ont été réalisées en 1997 par l'Unité des sols et Eaux, CIRAD, Montpellier, France.

^a Olsen Dabin method

2.2. CULTURE EN SERRE ET INOCULATION DES JEUNES PLANTS DE *PTEROCARPUS* AVEC RHIZOBIUM ET *GLOMUS MOSSEA*

L'expérience a été réalisée en serre pendant 7 mois, dans la station expérimentale de l'IRD (ex ORSTOM), Bel air à Dakar.

2.2.1. Préparation des sols de culture

Quatre sols de diverses provenances ont été utilisés. Ce sont des sols de Dahra, Dakar; de Yoff, de Bambey, et de Niokoloko. Ces sols sont à pH faiblement acide ou neutre dont les caractéristiques physico-chimiques sont relativement différentes (tableau 4). Les échantillons de sols n'ont pas été stérilisés. Ils ont été préalablement passés au tamis à 5 mm de diamètre puis distribués séparément dans des pots en raison de 10 kg de sol par gaine (Ø 10cm, h 20cm).

2.2.2. Origine des semences

Les semences de graines proviennent d'un même lot récolté en Mars 1999 par le PRONASEF (programme national de semence forestière, Dakar, Sénégal). La surface des graines a été aseptisée puis les graines ont été prégermées selon le procédé utilisé par Sylla *et al.* (1997). Les jeunes germinations ont été transférées dans les pots contenant du sol de culture. Immédiatement après transfert, les jeunes germinations dans les pots ont été inoculées à la fois avec des mycorhizes et des rhizobiums.

2.2.3. Les inoculums de rhizobium et de champignon mycorhizien

L'inoculum de rhizobium est constitué d'une mixture de deux cultures bactériennes des souches ORS 204 et ORS 206, en phase exponentielle de croissance (10^9 bactéries ml^{-1}) sur milieu liquide YM (Vincent, 1970). Ces souches ont été sélectionnées sur la base de leur effectivité (Sylla *et al.* 1996). Leurs caractéristiques phénotypiques et génotypiques sont aussi bien connus (Sylla *et al.* 2002). La quantité de 10ml d'inoculum de rhizobium est apportée par plant au moment des semis en gaine.

L'inoculum endomycorhizien est constitué de hyphes et de spores de la souche (IR 27) appartenant à l'espèce *Glomus aggregatum*. La souche de champignon endomycorhizien IR 27 a été isolée au Burkina faso (Bâ *et al.* 1996). Il s'agit d'une souche sélectionnée pour son effectivité chez plusieurs espèces ligneuses

tropicales (Bâ *et al.*, 2000 ; Duponnois *et al.* 2001). contenus dans des fragments de racines de *Zea mays* mélangés à du sable grossier préalablement aseptisé et servant de support d'inoculum. Le mélange sable grossier, spores et fragments d'hyphes et fragments de racines infectées a été calibré à une probabilité supérieures à 1800 propagules infectives par 20g d'inoculum (Bâ *et al.* 2001). L'inoculation a consisté en un apport de 20g du mélange grossier par gaine avant les semis.

2.2.4. Culture des plantes et inoculation

Les gaines contenant les plantes prégermées sont installées en serre expérimentale. Les quantités de 10ml d'inoculum de rhizobium et 20 g d'inoculum de champignons endomycorhiziens sont apportées à chaque gaine immédiatement après transfert des jeunes germinations. Le traitement sans inoculum de rhizobiums a reçu 10 de suspension de rhizobiums passée à l'autoclave. De même le traitement sans inoculum endomycorhizien a reçu 20 g d'inoculum du champignon préalablement passé à l'autoclave.

2.2.4.1. Condition de culture des jeunes plants

Les plants ont été élevés à la lumière naturelle, à une photopériode d'environ 12h et à une température moyenne journalière de 28°C. Pendant la durée de l'expérience, ils ont reçu un arrosage quotidien à l'eau de robinet de façon à maintenir leur état physiologique à la " capacité au champ ".

2.2.4.2. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est un dispositif factoriel, totalement randomisé. Il comporte deux facteurs le sol de culture et l'inoculation. Le facteur sol comporte 4 niveaux, le facteur inoculation comporte 4 niveaux. Les 16 traitements sont répétés chacun 8 fois.

2.2.5. Estimation du potentiel symbiotique des plants

Au bout de 7 mois de culture les jeunes plants ont été sacrifiées. Quelques variables de croissance ont été mesurées

Le potentiel symbiotique des jeunes plants est exprimé par la biomasse des nodules ainsi que le % de mycorhization au niveau des racines.

Les parties racinaires des plantes ont été lavées soigneusement à l'eau de robinet. Des échantillons de 5 nodules par plante ont été prélevés puis stockés à

4°C pour les études de compétition. Le reste des nodules du lot de chaque traitement a été dénombré puis séché (70°C pendant 3 jours) et pesé. L'infectivité des souches de rhizobium a été évaluée en mesurant la biomasse sèche des nodules dans les racines des plantes

Pour chaque plant, des racines latérales ont été prélevées à l'état frais, puis éclaircies et colorées selon la technique utilisée par Bâ et Guissou (1996). Le pourcentage de mycorhization a été déterminé suivant la méthode décrite par (Kormanik et McGraw, 1982).

2.2.6. Estimation de la croissance des jeunes plants et détermination de la composition en N et P des plantes

Les hauteurs des parties aériennes et la longueur des racines ont été mesurées. Les mesures de biomasse ont été effectuées sur les plantes préalablement séchées à l'étuve (t° 70°C) pendant 72h. Les échantillons végétaux ont été ensuite broyés séparément, puis répartis en sous-échantillons de 200 mg de poudre végétale destinés à l'analyse minérale au laboratoire d'Agronomie et des sols de la Compagnie Sucrière Sénégalaise (CSS) Richard Toll.

Les dosages d'azote total et du phosphore total accumulés dans les plantes ont été réalisés en utilisant respectivement, la méthode dite Kjeldhal (Bremner, 1965) et la méthode dite Olsen Daben (Olsen *et al.*, 1954).

Les données obtenues ont été soumises à l'analyse de variance et la comparaison des moyennes en considérant la plus petite différence significative (LSD, least significant difference) à $P < 0,05$ (Dagnelie, 1973).

2.2.7. Mise en évidence de la compétitivité des rhizobiums

2.2.7.1. Extraction d'ADN à partir de broyats de nodules

Les nodules frais prélevés des différents plantes ont été aseptisés (Vincent, 1970). Les nodules ont ensuite été soigneusement broyés dans des tubes Eppendorf (vol. 1,5ml) contenant 300 µl d'eau stérile.

Un volume de 150 µl de broyat de nodule a été rajouté à 150 µl de tampon CTAB/PVPP 2X (Tris-HCl 0,2 M, pH 8; EDTA 0,04 M pH 8; NaCl 2,8 M; CTAB 4 % p/v; PVPP 2 % w/v, Sigma^R). Le mélange a été incubé à 65° C pendant 60 mn et centrifugé pendant 10 mn à 15000 x g pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant a été extrait avec le même volume (300 µl) de

phénol – chloroforme - alcool iso-amylque (25:24:1 v/v/v) puis centrifugé pendant 15 min à 15000 x g. L'ADN de la phase aqueuse a été purifié par 300 μ l de chloroforme - alcool iso-amylque (24:1 v/v) et centrifugé pendant 15 mn à 15000 x g. Le surnageant a été centrifugé encore une fois pendant 5 min. L'ADN a été précipité à l'éthanol absolu, 2,5 volumes et l'acétate de sodium 0,1 volume à -20° C pendant une nuit. Les échantillons ont été centrifugés à 4° C pendant 30 mn à 13000 rpm. Le culot contenant de l'ADN a été lavé à l'éthanol 70 % v/v par une centrifugation pendant 15 mn à 13000 rpm à 4° C, séché sous vide et repris par 20 μ l d'eau ultrapure. La pureté et la quantité d'ADN obtenu ont été estimées par spectrophotométrie (Pharmacia Biotech) dans la zone de 200 nm à 340 nm.

2.2.7.2. Identification et détection des rhizobiums

Les extraits d'ADN obtenus des nodules récoltés à partir des différents traitements servent de matrice à l'amplification de l'IGS 16S-23S rDNA. Les procédés de PCR/RFLP sont les mêmes que ceux qui sont décrits précédemment (paragraphe 2.1.2.1). L'ADN des extraits de nodule a été identifié en comparant les profils électrophorétiques obtenus par PCR/RFLP de l'IGS 16S-23 rDNA.

La compétitivité des souches est estimée sur la base du % d'occupation des nodules tel que décrit par Amarger *et al.* (1982) et Laguerre *et al.* (1994).

2.3. ESTIMATION DE LA FBA DANS UN ÉCOSYSTEME NATUREL : MÉTHODE DU TRAÇAGE ISOTOPIQUE NATUREL

2.3.1. Principe et méthode du traçage isotopique ^{15}N naturel

Son principe de base repose sur le fait que l'azote utilisé par les plantes supérieures provient naturellement de deux sources principales. Il s'agit de l'air et du sol pour les plantes fixatrices d'azote et seulement du sol pour les non-fixatrices. La composition isotopique ($\delta^{15}\text{N}$) de la source d'azote est reflétées dans tous les tissus ou métabolites dans la plante. La composition isotopique ($\delta^{15}\text{N}$) de l'azote provenant du sol est habituellement supérieur à la composition isotopique ($\delta^{15}\text{N}$) de l'azote atmosphérique. Cette valeur du $\delta^{15}\text{N}$ de l'air est utilisée comme valeur standard pour exprimer l'abondance isotopique naturelle (‰) dans les échantillons selon l'équation ci après.

$$\delta^{15}\text{N} = [((^{15}\text{N} / ^{14}\text{N} \text{ échantillon}) : (^{15}\text{N} / ^{14}\text{N} \text{ standard})) - 1] \times 1000$$

Le ratio $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$ de l' N_2 atmosphérique montre de très faibles variations (Mariotti *et al.*, 1983; Yoneyama *et al.*, 1987). Les plantes qui dépendent de l'azote du sol; possèdent des valeurs de $\delta^{15}\text{N} > 0$. Contrairement à la composition isotopique de l' N_2 de l'air, Il peut y avoir une grande variabilité de la composition du sol. Ainsi, dans les régions tempérées et les régions froides, certaines plantes présentent des valeurs de $\delta^{15}\text{N} < 0$ (Domenach *et al.*, 1989; Virginia *et al.*, 1989). Chez les légumineuses, une grande partie de l'azote contenu dans la plante provient la fixation biologique de l'azote. Ainsi, la composition isotopique ($\delta^{15}\text{N}$) de l'azote des plantes poussant sur des sols où le $\delta^{15}\text{N}$ est positif, est dilué quand ces plantes fixent l'azote de l'air. Des résultats très probants ont été obtenus en utilisant la méthode de l'abondance isotopique naturelle pour estimer la FBA chez des arbres impliqués dans la symbiose rhizobium (Shearer et Kohl, 1986, Yoneyama *et al.*, 1990, 1993; Hamilton *et al.*, 1993; Ladha *et al.*, 1993; Peoples *et al.*, 1997; Muofhe et Dakora, 1999) et actinorhizienne (Domenach *et al.*, 1989; Kurdali *et al.*, 1990; Mariotti *et al.*, 1992).

Dans cette étude, nous avons mesuré la variation isotopique naturelle $\delta^{15}\text{N}$ entre des plantes ligneuses pérennes pour déterminer la contribution de la fixation biologique de l'azote chez *Pterocarpus lucens* dans un écosystème naturel.

2.3.2. Sites de prélèvement du matériel utilisé

La zone d'échantillonnage est située dans la réserve sylvo-pastorale du Ferlo. Elle est localisée au nord du Sénégal, dans la région sahélienne (15° - 16° N; 14° - 15° W). Dans cette zone, la pluviométrie moyenne annuelle est d'environ 400 mm et les températures varient autour de 27° (Lawesson, 1990). Dans cet écosystème naturel, Fredericksen et Lawesson (1992) ont inventorié toutes les espèces ligneuses et les mensurations ont été faites pour toutes les plantes dont la taille atteignait 1 m de hauteur et au moins 10 cm de diamètre du tronc. La description des espèces, les hauteurs de plante, leur densité et leur couverture ont été déterminés (Fredericksen et Lawesson, 1992). En même temps ces auteurs ont établi les affinités phytogéographiques entre les espèces ainsi que leurs types morphopédologiques. Notre travail a été axé sur deux sites correspondant à deux types morphopédologiques (Fredericksen et Lawesson, 1992). Le site 1 caractérisé par du sol rouge ferrugineux tropical (latéritique) et le site 2 sablo argileux (dior). Ces deux sites correspondent respectivement à la

végétation “ type 4 ” et à la végétation “ type 5 ” définies par Fredericksen et Lawesson, 1992. Dans le site 1 la végétation ligneuse est essentiellement dominée par *P. lucens* avec une relative importance d'autres espèces ligneuses que *Anogeisus leiocarpus*, *Balanites aegyptiaca*, *Combretum glutinosum*, *C. aculeatum*. Dans le site 2 la végétation ligneuse est dominée par l'espèce *P. lucens* accompagnée par quelques individus de l'espèce *Balanites aegyptiaca*.

2.3.3. Échantillonnage d'organes végétaux

Le prélèvement d'échantillons de feuilles a eu lieu en 1999. Cette période coïncide avec la fin de la saison pluvieuse et avec le début de la saison sèche dans les régions du Sahel. Pendant cette date, les plants de *Pterocarpus* ainsi que ceux de la plupart des ligneux sont à leur stade de feuillaison maximale et au début de leur fructification.

La présence de nodules a été vérifiée au préalable, au niveau des racines superficielles, à 15 cm de profondeur aux alentours des pieds de *P. lucens*. Du fait de la grande taille des arbres et de la difficulté d'échantillonner la plante entière, l'échantillonnage a été limité aux organes foliaires. Seules les jeunes feuilles ont été collectées. Les plantes de référence ont été choisies parmi les espèces n'appartenant pas aux légumineuses, faisant parties du peuplement ligneux du même site que *P. lucens*. Ces espèces sont *Anogeisus leiocarpus*, *Combretum acculeatum*, et *C. glutinosum* pour le site 1 et *Balanites aegyptiaca* pour le site 2.

Des prélèvements de feuilles ont été effectués sur dix pieds de chaque espèce ligneuse rencontrée dans chacun des deux sites. Dix échantillons de feuilles ont été collectés pour chaque espèce arbre rencontrée. Les feuilles provenant d'un même arbre sont mises en commun pour constituer un seul échantillon

2.3.4. Analyse des échantillons

Les lots de feuilles provenant de différents arbres ont été séchés séparément à l'étuve (température 60-70°C) pendant 48 heures. Les échantillons secs ont été ensuite pesés puis broyés finement. Les sous - échantillons de 200 mg de poudre végétale ont été analysés au. L'analyse des échantillons de poudre végétale a été réalisée au laboratoire des isotopes stables, Department of Agronomy an Range Science, University of California Davis C. A. Le rapport isotopique $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ainsi que l'azote total contenu dans les échantillons ont été déterminés à l'aide d'un spectromètre de masse couplé à un autoanalyseur Kjeldhal (EA-IRMS, PDZ Europe LTD, CW1 6ZA, UK). La précision des mesures est de 0,2 ‰.

Les résultats sont exprimés en N % et en $\delta^{15}\text{N}$ ‰ respectivement en ce qui concerne l'azote total et l'excès isotopique en ^{15}N dans les feuilles. Les résultats sont reportés en terme de (N%) et de $\delta^{15}\text{N}$ ‰ dans les feuilles. Le % Ndfa (% N dérivé de l'atmosphère) a été calculé selon l'équation de Shearer et Khol (1986):

$$\% \text{ Ndfa} = [\delta^{15}\text{N de la plante non- fixatrice} - \delta^{15}\text{N de la plante fixatrice}] / [\delta^{15}\text{N de la plante non fixatrice} - \beta] \times 100.$$

$$\% \delta^{15}\text{N} = 1000 (\text{atom}\%^{15}\text{N échantillon} - \text{atom}\%^{15}\text{N standard}) / \text{atom}\%^{15}\text{N standard}$$

(la valeur standard en atom %¹⁵N est de celui de l' N₂ atmosphérique.

Le % Ndfa de *P. lucens*, a été calculé en tenant compte de la valeur moyenne de $\% \delta^{15}\text{N}$ de chaque espèce ligneuse non -fixatrice présente dans le même site. Ainsi, les valeurs obtenus dans les colonnes 1, 2, 3 correspondent respectivement aux calculs du %Ndfa dans les feuilles de plants adultes de *P. lucens* poussant sur le site 1 en se servant respectivement des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ ‰ de *Combretum glutinosum*, *Anogeisus leiocarpus*, *C. aculeatum* comme références. La colonne 4 correspond au calcul de % Ndfa de *P. lucens* dans le sol ferrugineux en utilisant la moyenne des valeurs de $\% \delta^{15}\text{N}$ obtenus avec les 3 plantes de référence dans ce sol. Ce procédé permet de prendre en compte la variation du $\delta^{15}\text{N}$ dans les plantes de référence (IAEA Tec-doc, 1983). Dans le site 2 (sol sableux) le % Ndfa au niveau des feuilles de *P. lucens*, a été calculé en se servant comme référence, la valeur moyenne de $\% \delta^{15}\text{N}$ des feuilles de *Balanites aegyptiaca* qui a été la seule plante ligneuse non fixatrice associée à *P. lucens* dans le site 2.

Le facteur d'enrichissement isotopique β équivalent à 0.8 ‰ représente le $\delta^{15}\text{N}$ de la plante fixatrice (*P. lucens*) lorsque celle-ci est cultivée dans un milieu dépourvu d'azote combinée et où la seule source d'azote est l'air. Cette valeur de β a été déterminée dans une expérience préliminaire, et le calcul a été fait tel que décrit par Ledgard (1989) et Unkovitch *et al.* (1994). Les jeunes plants de *P. lucens* ont été cultivés en condition hydroponique sur milieu dépourvu d'azote (Vincent, 1970). Les plants ont été immédiatement inoculés avec une solution bactérienne (10ml pot⁻¹) de la souche ORS 206 contenant environ 10⁹ bactéries ml⁻¹. Cette bactérie est une souche de *Bradyrhizobium* effective, isolée de *P. erinaceus* au Sénégal (Sylla *et al.*, 1996).

2.3.5. Estimation de la biomasse des plantes

La biomasse foliaire des plantes (P) a été estimée à partir du diamètre des troncs à hauteur de poitrine (diameter at breast height, dbh) selon la méthode de l'équation allométrique (Lescure *et al.*, 1983), où $P = k \cdot dbh^a$.

Dans cette équation, k et a sont des constantes; k = 0,00873 et a = 2,1360 pour estimer la biomasse foliaire; k = 0,05635 et a = 2,7248 pour estimer la biomasse totale.

2.3.6. Analyse statistique

Les données sont soumises à l'analyse de variance. Les moyennes et écarts types sont calculés au niveau de probabilité $P \leq 0.05$. (Dagnelie, 1973) ;

RESULTATS

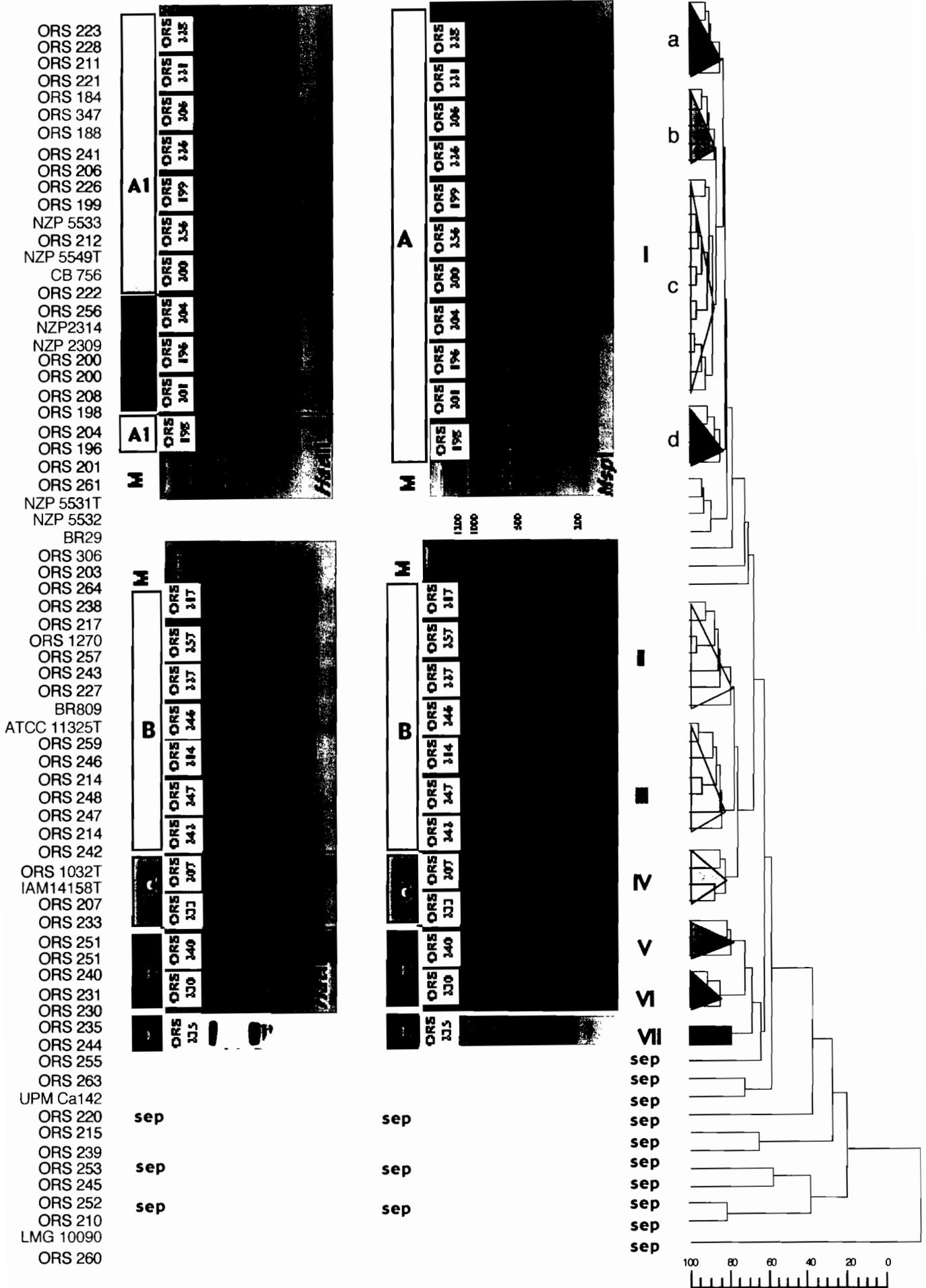


Figure 8: Dendrogramme montrant les groupes phylogénétiques obtenus par analyse des protéines totales bactériennes en comparaison avec les groupes de restriction enzymatique (PCR-RFLP) de l'ADN 16S.

3. RÉSULTATS

3.1. CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE ET GÉNOTYPIQUE DES RHIZOBIUMS ISOLÉS DE *PTEROCARPUS ERINACEUS* ET *P. LUCENS* AU SÉNÉGAL

3.1.1. Analyse des protéines totales SDS-PAGE

En plus des données déjà existantes sur l'analyse des protéines totales de souches de rhizobium de *Pterocarpus*, nous avons rajouté 18 autres profils protéiques obtenus de souches à croissance rapide et de souches à 'croissance lente' isolées de nodules de racine de *Pterocarpus erinaceus* et de *P. lucens* au Sénégal. La figure 8 représente un dendrogramme simplifié incluant 50 profils électrophorétiques de souche des rhizobiums de *Pterocarpus* ainsi que celles de souches de références qui leurs sont les plus proches. Les résultats montrent qu'à un coefficient de similarité de 81 %, les souches de rhizobium de *Pterocarpus* sont hétérogènes et forment sept groupes (I à VII). Le groupe I est constitué de dix huit (18) souches à croissance lente. Dans ce groupe I, nous distinguons quatre sous groupes (Ia, Ib, Ic, Id). Le sous groupe Ia inclut quatre souches isolées de *Pterocarpus* (ORS223, ORS228, ORS211 et ORS221), et une souche de *Bradyrhizobium* sp. (ORS 184) isolée de *Acacia albida* (Dupuy *et al.*, 1994). Le sous groupe Ib comporte trois (3) souches isolées de *Pterocarpus* (ORS241, ORS206 et ORS226) et deux souches de *Bradyrhizobium* sp. (ORS 188 et ORS 347) isolées de *A. albida* (Dupuy *et al.*, 1994). Le sous groupe Ic comporte sept (7) nouveaux isolats (ORS199, ORS212, ORS 222, ORS256, ORS200, ORS208, ORS198) et inclut la souche type de *Bradyrhizobium japonicum* (NZP 5549^T). Le sous groupe Id est exclusivement constitué de quatre souches isolées de *Pterocarpus* (ORS204, ORS196, ORS201, ORS261). Les souches ORS 203, ORS264 et ORS238) sont des rhizobiums à croissance lente séparées de toute autre souches de référence.

Un nombre total de 31 souches à croissance rapide constitue les groupes II, IV, V, VI, VII ainsi que plusieurs souches situées en position séparée sur le dendrogramme. Le groupe II comporte quatre isolats de *Pterocarpus* spp. (ORS217, ORS257, ORS243, ORS 227) et inclut la souche de *Rhizobium* sp. Br. 809 identifiée par Moreira *et al.* (1993). Le groupe III comporte exclusivement six isolats de *Pterocarpus* spp. (ORS259, ORS246, ORS214, ORS248, ORS247, ORS242) qui ne s'identifient à aucun rhizobium de référence parmi ceux dont les données sur les profils protéiques sont disponibles

au LMG de Ghent. Le groupe IV est constitué deux isolats de *Pterocarpus* spp. et inclut les souches type de *Mesorhizobium plurifarum* (ORS1032^T) et de *Mesorhizobium huakuii* (IAM14158^T). Le groupe V (ORS251, ORS240); le groupe VI (ORS231, ORS230, ORS235) et le groupe VII (ORS244, ORS255) se situent sur la même branche et comportent chacun deux à trois souches isolées de *Pterocarpus* et n'incluent aucune espèce de référence connue. Les souches ORS263, ORS220, ORS215, ORS239, ORS253, ORS245, ORS252, ORS210 et ORS260 sont en position séparée sur le dendrogramme.

3.1.2. PCR-RFLP du gène 16S rDNA

Les amorces utilisées pour l'amplification du gène 16S rDNA (FGPS 1509 et FGPS 6) ont donné pour chacune des souches étudiées (souches à croissance lente et souches à croissance rapide) un profil PCR constitué par une bande unique de poids moléculaire égale à 1500 paires de bases.

Les produits d'amplification du gène 16S rDNA de 23 souches de rhizobiums (12 souches à croissance rapide et 11 souches à croissance lente) ont été digérés. Ces souches ont été choisies parmi les divers groupes définis sur la base des études électrophorétiques. Deux enzymes de restriction ont été utilisées pour la digestion des amplifiats. Ce sont *Msp* I et *Hae* III. La figure 8 résume la diversité des souches étudiées sur la base des profils RFLP. L'analyse des profils de restriction montre que:

Au niveau des souches à croissance lente, l'analyse des produits de digestion donne le même niveau de discrimination que l'analyse des protéines totales. Les souches à croissance lente du groupe électrophorétique (I) donnent des profils de restriction similaires ne permettant pas de distinguer les 3 sous-groupes (Ia, Ib, Ic) obtenus sur la base de l'analyse des protéines totales. Dans ce grand groupe constitué de souches à croissance lente, seul le sous-groupe Id peut être distingué lorsque l'on utilise l'enzyme *Hae* III. De même les souches à croissance rapide du groupe électrophorétique IV donnent des profils de restriction indentiques. Ces souches constituent un même groupe RFLP appelé groupe C. Les souches issues des groupes électrophorétiques II et III donnent des profils de restriction identiques et correspondent au groupe RFLP dénommé B. Les souches appartenant aux groupes électrophorétiques V, VI et VII forment un seul et même groupe RFLP appelé D. Les souches qui ont occupé des positions séparées dans l'analyse des profils protéiques, restent en position séparée dans l'analyse des profils de restriction.

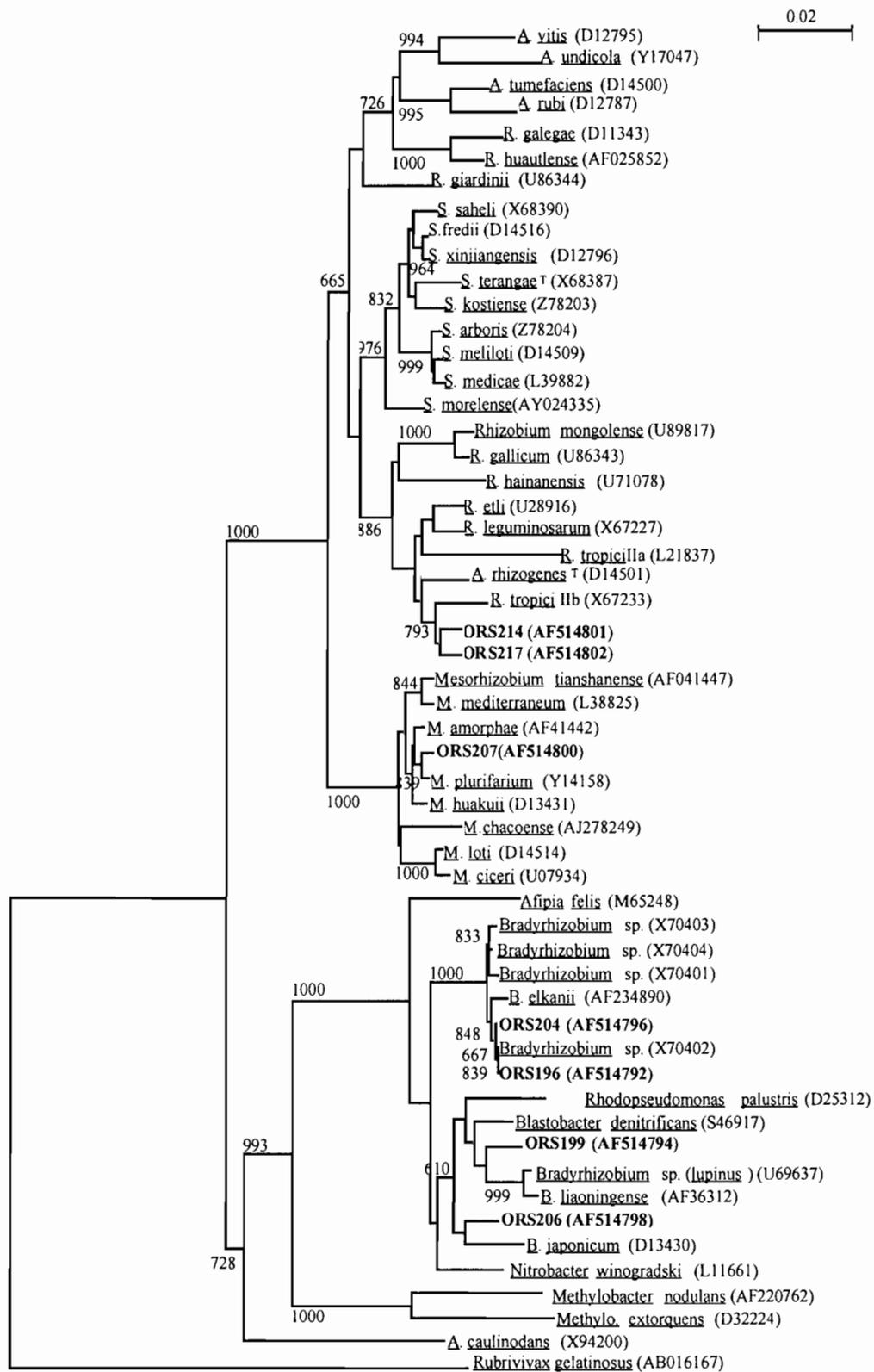


Figure 9 : Dendrogramme basé sur l'analyse des séquences du gène 16S rDNA. Les séquences alignées sont >1460 oligonucléotides. Les valeurs de bootstrap sont indiquées lorsqu'elles sont supérieures à 60%.

3.1.3. Analyse des séquences de gène 16S rDNA.

Les séquences de gène 16 S rDNA générées ont été déposées dans la banque de donnée de Genbank d'abord pour les alignements de séquences ensuite pour les mettre à la disposition de la communauté scientifique. Les séquences complètes de gène 16S rDNA des sept souches de rhizobiums ORS196, ORS199, ORS204, ORS206, ORS207, ORS214 et ORS217 sont présentées en annexe 1. Elles ont reçu respectivement les numéros d'accèsion AF514792, AF514794, AF5147916, AF5147918, AF514800, AF514801 et AF514802. La figure 9 représente l'arbre phylogénétique obtenu sur la base de l'analyse des séquences 16S rDNA. Les séquences de gène rDNA (>1460 bp) sont comparées à celles d'espèces appartenant aux *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Methylobacterium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobim* mais aussi à celles d'espèce des genres *Afipia*, *Agrobacterium*, *Blastobacter*, *Nitrobacter*, *Rhodopseudomonas*, et *Xanthobacter*. Les distances phylogénétiques obtenues par comparaison des séquences 16S rDNA des souches ORS196, ORS199, ORS204, ORS206 avec les espèces connues qui leur sont les plus proches (*Bradyrhizobium elkanii*, *B. japonicum*, *B. liaoningense*, *B. sp. (Lupinus)*, *Blastobacter denitrificans*, *Nitrobacter winogradski* *Rhodopseudomonas palustris*) sont en moyenne inférieures à 0,2%, soit 99,8% de similarité de séquence. Ce degré de similarité entre les séquences est très faible pour distinguer la position des différents taxa. Le pourcentage de séquences divergentes entre les espèces du genre *Mesorhizobium* incluant ORS 207 est d'un taux inférieur à 0,2%. La même tendance est observée au sein du groupe constitué par les espèces du genre *Rhizobium* et dans lequel on retrouve ORS 214, ORS 217 ainsi que *Agrobacterium rhizogenes*^T. L'arbre phylogénétique obtenu sur la base de l'analyse des séquences 16S rDNA (figure 9) permet de répartir les souches isolées de *Pterocarpus* dans trois groupes majeurs : *Rhizobium*; *Mesorhizobium*; et *Bradyrhizobium*. Dans ce dernier groupe, on distingue le sous groupe de *B. elkanii* et le sous groupe de *B. japonicum*. A l'exception du sous groupe *B. japonicum*, les branches regroupant les différents taxa sont soutenues par des valeurs de bootstraap assez significatives (>60%). A l'intérieur de ces groupes constitués par l'analyse des séquences 16S rDNA, les souches ORS 214 et ORS 217 sont très proches de *Rhizobium tropici* IIB; ORS 207, s'assimile à l'espèce type *Mesorhizobium plurifarum*; ORS199 occupe la même branche que *Blastobacter denitrificans*, *Bradyrhizobium liaoningense* et *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)*. Les souches à croissance lente ORS 204 et ORS 196 sont situées sur la même branche que *B. elkanii*; La souche à croissance lente ORS 206 est située très proche de *Bradyrhizobium japonicum*.

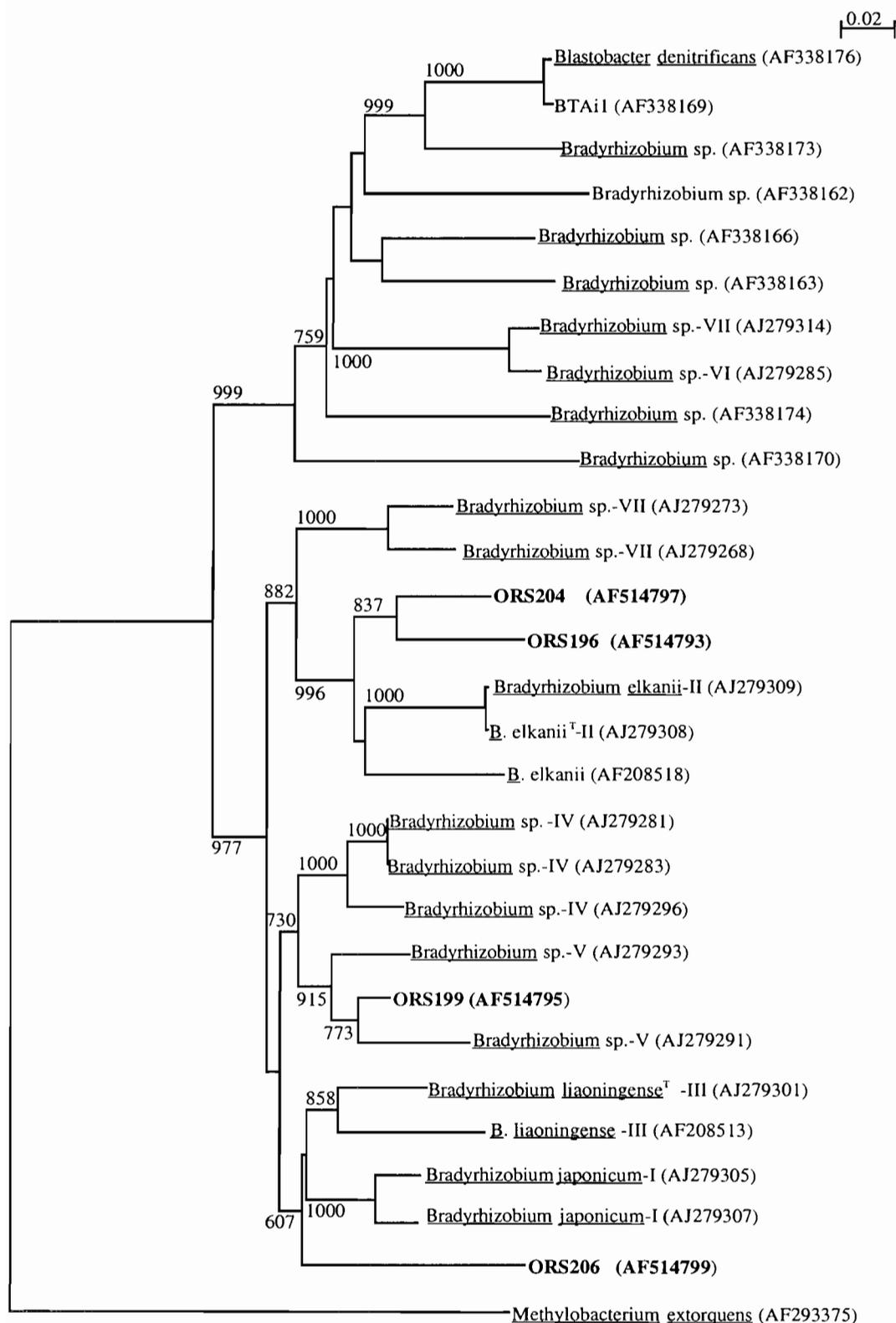


Figure 10 : Dendrogramme basé sur l'analyse des séquences de l'intergène 16S-23S rDNA. Les séquences alignées sont >700 oligonucléotides. Les valeurs de bootstrap sont indiquées lorsqu'elles sont supérieures à 60%

3.1.4. Analyse des séquences de l'intergène 16S-23S rDNA

Les séquences des gènes 16S-23S IGS rDNA des souches à croissance lente ORS 196, ORS 199, ORS 204 et ORS 206 (annexes) sont déposées dans Genbank et ont reçu respectivement les numéros d'accèsion AF514793, AF514795, AF514797 et AF514799. La longueur des séquences obtenues varie entre 890 et 1054 nucléotides. Pour préciser la diversité phylogénétique des souches de rhizobiums à croissance lente isolées de *Pterocarpus*, nous avons comparé les séquences alignées à celles des espèces de *Bradyrhizobium* disponibles dans Genbank. Le résultat de l'analyse des séquences est présenté sous forme de dendrogramme (Figure 10). Nous y avons inclus comme références, les données des espèces génomiques de *Bradyrhizobium* publiées par Van Berkum *et al.* (2000) ainsi que Willems *et al.* (2001). Les séquences de l'IGS 16S-23S rDNA de la souche de *Blastobacter denitrificans* (AF 338176) et BTAi1 (AF338169) ont été rajoutées parmi les références. Toutes les séquences de gène IGS que nous avons déterminées comprennent deux segments de gènes tRNA (tRNA^{Ile} et tRNA^{Ala}). Pour chacune des souches étudiées, les segments de gène tRNA^{Ile} et tRNA^{Ala} sont localisés au milieu de la première moitié de l'IGS 16S-23S et mesurent environ 80 nucléotides. Les séquences de tRNA^{Ile} et de tRNA^{Ala} restent invariables entre les souches de *Bradyrhizobium* que nous avons étudiées. Cette structure de l'IGS 16S-23S est identique à celles qui existent chez les bactéries à Gram-négatif (Gürtler et Stanisich, 1996).

Le dendrogramme (Figure 10) est dérivé de l'analyse des matrices de similarité des séquences par la méthode de neighbor-joining. Les résultats montrent que :

ORS 196 et ORS 204 sont proches des souches du groupe VII de Willems qui constituent l'espèce génomique *Bradyrhizobium elkanii*.

ORS 206 est équidistant de l'espèce *Bradyrhizobium liaoningense* et de l'espèce *Bradyrhizobium japonicum*.

ORS 199 se situe dans le groupe constitué par les souches de *Bradyrhizobium* du groupe genospecies V défini par Willems *et al.* (2001).

ORS 196 et ORS 204 sont situées au voisinage proche des souches de *Bradyrhizobium elkanii* parmi lesquelles celles de l'espèce génomique VII (Willems *et al.*, 2001). Les taxons de ce groupe sont très peu divergents et la similarité de leurs séquences IGS est de l'ordre de 98-99%. La branche de l'arbre phylogénétique regroupant les souches ORS 196, ORS 204, la souche

type de *Bradyrhizobium elkanii* ainsi que les espèces génomiques II et VII définies par Willems *et al.* (2001) sont supportées par des valeurs bootstrap très significatives (figure 10).

ORS 206 est située sur la même branche que les espèces *Bradyrhizobium liaoningense* et *B. japonicum*. Les séquences IGS entre la souche ORS 206 et les espèces type *Bradyrhizobium liaoningense*^T et *B. japonicum*^T sont respectivement égales à 98,9 et 98,5%. Cependant, la position relative de la souche ORS 206 par rapport aux deux espèces de *Bradyrhizobia* n'est pas supportée par les valeurs de bootstrap significatives. La souche ORS 199 est incluse dans le groupe constitué par des souches de *Bradyrhizobium* sp. genospecies V définies par Willems *et al.* (2001). Le calcul des divergences de séquence IGS révèle que la souche ORS 199 possède 99-99,5 % de similarité avec les membres de l'espèce génomique V (Willems *et al.*, 2001). La position phylogénétique de la souche ORS 199 au sein de ce groupe est supportée par des valeurs de bootstrap significativement très élevées.

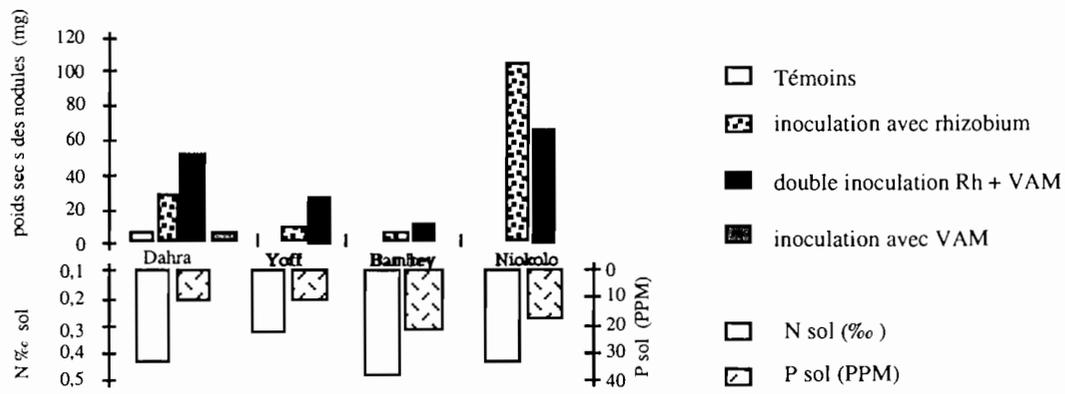


Figure 11: biomasse des nodules

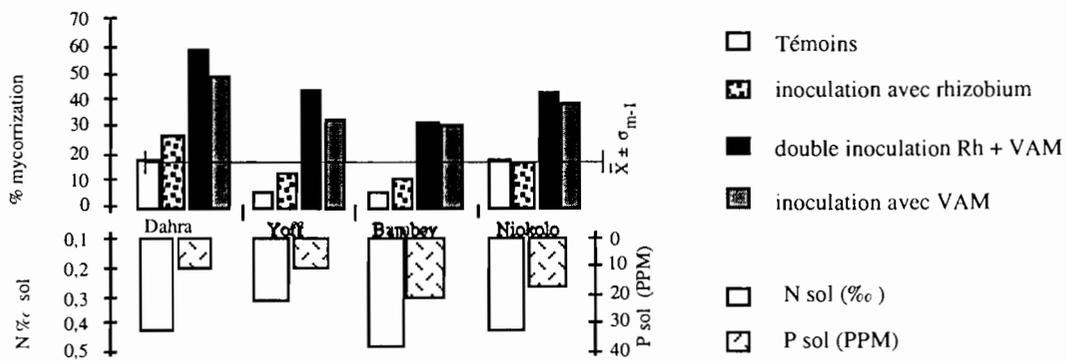


Figure 12: % mycorrhization

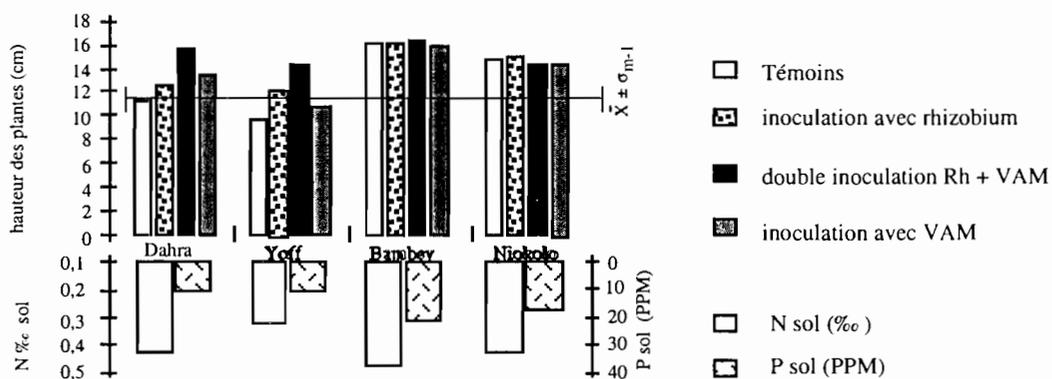


Figure 13: hauteur des plantes

3.2. OPTIMISATION DU POTENTIEL SYMBIOTIQUE ET DE LA CROISSANCE DES JEUNES PLANTS DE *P. ERINACEUS*

Les résultats de l'estimation du potentiel symbiotique ainsi que les paramètres de croissance et de la nutrition des plantes sont rapportés dans les figures 11 à 16.

3.2.1. Nodulation des plantes et biomasse des nodules

Le potentiel symbiotique des jeunes plants de *Pterocarpus erinaceus* a été exprimé en tenant compte de deux paramètres que sont la biomasse des nodules formés au niveau des racines ainsi que le pourcentage de mycorhization des racines. La Figure 11 montre qu'aucun nodule n'est observé sur les racines des plantes témoins à l'exception de celle des plantes cultivées sur sol de Dahra. Dans tous les sols utilisés, l'inoculation avec les souches de rhizobium ORS204 et ORS206 induit la formation de nodules. Cette inoculation avec les rhizobiums a un effet significatif sur la biomasse des nodules. La biomasse des nodules est significativement plus élevée lorsque les plantes sont cultivées sur sol de Dahra (30 mg) et sur sol de Niokolo koba (105 mg). Cette biomasse de nodules obtenus par l'inoculation est plus faible lorsque les plantes sont cultivées sur sol de Yoff (10 mg) et sur sol de Bambey (8 mg). Dans la totalité des sols utilisés, l'apport simultané d'inoculum de rhizobium (ORS204 + ORS206) et de champignon endomycorhizien (*Glomus aggregatum*) améliore de manière très significative la biomasse des nodules au niveau des racines des jeunes plants de *Pterocarpus*. Les biomasses des nodules induits par la double inoculation sont respectivement égales à 50mg, 28 mg, 13 mg chez les plantes cultivées sur sols de Dahra, Yoff et Bambey. Exceptionnellement, au niveau des plantes cultivées sur sol de Niokolo koba, la biomasse des nodules induits par la double inoculation (65 mg) est moins importante que la biomasse des nodules des plants ayant reçus une simple inoculation avec des rhizobiums.

3.2.2. Pourcentage de mycorhization des jeunes plantes

Les résultats (Figure 12) montrent qu'il existe dans les divers sols utilisés, des MVA spontanées capables d'infecter les racines des plantes. Les pourcentages de mycorhization due aux champignons mycorhiziens natifs sont respectivement de 20; 8,5 ; 8 et 20 % au niveau des sols de Dahra, Yoff, Bambey et Niokolo koba. L'apport d'inoculum de rhizobium peut sensiblement accroître ces valeurs pour atteindre 25, 12, 10 et 20 % respectivement sur les sols de Dahra,

Yoff, Bambey et Niokolo koba. Cependant, l'inoculation avec *Glomus aggregatum* ou mieux la combinaison rhizobium + *G. aggregatum* augmente de manière significative le pourcentage de colonisation des racines des plantes par le champignon endomycorhizien jusqu'à atteindre 60, 45, 32, 40 % dans les sols de Dahra, Yoff, Bambey et Niokolo koba. De manière générale, les pourcentages de mycorhization les plus élevés sont observés chez les plantes cultivées sur sol de Dahra.

3.2.3. Croissance des jeunes plantes

Pour estimer l'influence des traitements sur la croissance des plantes, nous avons considéré 2 paramètres : la hauteur des parties aériennes des plantes et le poids sec total des plantes.

Des différences significatives dans la hauteur des plantes entre traitements ne sont observées que sur les plantes cultivées sur sol de Dahra et sur sol de Yoff (Figure 13). Dans ces sols, les hauteurs des plantes sont de l'ordre de 11, 13, 16 et 13,5 cm respectivement pour les traitements sans inoculum (témoins), inoculation avec rhizobium, inoculation rhizobium + MVA et inoculation MVA seulement. Par contre, les plantes cultivées sur sol de Bambey ainsi que celles cultivées sur sol de Niokolo koba ne présentent pas de différences significatives dans la hauteur des plantes quelque soit le traitement. Dans ces derniers cas, la valeur moyenne de la hauteur des plantes est de 16 cm. La même tendance est observée au niveau des poids de matière sèche des plantes (figure 14). Ainsi les différences de poids de matières sèches observées entre traitements restent significatives sur les sols de Dahra et de Yoff. Sur sol de Bambey ainsi que sur sol de Niokolo koba, les différences entre traitement ne sont pas significatives. La comparaison des moyennes des paramètres de croissance (hauteur des parties aériennes et poids sec) des plantes, montre que la double inoculation (rhizobium / MVA) procure la meilleure croissance et particulièrement sur sol de Dahra.

3.2.4. Estimation de la teneur en N et P des plantes

Pour mesurer l'influence de traitement et des sols de culture sur la capacité nutritionnelle des jeunes plants de *Pterocarpus erinaceus*, nous avons tenu compte de deux paramètres. Ce sont le pourcentage d'azote total ainsi que le pourcentage de phosphore total contenu dans les plantes. Les données obtenues de ces paramètres sont résumées respectivement dans les figures 15 et 16.

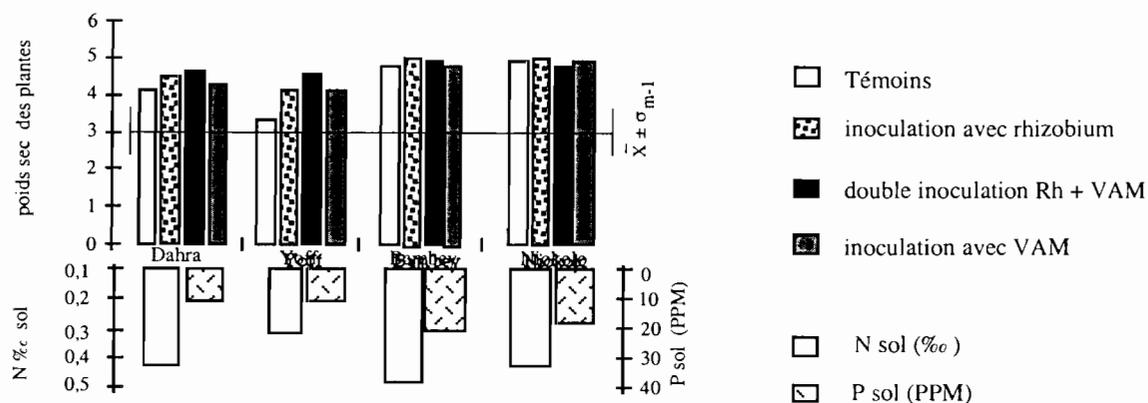


Figure 14: poids sec des plantes

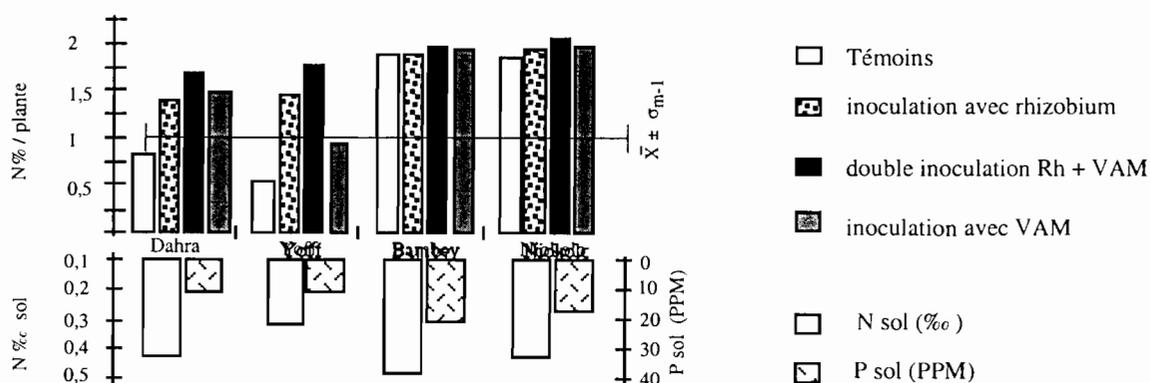


Figure 15: total N% dans les plantes

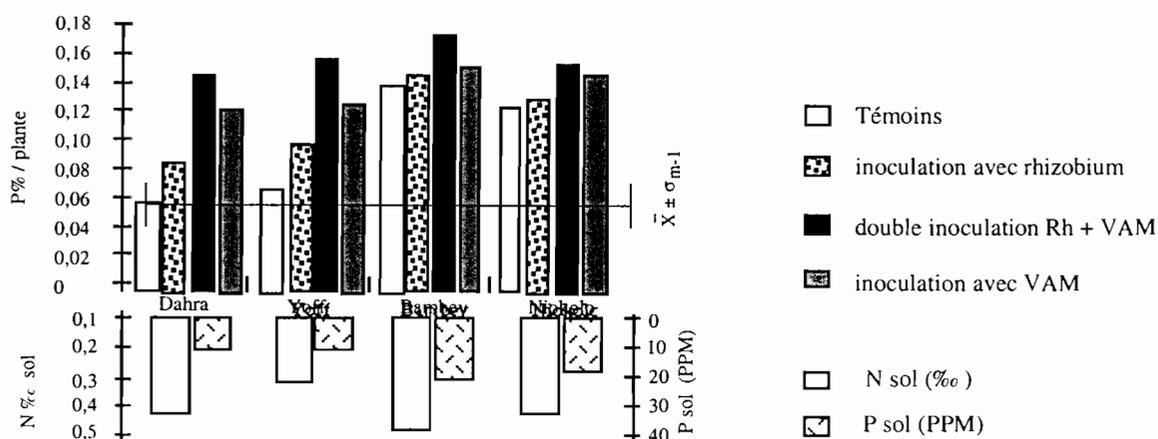


Figure 16: total P% dans les plantes

La figure 15 révèle des différences significatives du pourcentage d'azote entre les plantes issues des quatre traitements, en particulier sur sol de Dahra et sur sol de Yoff. Chez les plantes cultivées dans ces sols, les valeurs moyennes sont 0,65 ; 1,4 et 1,75 % d'azote respectivement pour les plantes témoins, les plantes ayant reçu un simple traitement inoculum bactérien, les plantes ayant reçu la double inoculation rhizobium + MVA et les plantes ayant reçu un simple traitement inoculation avec *G. aggregatum*. De manière générale, les %N les plus élevés sont enregistrés chez les plantes traitées simultanément avec l'inoculum bactérien (ORS 204 et ORS 206) et l'inoculum fongique (*G. aggregatum*). Aucune différence significative n'est observée en ce qui concerne le %N des plantes ayant subies les différents traitements lorsqu'elles sont cultivées sur sol de Bambey et sur sol de Yoff. Les mêmes effets sont observés pour la teneur en P des plantes (figure 16). Cette dernière montre que le pourcentage de phosphore accumulé l par les plantes est amélioré de manière très significative par l'apport simultané des deux endophytes (inoculum de rhizobium et inoculum fongique). Les teneurs relatives en phosphore (P) chez les plantes ayant subi les différents traitements diffèrent de manière très significative entre traitements, lorsqu'elles sont cultivées sur sol de Dahra et sur sol de Yoff. Ces teneurs en phosphore sont de 0,06 ; 0,08 ; 0,14 et 0,12 respectivement pour les plantes témoins, les plantes ayant reçu un simple traitement inoculum bactérien, les plantes ayant reçu la double inoculation rhizobium + MVA et les plantes ayant reçu un simple traitement inoculation avec *G. aggregatum*. Chez les plantes cultivées sur sol de Bambey et sur sol de Niokolo koba, aucune différence significative du % P des plantes n'est observée entre les différents traitements. Les valeurs de % P enregistrées chez les jeunes plantes de *Pterocarpus* cultivées sur ces sols sont de l'ordre de 0,16%.

3.2.5. Estimation de la compétitivité des inoculums de rhizobiums

La compétitivité des inoculums de rhizobium a été estimée sur la base des % d'occupation des nodules par les souches introduites et par les souches natives (tableau 5). La détection et l'identification des bactéries occupant les nodules été réalisée en comparant les profils de restriction des gènes 16S-23S IGS rDNA de l'ADN contenu dans les nodules à celles de l'ADN des souches pures de rhizobium (ORS204 et ORS206) ayant servies de matrice à l'inoculum utilisé. La figure 17 montre les différents profils de restriction de la portion 16S-23S rDNA de l'ADN extrait des nodules. Il s'agit de profils de souches introduites et de souches natives.

Tableau 5: Pourcentage d'occupation des nodules chez les plantes inoculées et chez les plantes témoins.

TYPE SOL	TRAITEMENT	POURCENTAGE D'OCCUPATION DES NODULES				
		ORS204	ORS206	Souches natives		
				A	B	C
Dahra	Témoins	0	0	65	30	5
	Rhizobium	0	100	0	0	0
	Rh + MVA	0	100	0	0	0
	MVA	0	0	100	0	0
Yoff	Témoins	-	-	-	-	-
	Rhizobium	27	73	0	0	0
	Rh+MVA	22	78	0	0	0
	MVA	-	-	-	-	-
Bambey	Témoins	-	-	-	-	-
	Rhizobium	24	76	0	0	0
	Rh+MVA	7	93	0	0	0
	MVA	-	-	-	-	-
Niokolo	Témoins	-	-	-	-	-
	Rhizobium	0	100	0	0	0
	Rh+MVA	0	100	0	0	0
	MVA	-	-	-	-	-

Le tableau 5 résume le % d'occupation des nodules par les souches introduites et par les bactéries natives des sols utilisés.

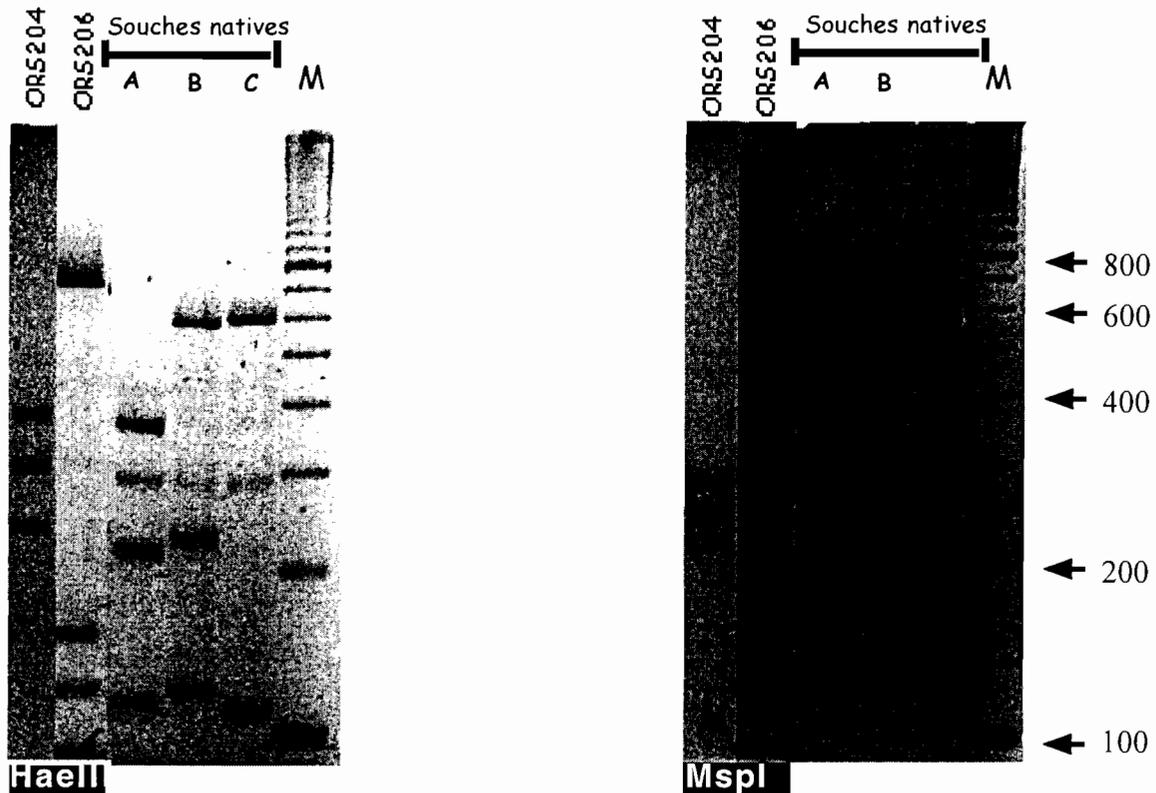


Fig 17 : Profils de restriction enzymatique des souches occupant les nodules, obtenus par PCR-RFLP de l'IGS 16S-23SrDNA.

Les résultats montrent que le traitement a une grande influence sur la bactérie occupante et le taux d'occupation des nodules. Seul le sol de Dahra présente des bactéries natives capables d'infecter les racines des jeunes plants de *Pterocarpus erinaceus*. Les nodules spontanés formés au niveau des racines des plantes témoins sont occupés par trois différents types de bactéries. Elles se distinguent par trois profils IGS (figure 17) que nous avons nommé profil A, profil B et profil C. Au niveau des plants cultivés sur sol de Dahra, le pourcentage d'occupation des nodules de chacune de ces trois types de bactéries natives A, B et C est respectivement égal à 65%, 30% et 5% (tableau 5). Chez les jeunes plants de *P. erinaceus* cultivées sur sol de Dahra et inoculées avec la solution mixte de cultures bactériennes ORS204 et ORS206, 100 % des nodules testés montrent le profil de la souche de rhizobium ORS206 (tableau 5). Des résultats similaires sont observés au niveau des nodules des plantes cultivées de Dahra et ayant reçues la double inoculation rhizobium et champignon endomycorhizien

(*G. aggregatum*). Lorsque les plantes cultivées sur sol de Dahra ont reçu simplement l'inoculum de MVA *G. aggregatum*, la souche native " type A " domine à 100% les nodules testés. Dans le sol en provenance de Yoff, il n'y a pas de nodules spontanés qui se forme sur les racines des témoins. Les nodules sont uniquement formés sur les plantes ayant reçu l'inoculum de rhizobium. Le pourcentage d'occupation de ces nodules provoqués par le simple apport d'inoculum de rhizobium est de l'ordre de 27 et 73 % respectivement pour la souche ORS 204 et ORS 206. Ce pourcentage est de 22 et 78 % respectivement pour la souche ORS 204 et ORS 206 lorsque les plantes reçoivent simultanément l'inoculum de mycorhize *G. aggregatum*

Les résultats obtenus au niveau des nodules des plantes cultivées sur sol de Bambey sont similaires à ceux trouvés chez les plantes cultivées sur sol de Yoff.

Aucune souche de rhizobium native du sol de Niokolo koba, capable d'infecter les racines des jeunes plants de *P. erinaceus* n'a été détectée. Seules les plantes ayant reçu l'inoculum de rhizobium portent des nodules racinaires. La totalité, soit 100 % de ces nodules testés sont occupés par des bactéries du profil " type ORS206 ".

Tableau 5 : % N total, $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ et % Ndfa dans les feuilles chez *P. lucens* et chez les plantes non fixatrices poussant sur sol ferrugineux et sur sol sableux du Ferlo, Sénégal.

Type de sol	Espèces	N %	$\delta^{15}\text{N}\text{‰}$	%Ndfa			
Sol ferrugineux							
				Assumption 1	Assumption 2	Assumption 3	Assumption 4
	<i>P. lucens</i>	2,18 ± 0,11	4,06 ± 0,57	35,25 ± 11,00	41,95 ± 10,20	49,43 ± 8,90	44,23 ± 9,77
	<i>C. glutinosum</i>	2,27 ± 0,36	5,83 ± 0,47	-	-	-	-
	<i>A. leiocarpus</i>	2,16 ± 0,28	6,51 ± 0,37	-	-	-	-
	<i>C. aculeatum</i>	1,98 ± 0,27	7,1 ± 0,66	-	-	-	-
	Non-fixatrices	2,32 ± 0,025	6,65 ± 1,33	-	-	-	-
Sol sableux							
	<i>P. lucens</i>	2,17 ± 0,25	5,54 ± 0,26	-	-	-	26,32 ± 5,91
	<i>B. aegytiaca</i>	2,57 ± 0,31	7,24 ± 0,37	-	-	-	-

3.3. ESTIMATION DE LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE DANS UNE POPULATION NATURELLE DE *P. LUCENS* AU SENEGAL : UTILISATION DU TRAÇAGE ISOTOPIQUE NATUREL EN ^{15}N

3.3.1. Moyennes estimées des % N, ‰ $\delta^{15}\text{N}$ et % Ndfa dans les feuilles

Le tableau 5 montre le pourcentage d'azote total (%N) ainsi que l'abondance en azote isotopique naturel (‰ $\delta^{15}\text{N}$) trouvés au niveau des feuilles de *P. lucens* et de différentes espèces ligneuses associées qui servent de références. Ces résultats ne montrent pas de différences significatives dans le %N des feuilles de *P. lucens* prélevées au niveau des deux sites. Par contre, le tableau révèle des différences significatives entre les valeurs isotopiques (‰ $\delta^{15}\text{N}$) des feuilles des différentes espèces ligneuses non-fixatrices. Dans le site 1 (sol ferrugineux) et dans le site 2 (sol sableux), l'abondance isotopique (‰ $\delta^{15}\text{N}$) des feuilles de *P. lucens* est respectivement égale à $4,06 \pm 0,57$ et $5,54 \pm 0,26$. Ces valeurs sont faibles par rapport à celles des plantes non fixatrices qui poussent dans les mêmes sites. Le $\delta^{15}\text{N}$ ‰ est en moyenne égale à 6,65‰ dans les feuilles des plantes non-fixatrices poussant sur sol ferrugineux et de 7,24‰ dans les feuilles des plantes non fixatrices poussant sur sol sableux. Ces résultats montrent que l'abondance isotopique naturelle $\delta^{15}\text{N}$ ‰ dans les feuilles de *P. lucens* (plante fixatrice) est plus faible que celles dans les feuilles des plantes de référence (non fixatrices).

Le calcul des % Ndfa a été effectué en prenant en compte chacune des espèces de référence sur les divers sites. Les résultats (tableau 6) montrent que sur le site 1 (sol ferrugineux) le % Ndfa est de l'ordre de 35 à 49% au niveau des feuilles de *P. lucens*. Sur le site 2 (sol sableux), le % Ndfa est de l'ordre de 26 %. Dans le site 1 (sol ferrugineux), le %Ndfa est calculé en tenant compte du $\delta^{15}\text{N}$ ‰ de chacune des trois espèces de référence (assomption 1, 2 et 3) ainsi que de leur moyenne (assomption 4). Dans le sol sableux, seule une espèce (*Balanites aegytiaca*) a été utilisée comme référence. L'écart type ou "standard deviation (SD)" des valeurs moyennes du %Ndfa est de l'ordre de 6 à 11% pour *P. lucens*.

Tableau 6 : Biomasse foliaire et densité des plants de *P. lucens* dans un sol ferrugineux et dans un sol sableux du Ferlo Senegal.

	Diamètre au tronc (cm)	Biomasse foliaire plant ⁻¹ (kg)**	Densité des plants ha ⁻¹	Biomasse foliaire ha ⁻¹ (t)
<u>Sol ferrugineux</u>				
<i>P. lucens</i>	16,91*	2,496	1202	3,000
<u>Sol sableux</u>				
<i>P. lucens</i>	15,04*	1,974	1158	2,286

*Données basées sur la littérature (Lawesson J.E., 1990; Fredericksen & P. Lawesson J.E, 1992)

**La biomasse foliaire a été estimée en utilisant l'équation allométrique de Lescure *et al.* (1983) et Puig *et al.* (1990)

Tableau 7 : Azote total et azote fixé / plante / hectare chez *P. lucens* dans un sol ferrugineux et dans un sol sableux du Ferlo Senegal.

Type de sol	N Total (kg)		Ndfa (kg)							
	plant ⁻¹	hectare ⁻¹	Assumption 1		Assumption 2		Assumption 3		Assumption 4	
	plant ⁻¹	hectare ⁻¹								
Sol ferrugineux	0,054±0,02	66,65±3,22	0,019±0,06	23,0±7,1	0,023±0,05	27,4±6,3	0,027±0,04	32,4±5,4	00,24±0,05	28,9±6,0
Sol sableux	0,043±0,02	49,66±2,84							00,11±0,27	10,8±2,7

3.3.2. Moyenne estimée de la biomasse foliaire des arbres

Nous avons estimé la biomasse des feuilles par plante en utilisant l'équation allométrique de Lescure *et al.* (1983) Le tableau 6 montre que la biomasse des feuilles de *P. lucens* est estimée à 3,000 t.ha⁻¹ et 2,286 t.ha⁻¹ respectivement dans le site 1 (sol ferrugineux) et dans le site 2 (sol sableux).

En même temps l'existence spontanée de nodules de racine a été vérifiée chez *P. lucens*. Ces nodules ont été trouvés au niveau des racines des plants de *P. lucens* poussant dans le site 1, par contre nous n'avons pu les trouver dans les racines des horizons superficiels chez *P. lucens* dans le site 2.

3.3.3. Moyenne estimée de l'azote total et de l'azote dérivé de la FBA

Le tableau 7 montre que l'azote total accumulé par les feuilles au niveau de chaque pied de *P. lucens* est estimée à 0,054 kg.N.plante⁻¹ dans le site 1 (sol ferrugineux) et de 0,043 kg N.plant⁻¹ dans le site 2 (sol sableux). Le rendement en azote fixé au niveau des feuilles de *P. lucens* est estimé à environ 66,65 kg N ha⁻¹ et 49,66 kg N ha⁻¹, respectivement dans le site 1 (sol ferrugineux) et dans le site 2 (sol sableux). Cependant, des différences significatives sont enregistrées dans les calculs des valeurs du Ndfa des feuilles de *P. lucens*, selon la plante ayant servit de référence. Dans le site 1 (sol ferugineux), la production d'azote dérivé de la fixation (Ndfa) varie de 23 à 32 kg.ha⁻¹. Par ailleurs dans le site 2 (sol sableux), le Ndfa est estimé à environ 10,8 kg.ha⁻¹.

DISCUSSION

4. DISCUSSION

4.1. Caractérisation phénotypique des rhizobiums

Un total de 50 souches isolées de nodules de racines de *Pterocarpus erinaceus* et de *P. lucens* ont été étudiées. Ces souches comportent des rhizobiums à 'croissance rapide' et des rhizobiums à 'croissance lente'. Une trentaine d'entre elles avait été caractérisées dans un premier temps en utilisant des techniques classiques de phénotypie (Sylla, 1996). Dans le cadre de ce travail, il s'agissait de compléter l'analyse des protéines totales bactériennes à 50 souches. Les résultats révèlent une grande hétérogénéité au sein des types d'isolats (croissance rapide et croissance lente) obtenus de nodules de racines des deux espèces de *Pterocarpus*. Les souches à croissance lente forment un grand groupe qui peut être subdivisé en quatre sous groupes. Ce grand groupe comporte exclusivement des souches qui s'identifient au genre *Bradyrhizobium*. Les souches à croissance rapide forment six groupes électrophorétiques ainsi que plusieurs souches en position séparée. A l'exception de deux de ces souches qui occupent la même branche que les espèces types de *Mesorhizobium plurifarium* et de *Mesorhizobium huakuii*, les souches à croissance rapide isolées de *Pterocarpus* forment des groupes positionnés à l'écart de toute espèce de référence connue. Ces groupes isolés pourraient constituer de nouvelles espèces. Les résultats de l'analyse des protéines totales confirment ceux obtenus sur la base des caractéristiques de croissance (Sylla *et al.*, 1997). Ils corroborent ceux obtenus sur la caractérisation des rhizobiums tropicaux isolés d'*Acacia (Faidherbia) albida* (Dupuy *et al.*, 1994) et de diverses légumineuses arbres, (de Lajudie *et al.*, 1994; Moreira *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 1999; Nick *et al.*, 1999).

4.2. Caractérisation génotypique des rhizobiums

Les résultats obtenus sur la base de l'étude phénotypique des rhizobiums de notre collection ont été approfondis par une caractérisation génotypique. Celle-ci a été abordée en utilisant plusieurs techniques d'investigation du génome. Ces techniques sont, l'analyse des profils de restriction enzymatique (PCR-RFLP) du gène 16SrDNA, l'analyse des séquences totales du gène 16rDNA et l'analyse des séquences de l'intergène 16S-23S rDNA. Les souches utilisées sont celles représentatives des différents groupes mis en évidence par l'étude phénotypique.

L'analyse par PCR-RFLP du fragment 16S de l'ADN extrait de 23 souches de rhizobiums représentatives des différents groupes protéiques a été faite. La taille des amplifiats des fragments d'ADN 16S est de manière homogène égale à 1500 pb (paire de base). Cette taille correspond à celle attendue pour le gène 16S rDNA des bactéries (Weisburg *et al.* 1991). L'analyse des profils de restriction enzymatique (RFLP) du fragment 16S de l'ADN des 23 souches de rhizobiums confirme d'une part la disparité entre les souches type "croissance lente" et les souches type "croissance rapide". D'autre part elle confirme l'hétérogénéité au sein des groupes de souches à croissance rapide. Les profils permettent de distinguer des souches appartenant aux genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*. Cependant, les profils obtenus avec les deux seules enzymes *MspI* et *HaeIII* ne permettent pas de séparer les sous-groupes Ia, Ib, Ic et Id définis au sein des *Bradyrhizobia* avec l'analyse par SDS-PAGE des protéines totales. En plus, avec la technique d'analyse des profils de restriction du gène 16SrDNA, certains sous groupes électrophorétiques de souches à croissance rapide qui se distinguent en SDS-PAGE, ont tendance à se constituer en un seul groupe. Des observations similaires ont été déjà montrées par Fulele, 1999 en comparant des résultats d'analyse des groupes protéiques (SDS-PAGE) et ceux des groupes de restriction enzymatique (PCR-RFLP 16SrDNA) pour étudier la diversité de rhizobiums isolés de légumineuses herbacées du Sénégal. Il est à noter également que la technique de PCR-RFLP, contrairement aux autres techniques, ne dispose pas d'une base de données assez fournie pour préciser une quelconque phylogénie des *Rhizobiacées*. Les résultats obtenus dans cette approche permettent juste de confirmer la diversité des souches de notre collection. C'est pourquoi, nous avons poussé nos investigations par des techniques de séquençage des gènes 16S et 16S-23S de l'ADNr.

L'analyse des séquences de gène 16S rDNA de sept des souches de rhizobium représentatives des groupes ou des sous-groupes phénotypiques a confirmé la diversité des rhizobiums révélée par la caractérisation phénotypique. De manière plus précise, elle a permis de montrer que le groupe de souches à croissance lente est constitué de souches très proches de l'espèce type *Bradyrhizobium japonicum* (cluster Ic) ainsi que d'autres qui s'identifient à l'espèce *B. elkanii* (cluster Id). Il faut noter que dans la reconstruction dérivée de l'analyse des séquences 16S rDNA, une des souches de type "croissance lente" en l'occurrence ORS 199 (cluster Ib) isolée de *Pterocarpus* se positionne entre les espèces de *Bradyrhizobium spp.* et l'espèce type *Blastobacter denitrificans*, IFAM 1005 (LMG8443). Cette observation évoque les résultats de Van Berkum et Eardly (2002) qui ont montré de grandes similitudes de

séquences 16S rDNA entre cette souche type de *B. denitrificans* IFAM 1005 (LMG8443) avec plusieurs souches de *Bradyrhizobium* spp. Van Berkum et Eardly (2002) en démontrant que *B. denitrificans* pouvait bien noduler *Aeschynomene indica* ont trouvé raison de proposer que la souche type *B. denitrificans* soit transférée dans le genre *Bradyrhizobium* ou qu'elle devienne un nouveau genre. Il serait ainsi très intéressant de mener des investigations qui pourront préciser la phylogénie des souches du genre *Bradyrhizobium*. Les souches de type croissance rapide ORS217 et ORS214, représentant respectivement les groupes électroprotéiques II et III se situent sur la même branche que les souches de l'espèce *Rhizobium tropici* IIb. Les souches à croissance rapide ORS207 et ORS233 forment le groupe IV qui inclut les souches type ORS1032^T et IAM14158^T du genre *Mesorhizobium*. L'analyse des séquences 16S rDNA de la souche ORS207 représentative de ce groupe concorde avec l'analyse phénotypique et précise la position taxonomique des deux souches ORS207 et ORS233 qui appartiendrait à l'espèce *M. plurifarum*.

Dans le cas des souches isolées de *Pterocarpus* identifiées comme étant des espèces du genre *Bradyrhizobium*, nous avons approfondi la caractérisation génomique par l'analyse des séquences de fragment de l'intergène 16S-23S rDNA. Willems *et al.* (2001) ont déjà rapporté que l'analyse des séquences 16S rDNA n'offrait pas beaucoup de latitude pour montrer la diversité interspécifique dans le genre *Bradyrhizobium*. Selon ces auteurs, l'analyse des séquences de la région intergène 16S-23S rDNA pouvait révéler beaucoup plus de variation chez les bactéries. Ces variations qui peuvent apparaître aussi bien dans la longueur des fragments que dans l'alignement des séquences conduisent généralement à de bonnes résolutions dans la discrimination interspécifique du genre *Bradyrhizobium*. L'utilisation de cette approche dans l'étude de la diversité des souches de notre collection précise que les souches ORS204 et ORS196 (groupe IIIc) appartiennent à l'espèce *B. elkanii*; ORS206 (groupe Ib) appartient à l'espèce *Bradyrhizobium japonicum*; ORS199 (groupe Ic) est en partition avec les souches de *Bradyrhizobium* du groupe V. de Willems *et al.* (2001). La divergence dans la reconstruction phylogénétique dérivée l'analyse des séquences de 16S rDNA par rapport à celles dérivées de l'analyse des séquences de l'IGS 16S-23S rDNA pour un taxon du groupe des *Proteobacteria* a déjà été reportée par Van Berkum et Eardly (2002).

4.3. Optimisation du potentiel symbiotique et de la croissance des jeunes plants

Nous avons effectué des essais d'inoculation en serre, en condition de culture sur sol non stérile. Ces sols de diverses provenances, sont caractérisés par leurs pH faiblement acide ou neutre mais aussi par leur relative déficience en N et P et leur potentialité biologique. Les résultats obtenus ont montré que certains de ces sols contenaient des rhizobiums ainsi que des champignons endomycorhiziens capables d'infecter de manière spontanée, les racines des jeunes plants de *Pterocarpus erinaceus*. Ce potentiel infectieux qui est de faible taux permet de penser que les souches de rhizobiums et de champignons endomycorhiziens indigènes sont soit en nombre insuffisant ou soit peu efficaces en symbiose avec *Pterocarpus erinaceus*. Cependant, malgré la présence de microsymbiontes dans les sols utilisés, les taux de nodulation ainsi que les taux de mycorhization les plus élevés étaient obtenus chez les jeunes plants ayant reçu les inoculum de rhizobium et de mycorhizes. Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle, la stérilisation du sol n'est pas un prérequis dans la pratique d'inoculation en pépinière ou au champ.

La comparaison de la biomasse des nodules des plantes inoculées montre que la nature du sol a un impact significatif sur l'infectivité de l'inoculum de rhizobium. Dans le cas de notre étude, le sol en provenance du Dahra se prêtait à la plus grande infectivité de l'inoculum de rhizobium. Castro *et al.* (1999), ont rapporté que le potentiel symbiotique du rhizobium pouvait être influencé par les propriétés chimiques du sol, notamment le rapport N/P ou les interactions biotiques. Le taux de mycorhization (% MVA dans les racines) variait selon le sol utilisé. Les % de mycorrhization les plus élevés ont été observés chez les plants inoculés, cultivés sur sol de Dahra et sur sol de Niokolo koba. On sait que ces deux sols contiennent naturellement les taux les plus élevés de rhizobiums natifs ainsi que des champignons MVA natifs. L'interprétation qui peut résulter de cette observation est que la présence de microorganismes endémiques des sols peut être considérée comme un "bioindicateur" à l'adaptabilité d'un inoculum. En d'autres termes, les sols très pauvres en microorganismes seraient considérés comme des sols peu adaptés aux inoculum. Il existe une corrélation négative entre les taux de mycorrhization (% MVA) des racines de jeunes plants inoculés avec la souche de *G. aggregatum* et le P ‰ dans le sol. Des auteurs (Miranda *et al.*, 1989 et Fay *et al.*, 1996) ont déjà démontré qu'une forte biodisponibilité en Phosphore du sol réduisait l'infection des racines par les vésicules mycorhiziennes. Parallèlement, nous avons montré que chez *Pterocarpus erinaceus*, il existe une synergie entre

les deux types de symbiose rhizobium et mycorhize. Dans les différents sols de culture utilisés, les % de mycorhization les plus élevés ont été enregistrés chez les plantes ayant reçu l'inoculation mixte rhizobium/champignon mycorhizien. Comme l'ont déjà relaté Subba Rao *et al.* (1986) ainsi que Singh *et al.* (1996), ces deux types de symbiose agissant en synergie pour la mobilisation de l'azote et du phosphore contribueraient à l'adaptation des plantes aux sols pauvres des régions tropicales.

La croissance en hauteur des plantes, ainsi que leur biomasse sèche sont deux paramètres qui peuvent être affectés par l'inoculation des rhizobiums et ou des champignons mycorhiziens sélectionnés. Les taux de croissance ainsi que les productions de biomasse les plus importantes ont été obtenus chez les plantes ayant subi la double inoculation rhizobium / champignon mycorhizien. Cependant, au regard des résultats, nous avons constaté que cet effet resterait fortement dépendant de la teneur en P du sol. Ceci expliquerait que l'impact de l'inoculation sur la croissance soit plus importante chez les plantes cultivées sur les sols à plus faible teneur en P (sol de Dahra et sol de Yoff). Ces résultats corroborent ceux obtenus par Huat *et al.* (2002).

4.4. Optimisation de la nutrition en N et P des jeunes plants

Un des points émergeant de l'expérience d'inoculation est que la double inoculation rhizobium/champignon mycorhizien améliore les quantités d'N et de P accumulés dans les organes des plantes. Ces observations sont comparables à celles déjà rapportées par Cornet, et Diem (1982); ainsi que par Duponnois *et al.* (2001) en étudiant les effets de l'inoculation chez des espèces d'*Acacia* en zone tropicales. Barea et Azcon-Aguilar (1983); Ganry *et al.*, (1985); Singh (1996), Duponnois *et al.*, (1994 et 2001) attribueraient l'effet synergique des deux types d'endospores sur la nutrition en N et P dans un premier temps à l'amélioration du taux de P prélevé du sol grâce à la mycorrhization ce qui dans un deuxième temps induirait la nodulation et la fixation biologique de l'azote. Michelsen et Sprent, (1994) ont établi une corrélation positive entre l'absorption en N et P des plantes et simplement l'intensité de mycorhization des racines. Duponnois *et al.* (2001) émet l'hypothèse selon laquelle, la dépendance mycorhizienne peut être positivement ou négativement corrélée à la longueur des racines respectivement dans les conditions de milieu pauvre en P et dans les conditions de milieu riche ou moyennement riche en phosphore. Dans le cas de notre expérience, le faible effet de l'inoculation avec la souche de MVA chez les plantes cultivées sur des sols à contenant les plus fortes teneurs en P soutient

bien cette hypothèse. L'effet positif de la double inoculation sur la physiologie et la croissance des plants de *P. erinaceus* est apparent dès les premiers stades de leur développement, ce qui dicterait la nécessité de l'utilisation des inoculums pour stimuler la croissance des plantes en pépinière.

4.5. Mise en évidence de la compétitivité des rhizobiums

Grâce à la technique de PCR-RFLP de l'intergène 16S-23S, nous avons déterminé les empreintes génétiques des deux souches de rhizobium (ORS204 et ORS206). Ces souches ont servi de matrice d'inoculum bactérien utilisé pour les essais en pépinière. Par comparaison aux profils RFLP de l'intergène IGS 16S-23S d'extraits d'ADN des nodules prélevés des plants issus des différents traitements, nous avons étudié la compétitivité des deux souches de rhizobium sélectionnées. En effet, la détection et l'identification du contenu des nodules montre que quelques-uns des sols que nous avons utilisés renferment des souches de rhizobium capables d'infecter les jeunes plants de *P. erinaceus*. Ces souches natives sont très diverses. Cependant, dans les conditions expérimentales de notre étude, les rhizobiums natifs de ces sols n'ont pas été compétitifs par rapport aux souches introduites. Ainsi ces souches natives ne sont nullement retrouvées dans les nodules des plantes inoculées. Des deux souches de rhizobium ayant constitué l'inoculum bactérien, la souche ORS 206 est la plus compétitive. Elle a dominé la population bactérienne ayant occupé les nodules dans l'ensemble des traitements. La souche ORS 204 n'est apparue que dans les nodules des plantes cultivées sur sol de Bambey et sur sol de Yoff. Ces deux souches appartiennent à deux diverses espèces; ORS 206 qui est apparentée à *B. japonicum* et ORS 204 qui est apparentée à *B. elkanii*, des investigations plus approfondies permettraient d'établir un typage des souches selon le milieu.

Nos études préliminaires (Sylla *et al.*, 1997) ont montré qu'à la fois *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens* étaient infectés par des souches appartenant à diverses espèces de rhizobium. Cependant, en relation avec l'étude de l'effectivité des souches de notre collection, nous trouvons que malgré la diversité des rhizobiums capables d'infecter *Pterocarpus*, les souches les plus effectives sont celles appartenant aux espèces du genre *Bradyrhizobium* en l'occurrence, les souches de *B. elkanii*, *B. japonicum*, *Bradyrhizobium* sp. Des observations similaires ont été rapportées par Moreira *et al.* (1993), parmi les souches de rhizobium isolées des arbres, arbustes et herbacées des genres *Albiza*, *Leucaena* *Melanoxylon* et *Abrus*.

4.6. Estimation de la FBA dans une population naturelle de *P. lucens*

Nous avons fait une évaluation de la quantité d'azote fixée dérivée des feuilles d'arbres adultes de *Pterocarpus lucens* dans deux sites de l'aire de répartition de l'espèce au Sénégal. Dans cette étude, nous avons choisi comme organe cible, les feuilles et ceci pour plusieurs raisons :

- ce sont des organes qui sont naturellement renouvelés en continue par l'arbre., leur échantillonnage n'est pas destructrice et peut être recommandée dans le cas de ces arbres mis en défens et en zone protégée (Réserve Sylvo-pastorale)

- Les feuilles qui tombent, évoluent vers une forme organique dégradée par la microflore ou la faune, contribuant à la consolidation du pool d'azote mobilisable du sol, perpétuant le cycle biogéochimique de l'azote dans le sol.

- Par leur accessibilité, les feuilles constituent un avantage dans les études pratiques d'évaluation des potentialités fixatrices d'azote des arbres adultes qui du fait de leur taille massive, posent des problèmes de récupération complète et d'échantillonnage de toutes les parties de la plante (Danso *et al.*, 1992).

Compte tenu de tous ces paramètres, et du fait que nous ne disposions pas de données sur la productivité de l'espèce en milieu naturel, nous avons estimé la biomasse foliaire des populations de *P. lucens* en utilisant la méthode de Lescure *et al.*, (1983) ainsi que Puig *et al.* (1990). Cette approche a été utilisée avec succès par Scatena *et al.* (1993) à Porto Rico ainsi que par Roggy *et al.* (1999) en Guyane Française pour évaluer la biomasse foliaire et la biomasse aérienne totale (i.e productivité primaire net) d'arbres des écosystèmes forestiers tropicaux. Leurs résultats ont abouti à des biomasses d'environ 3,0 t.ha⁻¹. Dans le cas de notre étude, la biomasse estimée des feuilles de *P. lucens* est dans l'ordre de 3,0 t.ha⁻¹ dans le site 1 (sol ferrugineux) et de 2,28 t.ha⁻¹, dans le site 2 (sol sableux). Dans ces deux sites, le calcul allométrique n'a pas révélé de variation significative de la biomasse foliaire entre plante, du fait de la faible variation des diamètres de tronc entre les plants de *P. lucens* (Lawesson, 1990). La variation du tonnage de feuille estimé entre les deux sites est essentiellement imputée à la variation des densités de pieds à l'hectare.

La méthode choisie pour estimer la FBA au niveau des feuilles de plantes adultes de *P. lucens* en milieu naturel a été la méthode dite d'abondance isotopique naturelle ¹⁵N. Elle est basée sur une composante isotopique naturelle,

de ce fait, elle permet de se passer d'un apport d'azote marqué (dilution isotopique) très coûteux et polluant. En plus, les données disponibles en littérature ont montré que c'est la méthode la plus avantageuse dans le cas des arbres adultes vivant en milieu naturel du fait que les variations de $\delta^{15}\text{N}$ entre les différents organes des plantes sont minimales contrairement aux légumineuses annuelles (Ladha *et al.*, 1993). Des mesures d'abondance isotopique naturelle en ^{15}N réalisées chez *Gliricidia sepium* ont montré qu'il n'existait aucune différence significative entre le $\delta^{15}\text{N}$ des rameaux et tiges et celle des feuilles. Sur la base d'étude de fixation biologique d'azote utilisant la méthode de dilution isotopique, Danso *et al.*, 1995; Gueye *et al.*, 1997 ainsi que Sylla *et al.*, 1998 ont montré que chez de nombreuses espèces d'AFN, le % Ndfa ne diffère pas de manière significative entre organes de la même plante. C'est pour ces multiples raisons que nous avons choisi l'échantillonnage des feuilles et la méthode d'abondance naturelle pour estimer l'apport d'azote fixé chez les populations de *Pterocarpus lucens* en milieu naturel.

En adoptant cette approche, nous avons tenu compte du fait que le choix de la plante de référence était le " tendon d'Achilles " de la validité et la fiabilité des résultats. Danso *et al.* (1992), pensent que les soit-disant " critère de sélection " ne permettraient pas d'identifier une seule et unique plante de référence. Sur la base de ces connaissances, le choix de plusieurs plantes de référence tel que proposé par Boddey *et al.*, (1995 et 2000) s'imposa dans le cadre de notre étude. C'est pourquoi, nous nous sommes servi de plusieurs espèces de référence sélectionnées parmi les ligneux non-fixateurs d'azote associés à *Pterocarpus lucens* au Ferlo. Ce sont *Anogeissus leiocarpus*, *Combretum aculeatum*, et *C. glutinosum* dans le site 1 (sol ferrugineux) et *Balanites aegyptiaca* dans le site 2 (sol sableux).

Nos résultats ont montré que la présence de nodules était plus fréquente au niveau des racines de *P. lucens* qui poussent sur le sol ferrugineux (100%) que sur sol sableux (0 %). Moreira *et al.* (1992, 1994) ont mentionné des différences significatives dans la fréquence de la nodulation des mêmes espèces de légumineuses poussant sur sols type oxysols et sur sols type spodsols dans les forêts du Brésil. Selon Shearer *et al.*, (1983); Högberg (1986), ces différences de la fréquence des nodules entre habitats seraient à l'origine de la variabilité des taux d'azote fixé par les mêmes espèces de légumineuses ligneuses en Sonorian et en Tanzanie. Johnson et Mayeux (1990) pensent que dans de nombreux sites où le sol renferme naturellement des rhizobiums compatibles et effectifs, les nodules sont difficilement trouvés au niveau des racines des

légumineuses du fait qu'ils sont soit très petits, soit très vite senescents et se décomposent rapidement; soit situés seulement à des horizons plus profonds (5-10 m). Dans le cas de *Pterocarpus* situés dans les sites à sol sableux du Ferlo (Sénégal), ces suggestions de Johnson et Mayeux (1990), nous dicte l'orientation vers des investigations plus approfondies.

Afin de servir au calcul du % Ndfa dans les feuilles de *P. lucens*, nous avons déterminé la valeur du facteur d'enrichissement isotopique β . Cette valeur β encore appelé facteur de fractionnement est égale à 0,8 ‰ chez *P. lucens*. Elle est en moyenne située entre les valeurs de -2,0 et + de 1,0 ‰, trouvés chez les espèces de légumineuses arborescentes (Boddey et al., 2000). Les pourcentages d'azote dérivé de la fixation (% Ndfa) obtenus montrent des différences significatives selon les plantes ayant servi de références au calcul et selon les sites. En réalité, ces différences sont liées à celles trouvées au niveau du $\delta^{15}\text{N}$ entre plantes de référence et entre les deux sites (site à sol ferrugineux et site à sol sableux). En effet, le $\delta^{15}\text{N}$ des plantes (plantes fixateurs et plantes de référence) peut différer selon le sol et selon la profondeur de sol atteinte par les racines (Ledgard et al., 1989; Virginia et al., 1989), mais aussi selon la forme d'azote disponible aux plantes (Yoneyama et al., 1990). Nos investigations ne nous ont pas permis de déterminer la profondeur des racines. Cependant, les valeurs élevées du $\delta^{15}\text{N}$ aussi bien au niveau des plantes de référence que chez *P. lucens* semblent indiquer que dans ce site, le sol est le meilleur pourvoyeur d'azote pour les plants de *P. lucens*. Ces résultats corroborent ceux obtenus lors d'expérimentations réalisées en serre (Sylla et al., 1998).

En comparant les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ enregistrées chez les différentes espèces d'arbres, on trouve que *P. lucens* (la plante fixatrice), présente la plus faible valeur de $\delta^{15}\text{N}$ (4,06 ‰, dans le sol ferrugineux et 5,54 ‰ dans le sol sableux). Par contre, les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ des plantes de référence *B. aegyptiaca* (dans le sol sableux) et *C. aculeatum* dans le sol ferrugineux présentent les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ les plus élevées avec respectivement (7,24 ‰ et 7,1 ‰). Ces différences entre la plante fixatrice et les plantes de référence signifient que *P. lucens* reste moins dépendant de l'azote du sol par rapport aux non-légumineuses du fait de ses potentialités fixatrices d'azote en symbiose avec les rhizobiums. Dans les conditions naturelles comme dans la réserve sylvopastorale du Ferlo, le taux relatif d'azote dérivé de la fixation au niveau des feuilles de *P. lucens* varie entre 35 et 49 %. Ces valeurs du % Ndfa obtenues chez les populations naturelles de *P. lucens* sont supérieures ou égales à celles trouvées au niveau de jeunes plants de *P. lucens* élevés en serre et âgés de 8 mois (Sylla

et *al.*, 1998). Plusieurs auteurs ont démontré que les valeurs estimées du %Ndfa de la plante fixatrice dépendent largement de la plante de référence choisie (Shearer et Kohl, 1983 ; Högberg, 1990). C'est pourquoi, en dehors des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ des plantes de référence prises individuellement, nous avons aussi considéré la moyenne estimée du $\delta^{15}\text{N}$ de ces valeurs pour chaque site. A ce point de vue, le %Ndfa chez *P. lucens* est égale à 44,23 % sur le site 1 (sol ferrugineux) et 26,32 % sur le site 2 (sol sableux) où *B. aegyptiaca* a été la seule espèce ligneuse présente et pouvant servir de plante de référence. Ces valeurs estimées du % Ndfa restent supérieures aux moyennes de 10 à 30 % trouvées par Schulze *et al.* (1991) chez des espèces perennes de *Mimosaceae* le long d'un gradient d'aridité du nord au sud de la Namibie. Les valeurs de % Ndfa que nous avons trouvées chez les plants de *P. lucens* poussant sur sol ferrugineux sont restées comparables à celles publiées par de nombreux auteurs sur les légumineuses arborescentes des zones tropicales. Shearer *et al.* (1983) ont enregistré des % Ndfa de l'ordre de 43-61 % chez des plants de *Prosopis* poussant en condition drastique de très faible fertilité minérale. En Tanzanie, Högberg (1986) en investissant la plupart des espèces de légumineuses ligneuses trouve le % Ndfa à 44 % parmi le pool d'azote accumulé. Lorsque le calcul est ramené à l'hectare et compte tenu de la densité des plantes entre les deux sites, les rendements en azote dérivé de la fixation au niveau des feuilles de *P. lucens* (Ndfa) sont de 29 kg ha⁻¹ et de 11 ha⁻¹ respectivement sur sol ferrugineux et sur sol sableux. Ces valeurs estimées sont inférieures à celles trouvées par Coté et Camire (1984) ; Sougoufara *et al.* (1990) avec respectivement : 53 kg N ha⁻¹ au niveau de plantations d'aulne alder au Canada ; 40-60 kg N ha⁻¹ chez *Casuarina equisetifolia* au champ. Ces rendements en Ndfa à l'hectare trouvés chez les populations de *P. lucens* du Ferlo sont supérieurs au taux de 7 kg ha⁻¹, trouvés par Roggy *et al.* (1999) chez des espèces de légumineuses ligneuses des forêts tropicales humides de la Guyanne française.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

5. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Conclusion

En conformité avec les récentes recommandations du comité ad hoc pour la réévaluation de la définition des espèces en bactériologie (Stackebrandt et al., 2002), nous avons étudié la diversité des rhizobiums isolés de *Pterocarpus erinaceus* et de *P. lucens* au Sénégal, en utilisant les techniques qui sont actuellement de mise dans la systématique bactérienne. Dans le cadre général de cette approche polyphasique de la caractérisation des rhizobiums, nous avons trouvé une bonne complémentarité entre les différentes techniques utilisées. Les résultats issus de l'application de ces techniques ont été concordants à une exception près. Ceci nous permet de conclure que les souches de rhizobium capables de s'associer à *Pterocarpus erinaceus* et de *P. lucens* sont très diverses. Elles appartiennent aux groupes des espèces de *Mesorhizobium plurifarum*, *Rhizobium tropici*, *Bradyrhizobium japonicum* et *B. elkanii*. Elles comportent également des souches qui ne s'identifient à aucune espèce de références connues. Ces souches peuvent constituer de nouveaux taxons. Nous notons également que parmi les souches de notre collection, les genres *Bradyrhizobium* et *Rhizobium* sont quantitativement les plus représentés, le genre *Mesorhizobium* est faiblement représenté, alors que les genres *Azorhizobium* et *Sinorhizobium* ne sont pas représentés. Cette prédominance des souches à croissance lente dans les sols tropicaux a déjà été relatée par Norris (1965). Il n'existe pas de corrélation entre la position phylogénétique des souches de notre collection, leur origine éco-géographique (zone soudanienne et zone sahélienne) et leur plante d'isolement (*P. erinaceus* et *P. lucens*). Certaines de ces souches de notre collection sont fortement affiliées à celles isolées d'autres légumineuses ligneuses ou herbacées de la région tropicales telles *Acacia* spp. ou *Aeschynomene* spp.

Nous avons montré que l'apport de souches de rhizobium effectives permet d'améliorer la nutrition en azote des plantes. Cet effet s'accroît avec l'introduction simultanée d'une souche de champignon endomycorhizien. Le champignon endomycorhizien agit en synergie avec les rhizobiums introduits, il en résulte une augmentation des taux de mycorhization et de nodulation au niveau des racines de *Pterocarpus erinaceus*. Le type de sol a une influence remarquable sur le comportement symbiotique des endophytes. L'utilisation du sol de Dahra donne la meilleure à l'inoculation avec rhizobium et/ou

champignon mycorhizien chez les jeunes plants de *P. erinaceus* cultivés en pépinière. Ce sol correspond au type ferrugineux tropical rouge. Ce résultat appuie les données des nombreuses études écogéographiques qui ont montré que les peuplements de *Pterocarpus erinaceus* et de *P. lucens* sont circonscrites dans les zones où affleure la cuirasse latéritique, rouge ferrugineux, (NAS, 1979; Fredericksen et Lawesson, 1992). La souche ORS 206 appartenant à l'espèce *Bradyrhizobium japonicum* se révèle être la plus compétitive sur les différents sols utilisés.

Les études prospectives sur la nodulation ainsi l'évaluation de la FBA en milieu naturel montre que les rendements en azote dérivé de la fixation au niveau des feuilles de *P. lucens* (Ndfa) sont trois fois plus importants sur sol ferrugineux et sur sol sableux. Ce rendement est estimé à environ 10 kg ha⁻¹ chez les plants poussant sur sol sableux et 29 kg ha⁻¹ chez les plants poussant sur sol ferrugineux.

Perspectives

Les positions phylogénétiques de la souche de *Bradyrhizobium* ORS199 ainsi que des souches à croissance rapide seront élucidées de manière beaucoup plus précise par l'utilisation de la technique d'hybridation ADN/ADN. Cette technique est récemment introduite dans notre laboratoire et est en train d'être testé pour la détection des souches en milieu naturel. A partir des séquences de gènes 16S-23S rDNA disponibles, des recherches sont en cours et devront permettre tout prochainement de mettre en évidence des oligonucléotides qui serviront de sondes pour la détection rapide des souches de rhizobiums sélectionnées et proposées comme inoculum.

Dans le cadre d'un programme de recherche en collaboration avec l'IRD et l'ISRA, nous avons mis en place des essais d'inoculation de jeunes plants de *Pterocarpus* au champ avec les souches de rhizobium ORS204 et ORS206. Les techniques de biologie moléculaires déjà développées dans notre étude serviront d'outil pour la détection et le suivi (traçabilité) des inoculums dans le sol. Les jeunes plants de *Pterocarpus* sont entretenus en association avec des cultures de mil et de maïs. Un des objectifs visés dans cette expérience est d'estimer les quantités d'azote fixées par *Pterocarpus* et transférées aux céréales.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

6. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alazard, D. 1985. Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. Appl. Envir. Microbiol. 50, 732-734.
- Allen, O., Allen, E.K. 1981. The *Leguminosae*, a source book of characteristics, uses, and nodulation. University of Wisconsin Press, Madison.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410.
- Amarger, N., Lobreau, J.P. 1982. Quantitative study of nodulation competitiveness in rhizobium strains. Appl. Env. Microbiol. 44, 583-588.
- Amarger, N., Macheret, V., Laguerre, J. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. And *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 996-1006.
- Ba, A.M., Dalpé, Y., Guissou, T. 1996a. Les glomales d'*Acacia holosericea* A. Cunn ex G. Don. et d'*Acacia mangium* Willd. : Diversité et abondance des champignons mycorhiziens à arbuscules dans deux types de sols de la zone Nord et Sud Soudanienne du Burkina Faso. Bois et for. trop. 250, 5-18.
- Ba, A.M., Guissou, T., 1996b. Rock Phosphate and mycorhizas effects on growth and nutrient uptake of *Faidherbia albida* (Del.) in an alkaline sandy soil. Agroforestry Systems, 34, 129-137.
- Ba, A.M., Guissou, T., Duponnois, R., Plenchette, C, Sacko, O, Sidibé, D., Kondé, S., Baba, V. 2001. Mycorhization contrôlée et fertilisation phosphatée : applications à la domestication du jujubier. Fruits 56 (4) : 261-269 (article de synthèse).
- Ba, A.M., Plenchette, C, Danthu, P., Duponnois, R., Guissou, T. 2000. Functional compatibility of two arbuscular mycorrhizae with thirteen fruit trees in Senegal. Agroforestry Systems, 50, 95-105.
- Balandreau, J., Dommergues, Y. 1971. Mesure *in situ* de l'activité nitrogénasique. C.R. Acad. Sc., Paris, 273, 2020-2023.

6. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alazard, D. 1985. Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. Appl. Envir. Microbiol. 50, 732-734.
- Allen, O., Allen, E.K. 1981. The *Leguminosae*, a source book of characteristics, uses, and nodulation. University of Wisconsin Press, Madison.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410.
- Amarger, N., Lobreau, J.P. 1982. Quantitative study of nodulation competitiveness in rhizobium strains. Appl. Env. Microbiol. 44, 583-588.
- Amarger, N., Macheret, V., Laguerre, J. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. And *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 996-1006.
- Ba, A.M., Dalpé, Y., Guissou, T. 1996a. Les glomales d'*Acacia holosericea* A. Cunn ex G. Don. et d'*Acacia mangium* Willd. : Diversité et abondance des champignons mycorhiziens à arbuscules dans deux types de sols de la zone Nord et Sud Soudanienne du Burkina Faso. Bois et for. trop. 250, 5-18.
- Ba, A.M., Guissou, T., 1996b. Rock Phosphate and mycorhizas effects on growth and nutrient uptake of *Faidherbia albida* (Del.) in an alkaline sandy soil. Agroforestry Systems, 34, 129-137.
- Ba, A.M., Guissou, T., Duponnois, R., Plenchette, C, Sacko, O, Sidibé, D., Kondé, S., Baba, V. 2001. Mycorhization contrôlée et fertilisation phosphatée : applications à la domestication du jujubier. Fruits 56 (4) : 261-269 (article de synthèse).
- Ba, A.M., Plenchette, C, Danthu, P., Duponnois, R., Guissou, T. 2000. Functional compatibility of two arbuscular mycorrhizae with thirteen fruit trees in Senegal. Agroforestry Systems, 50, 95-105.
- Balandreau, J., Dommergues, Y. 1971. Mesure *in situ* de l'activité nitrogénasique. C.R. Acad. Sc., Paris, 273, 2020-2023.

- Barea, J.M., Azcon-Aguilar, C. 1983. Mycorrhiza and their significance in nodulating nitrogen-fixing plant. In: *Advances in Agronomy*, 36 (Ed. N.C. Brady), Academic Press, New York, 1-54.
- Barnet, Y. M. and Catt, P.C. 1991. Distribution and characteristics of root-nodule bacteria isolated from Australian *Acacia* spp. *Plant and Soil*. 135, 109-120.
- Bauer, W.D., Cetano-Anollès, G. 1990. Chemotaxis induced gene expression and competitiveness in the rhizosphere. *Plant Soil*. 129, 45-52.
- Bécard, G., Douds, D.D., Pfeffer, P.E. 1992. Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 821-825.
- Becker, M.P., Ladha, J.K., Ottow, J.C.G. 1988. Stem nodulating legumes as green manure for lowland rice. *Philipp. J. Crop. Sci.* 13, 121-127.
- Boddey, R.M., Oliveira, O.C. de Alves, B.J.R., Urquiga, S. 1995. Field application of the ¹⁵N isotope dilution technique for the reliable quantification of plant associated biological nitrogen fixation. *Fert Res.* 42, 77-87.
- Boddey, R.M., Peoples, M.B., Palmer, B., Dart, P. 2000. Use of the ¹⁵N abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 57, 235-270.
- Bremner, E., Gehlen, H., Swerhone, G.D.W., Van Kessel, C. 1983. Assessment of reference crops for the quantification of N₂ fixation using natural and enriched levels of ¹⁵N abundance. *Soil Biol and Biochem.* 29, 1197-1202
- Bremner, J. M. 1965. Total nitrogen. In : *Methods of Soil Analysis* (A. Black et al., Eds). Madison, American Society of Agronomy, 1149-1178.
- Brown, S. 1997. Estimating biomass and biomass change of tropical forests: a primer *Forest Paper 134*, FAO, Rome.
- Brunck, F., Colonna, J.P., Dommergues, Y.R., Ducouso, M., Galiana, A., Prin, Y., Sougoufara, B. 1990. La maîtrise de l'inoculation des arbres avec leurs symbioses racinaires : synthèse d'une sélection d'essais au champ en zone tropicale. *Bois for. Trop.* 223, 24-42.

Castro S., Permigiani, M., Vinocur, M., Fabra, A. 1999. Nodulation in peanut (*Arachis hypogea* L.) roots in the presence of native and inoculated rhizobia strains. *Appl. Soil Ecol.* 13, 39-44.

Chen W.X., Li, G.S. Qi, Y.L., Wang, E.T., Yua, H.L., Li, J.L. 1991. *Rhizobium huakuii* sp. nov. Isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 275-280.

Chen W.X., Tan, Z.Y., Gao, J.L., Li, Y., Wang, E.T. 1997. *Rhizobium Hainanense* sp. nov. Isolated from tropical legumes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 870-873.

Chen W.X., Wang, E., Wang, S., Li, Y., Chen, X., Li, Y. 1995. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov. A moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, people's republic of china. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 153-159.

Chen, W.M., Leevens, S., Lee, T., M., Coenye, T. De Vos, P., Mergeay, M., Vandamme, P. 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov. isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1729-1735.

Chen, W.X., Yan, G.H., and Li J.L. 1988. Numerical taxonomy study of fast-growing soybean-*Rhizobium* and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. of Syst. Bacteriol.*, 38, 392-397.

Cissé, M. and Wilson, R. 1992. Status and use of *Pterocarpus lucens* Lepr. In: Couteron *et al.*, 1992. *Revue Élevage Médecine Vétérinaire Pays tropicaux.* 45, 179-190.

Cornet, F., Diem, H.G. 1982. Etude comparative de l'efficacité des souches de la double symbiose *Rhizobium-Glomus mossea* sur la croissance de *Acacia holosericea* et *A. raddiana*. *Revue bois et forêts des Tropiques.* 198, 3-15.

Cornet, F., Otto, C., Rinaudo, G., Diem, H.G., Dommergues, Y. 1985. Nitrogen fixation by *Acacia holosericea* grown in field-simulating conditions. *Acta Œcologica.* 6, 211-218.

Coté B., Camire C. 1984. Growth, nitrogen accumulation and symbiotic dinitrogen fixation in pure and mixed plantings of the hybrid poplar and black alders. *Plant and Soil.* 78, 209-220.

Couteron, P., d'Aquino, P., Ouedraogo, I.M.O. 1992. *Pterocarpus lucens* Lepr. dans la région de Banh (nord-ouest du Burkina Faso, Afrique occidentale). Importance pastorale et état actuel des peuplements. Revue Élevage Médecine Vétérinaire Pays Tropicaux. 45, 179-190.

Coutinho, H.L.C., Oliveira, V.M., Moreira, F.M.S. 2000. Systematics of legume nodule nitrogen fixing bacteria, agronomic and ecological applications. Eds. F.G. priest and M. Goodfellow. Appl. Microbiol Syst. 107-134. Dordrecht, the Netherlands : Kluwer Academic publishers.

Dagnelie, P. 1973. Theorie et méthodes statistiques : Applications agronomiques. Les Presses Agronomiques de Gembloux, Gembloux, Belgique.

Danso, S.K.A. 1985. Methods for estimating Biological Nitrogen Fixation in Africa. *Nairobi Kenya* .Eds H.S. sali and S. O. Kenya, Nairobi MIRCENS, 213-214.

Danso, S.K.A., Bowen, G.D., Sanginga, N. 1992. Biological nitrogen in trees in agroecosystems. *Plant and Soil*. 141, 177-196.

Danso, S.K.A., Zapata, F., Awonaike, KO. 1995. Measurement of biological N₂ fixation in field-grown *Robinia pseudoacacia* L. *Soil Biol and Biochem*. 27, 415-419.

De Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Moreau, F., Molouba, F., Hoste, B., Torck, U., Neyra, M., Collins, M. D., Lindstrom, K., Dreyfus, B., Gillis, M. 1998. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 48, 369-382.

De Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewetting, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., Collins, M. D., Dreyfus, B., Kersters, K., Gillis, M. 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia : Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 44, 715-733.

De Ley, J., Cattoir, H., Reynarerts, A. 1970. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem*. 12, 133-142.

Demba-Diallo, M. 1999. Optimisation d'un protocole d'extraction et de purification d'ADN de nodules de Légumineuses. Mémoire de DEA de Biologie Végétale, UCAD, Dakar.

- Diem, H.G., Gueye, I., Gianinnazzi-Pearson, V., Fortin, J.A., Dommergues, Y.R. 1981. Ecology of VA mycorrhizae in the tropics : The semi arid zone of Senegal. *Oecol. Plant.* 2, 53-62.
- Diop, T.A., Gueye, I., Dreyfus, B., Plenchette, C., Strullu, D.G. 1994. Indigenous arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Acacia albida* Del. In different areas of Senegal. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3433-3436.
- Doignon -Bourcier, F., Sy, A., Willems, A., Torck, U., Dreyfus, B., Gillis, M., De Lajudie P. 1999. Diversity of *Bradyrhizobia* from 27 tropical *Leguminosae* species native of Senegal. *Syst. Appl. Microbiol.* 44, 461-473.
- Domenach, AM, Kurdali, F., Bardin, R. 1989 Estimation of symbiotic dinitrogen fixation in alder forest by the method based on Natural ^{15}N abundance. *Plant Soil* 118, 51-59.
- Dommergues, Y. Duhoux, E., Diem, H.G. 1999. Les arbres fixateurs d'azote (Ed. Espaces 34), 499pp.
- Dreyfus, B. L., Dommergues, Y. R. 1981. Nodulation of *Acacia* species by fast- and slo- growing tropical strains of rhizobium. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 97-99.
- Dreyfus, B.L., Garcia, J.L., Gillis, M. 1988. Characterisation of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov. a stem nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, 89-98.
- Duponnois, R., Cadet, P., 1994. Interactions of *Meloidogyne javanica* and *Glomus* sp. on growth and N₂ fixation of *Acacia seyal*, Afro-asian J. Nematol. 4, 228-233.
- Duponnois, R., Plenchette, C., Ba, A.M. 2001. Growth stimulation of seventeen fallow leguminous plants inoculated with *Glomus aggregatum* in Senegal. *Eur. J. Soil Biol.* 37, 181-186.
- Dupuy, N., Dreyfus, B. 1992. *Bradyrhizobium* occur in deep soil under the leguminous tree *Acacia albida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, (8). 2415-2419.
- Dupuy, N., Willems, A., Pot, B., Devettinck, D., Vandenbruaene, I., Maestrojuan, G., Dreyfus B., Kersters, K., Collins, M. D., Gillis, M. 1994. Protein Gel Electrophoretic, Phenotypic, and Genotypic Characterization of

Bradyrhizobium nodulating the Leguminous Tree *Acacia albida*. Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 461-473.

Eardly, B.D., Materon, L.A., Smith, N.H., Johnson, D.A., Rumbaugh, M.D., Selander, R.K. 1990. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. Appl. Env. Microbiol. 56, 187-194.

Eardly, B.D., Wang, F.S., Van Berkum, P. 1996. Corresponding 16S rRNA segments in *Rhizobiaceae* and *Aeromonas* yield discordant phylogenies. Plant Soil. 186, 69-74.

Euvguenieva-Hackelberg, E., Selenska-Pobell, S. 1995. Variability of the 5' end of the large subunit rDNA and the presence of a new short class of rRNA in the family of *Rhizobiaceae*. Lett. Appl. Microbiol. 21, 402-405.

Fay, P., Mitchell, D.T., Osborne B.A. 1996. Photosynthesis and nutrient-use efficiency of barley in response to low arbuscular mycorrhizal colonization and addition of phosphorus. New Phytol. 132, 425-433.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap. Evolution. 39, 783-891.

Fred, E.B., Baldwin, I.L., McCoy, E. 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Studies in Sciences number 5, University of Wisconsin Press, Madison.

Fredericksen, P., Lawesson, J. E. 1992. Vegetation types and patterns on Senegal based on Multivariate Analysis of field and NOAA-AVHRR satellite data. J. Veget. Sci. 3, 535-544.

Fried, M. and Broeschart, H. 1975. An independent measurement of the amount of nitrogen fixed by a legume crop. Plant and soil. 43, 707-711.

Fried, M. and Middleboe, V. 1977. Measuring of amount of nitrogen fixed in Pea root nodules. Plant and soil. 47, 713-715.

Fried, M., Danso, S.K.A., and Zapata, F. 1983. The methodology of measurement of N₂ fixation by non legumes as inferred from field experiments with legumes. Can. J. Microbiol. 29, 1053-1062.

Fulele-Laurent E., Y. W. 1999. Caractérisation des rhizobia tropicaux isolés de diverses légumineuses herbacées du Sénégal. Thèse de Doctorat. Université de Liège. 187pp.

Ganry, F., Diem, H.G., Way, J., Dommergues, Y.R. 1985. Inoculation with *Glomus mosseae* improves N₂ fixation by field grown soybean. Biol. Fert. Soil. 1, 15-23.

Gaunt, M.W., Turner, S.L., Rigotier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, Young, J.P. 2001. Phylogenies of atpD and recA support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. Int. J. Syst. Bacteriol. 51, 2037-2048.

Gianinazzi-Pearson, V. 1996. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi : getting to the roots of the symbiosis. In : Dommergues, Y. Duhoux, E., Diem, H.G. 1999. Les arbres fixateurs d'azote (Ed. Espaces 34), 499pp.

Gianinazzi-Pearson, V., Diem, H.G. 1982. Endomycorrhizae in tropics. In : Dommergues, Y. Duhoux, E., Diem, H.G. 1999. Les arbres fixateurs d'azote (Ed. Espaces 34), 499pp.

Gianninazzi-Pearson, V., Smith, S.E. 1993. Physiology of mycorrhizal mycelia. Adv. Plant Pathology. 9, 55-82.

Giller, K.E., Wilson, K.J. 1991. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. CAB International, Walling Ford, Oxon, Ox. 108 DE -UK. 164-196.

Grimont, P.A.D., Popoff, M.Y., Grimont, F., Coynault, C., Lemelin, M. 1980. Reproducibility and correlation study of three deoxyribonucleic acid hybridization procedures. Current microbiology. 4, 325-330.

Gueye, M, Ndoye, I. 2000. Trenching : a necessity for assessment of N₂ fixation in field grown *Faidherbia albida* using ¹⁵N-enrichment. Ar Soil Res and Rehabil 14, 233-237.

Gueye, M., Ndoye, I., Dianda, M., Danso, S.K.A., Dreyfus, B. 1997. Active N₂ fixation in several *Faidherbia albida* provenances. Ar. Soil Res. and Rehabil. 11, 63-70.

Gürtler, V., Stanisich, V. A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. Microbiology. 142, 3-16.

- Habte, M., Soedarjo, M. 1996. Response of *Acacia mangium* to vesicular arbuscular mycorrhizal inoculation, soil pH and soil P concentration in an oxisol. *Can. J. Bot.* 74, 155-161.
- Hamilton, S.D., Hopmans, P., Chalk, P.M., Smith, C.J. 1993. Field estimation of N₂ fixation by *Acacia* spp. Using ¹⁵N isotope dilution and labelling with 35S *Forest Ecol. Manag.* 56, 297-313.
- Hansen A.P., Pate, J.S. 1987. Evaluation of the ¹⁵N natural abundance method and xylem sap analysis for assessing N₂ fixation of understorey legumes in Jarrah (*Eucalyptus marginata* Donn es Sm.) forest in S.W. Australia. *J. Exp. Bot.* 38, 1446-1458.
- Hardarson, G., Danso, S.K.A. 1993. Methods for measuring biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant soil.* 152, 19-23.
- Haukka, K., Lindström, K. Young, J.P. 1998. Three phylogenetic groups of *nodA* and *NifH* genes in *Sinorhizobium* an *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl. Env. Microbiol.* 64 (2), 419-426.
- Herridge, D. F. 1982. Relative abundance of ureides and nitrates in plant Soybean as a quantitative assay of nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 70, 1-6.
- Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K., De Vos, P. 1996. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *J. Microbiol.* 123, 215-222.
- Hiernaux, P. 1980. Inventaire du potentiel fourrager des arbres et arbustes d'une région du sahel malien. Méthodes et premiers résultats. In : Couteron et al., 1992. *Revue Élevage Médecine vétérinaire Pays tropicaux.* 45, 179-190.
- Högberg, P. 1986. Nitrogen-fixation and nutrient relations in Savanna woodland trees (Tanzania). *J. Appl. Ecol.* 23, 675-688.
- Högberg, P. 1990. ¹⁵N natural abundance as a possible marker of the ectomycorrhizal habit of trees in mixed African woodlands. *New Phytol.* 115, 483-486.
- Högberg, P., Kvarnstrom, M. 1982. Nitrogen Fixation by The woody legume, *Leucaena leucocephala* . *Plant and soil.* 66, 21-28.

Huat, O.K., Awang, K., Hashim, A., Majid, N.M. 2002. Effects of fertilizers and vesicular-arbuscular mycorrhiza on the growth and photosynthesis of *Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs seedlings. For. Ecol. Man. 158, 51-58.

IAEA, Tecdoc, - 288. 1992. A guide to use of nitrogen-15 and radioisotopes in studies of plant nutrition : calculations and interpretation of data. A technical document issued by the IAEA, Vienna.

Jahnke, D. 1994. A modified method of quantitative colorometric DNA-DNA hybridization on membrane filters for bacterial identification. J. Microbiol. Methods. 20, 273-278.

Jarvis, B.D.W., Pankhurst. C.E., Patel, J.J. 1982. *Rhizobium loti* a new species of legume root nodule bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 32, 378-380.

Jarvis, B.D.W., Van Berkum, P., Chen, W.X., Nour, S.M., Fernandez, M.P., Cleyet-Marel, J.C., Gills, M. 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakki*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 895-898.

Johnson, H.B., Mayeux, H.S. 1990. *Prosopis glandulosa* and the nitrogen balance of range lands: extent and occurrence of nodulation. Oecologia. 84, 176-185.

Jordan, D.C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan, 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov. a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. Int. J. Syst. Bacteriol. 32, 136-139.

Jordan, D.C. 1984. Family III. Rhizobiaceae Conn. 1938. In : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (1). Baltimore (N.R. Kreig and J.J. Holt, Eds). The Williams and Wilkins Co., 234-254.

Jordan, D.C., Allen, O.N. 1974. Rhizobiacea. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition, pp. 261-264. Eds R.E. Bushanan & N.E. Gibsons. Baltimore : Williams & Wilkins.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16, 111-120.

Kiredjan, M. Holmes, B., Kersters, K., Guilvout, J. and de Ley, T. 1986. *Alcaligenes piechaudii*, a new species from human clinical specimens and the environment. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 282-287.

Kormanik P.P., Mc Graw A.C. 1982. Quantification of Vesicular Arbuscular Mycorrhizae in plant roots, in : Schenck N.C. (ed.), *Methods and principles of mycorrhizal Research*, St. Paul, Minesota, the American Phytopathological Society, 1982, pp60-72.

Kundig, C., Beck, C., Hennecke, H., Göttfert. M. 1995. A single rRNA DNA region in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 177, 5151-5154.

Kurdali, F., Domenach, A.M., Bardin, R. 1990. Alder-poplar associations: determination of plant nitrogen sources by isotope techniques. *Biol Fertil Soils* 9, 309-318.

Kuykendall, L. M., Saxena, B., Devine, T. E., Udell, S. E. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 38, 501-503.

Ladha, J.K., Peoples, M.B., Garrity, D.P., Capuno, V.T., Dart, P.J. 1993. Estimating dinitrogen fixation of hedgerow vegetation using the ¹⁵N natural abundance method. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 57, 732-737.

Laguerre, G., Allard, M.R., Revoy, F., Amarger, N. 1994. Rapid identification of Rhizobia by restriction length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 56-53.

Laguerre, G., Mavingui, P., Allard, M.R., Charnay, M.P., Louvrier, P., Mazurier, S.I., Rigotier-Gois, L., Amarger, N. 1996. Typing of Rhizobia by PCR DNA Fingerprinting and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2029-2036.

Lane, D.L., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 82, 6955-6959.

Lawesson, J.E. 1990. Sahelian woody vegetation in Senegal. *Vegetatio.* 86,161-174.

- Le Tacon, F., Skinner, F.A., Mosse, B. 1983. Spore germination and hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mossae* (Gerdeman and Trappe) under decreased oxygen and increased carbon dioxide concentrations. *Can. J. Microbiol.* 29, 1280-1285.
- Ledgard, S.F. 1989. Nutrition, moisture and rhizobial strain influence isotopic fractionation during nitrogen fixation in pasture legumes. *Soil Biol Biochem* 21, 65-68.
- Lescure, J.P., Puig, H., Riera, B., Leclerc, D., Beekman, A., Beneteau, A. 1983. La phytomasse épigée d'une forêt dense de Guyane française. *Acta Oecologia Generalis.* 4, 237-251.
- Lindström, K. 1989. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 365-367.
- Lortet, G., Mear, N., Lorquin, J., Dreyfus, B., de Lajudie, P., Rosenberg, C., Boivin, C. 1996. Nod factor thin layer chromaography profiling as a tool to characterize symbiotic specificity of rhizobial strains: application to *Sinorhizobium saheli*, *S. teranga* and *Rhizobium* sp. strains isolated from *Acacia* and *Sesbania*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9, 736-747.
- Loureiro, M.F., de Faria, S.M., James, E.K., Pott, A., Franco, A.A. 1994. Nitrogen fixing stem nodules of the legume *Discolobium pulchellum* Benth. *New Phytol.* 128, 283-295.
- Manjunath, A., Habte, M. 1992. External and internal P. requirements of plant species differing in their mycorrhizal dependency. *Arid. Soil Res. Rehab.* 6, 271-284.
- Mariotti, A. 1983. Atmospheric nitrogen is a reliable standard for natural ¹⁵N abundance measurements. *Nature.* 303, 685-687.
- Mariotti, A., Sougoufara, B., Dommergues, Y.R. 1992. Estimation of nitrogen fixation using the natural abundance method in a plantation of *Casuarina equisetifolia* (Forst). *Soil Biol. Biochem.* 24, 647-653.
- Martinez-Romero, E., L. Segovia, F. M. Mercante, A. A. Franco, P. Graham, M. A. Pardo. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* spp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 417-426.

- Mc Clure, P. R., Israel, D. W. and Volk, R. J. 1980. Evaluation of the relative ureide content of xylem sap as an indicator of N₂ fixation in soybeans. *Plant Physiol.* 66, 720-725.
- Mc Inroy, S. G., Campbell, D. C., Haukka, E. K., Odee, D. W., Sprent, J. I., Wang, W-J., Young, J. P. W, Sutherland, J. M. 1999. Characterization of Rhizobia from African Acacias and other tropical woody legumes using Biolog and partial 16S rRNA sequencing. *FEMS Microbiol. Let.* 170, 111-117.
- Mc Loughlin, T., Bordeleau, L., Dunican, L. 1984. Competition studies with *Rhizobium trifolii* in a field experiment. *J. Appl. Bacteriol.* 131, 3077-3082.
- Michelsen, A., Sprent, J.A. 1994. The influence of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi on the nitrogen fixation of nursery-grown Ethiopian Acacias estimated by the ¹⁵N natural abundance method. *Plant Soil.* 160, 249-279.
- Minchin, F.R., Witty, J.F., Sheehy, J.E., Muller, M. 1983. A major error in the acetylene reduction assay : decrease in nodular nitrogenase activity under assay conditions. *J. Exp. Bot.* 34, 641-649.
- Miranda, J.C.C., Harris, P.J., Wild, A. 1989. Effects of soil and plant phosphorus concentrations on vesicular-arbuscular mycorrhiza in *Sorghum* plants. *New Phytol.* 112, 405-410.
- Mohamed, S. H., Smouni, A., Neyra, M., Kharchaf, D., Filali-Maltouf, A. 2000. Phenotypic characteristics of root-nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. grown in Libya. *Plant and Soil.* 224, 171-183.
- Molouba, F., Lorquin, J., Willems, A., Hoste, B., Giraud, E., Dreyfus, B., Gillis, M., De Lajudie, P., Masson-Boivin, C. 1999. Photosynthetic bacteria from *Aeschynomene* spp. are specific to stem nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3084-3094.
- Moreau, F.M.S., Haukka, K., Young, J. P. W. 1998. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brésil. *Mol. Ecol.* 7, 889-895.
- Moreira, F.M., Dasylva, M.F., Faria de, S.M. 1992. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brésil. *New Phytol* 121, 563-570.

- Moreira F., Franco, A. 1994. Rhizobia-host interactions in tropical ecosystems in Brésil; In Sprent JI & McKey D. (eds) *Advances in Legume systematics*, Part 5. The Nitrogen factor, pp 63-74. Royal botanic Garden, Kew, UK.
- Moreira, F., Gillis, M., Pot, B., Kersters, K. 1993. Characterization of rhizobia from different divergence groups of tropical *Leguminosae* by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *System. Appl. Microbiol.* 16, 135-146.
- Moreira, F., Haukka, K., Young, J.P.W. 1998. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brésil ; *Mol. Ecol.* 7, 889-895.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-Masson, C. 2001. Nodulation of legumes by members of β -subclass of *Proteobacteria*. *Nature.* 411, 948-950.
- Mulis, K.B., Faloona, F.A. 1987. Specific synthetis of DNA in vitro via a polymerase –catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155, 335-350.
- Muofhe, M.L., Dakora, F.D. 1999. Nitrogen nutrition in nodulated field plants of the shrub tea legume *Asparathus linearis* assessed using ¹⁵N natural abundance. *Plant Soil* 209, 181-186.
- Murphy, J., Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27, 31-35.
- Murray, R.G.E., Brenner, D.J., Colwell, R.R., De Vos,P., Goodfellow, M., Grimont, P.A.D., Pfenning, N., Stackebrandt, E., Zavargin, G.A. 1990. Report of the ad hoc commitee on approaches to taxonomy within the *Proteobacteria*. *Int. Syst. Bateriaiol.* 40, 202-213.
- National Academy Of Sciences (N.A.S.). 1979. *Tropical Legumes : Resource for the future*. Washington DC., National Academy of Sciences. 331 pp.
- Ndoye, I., Dreyfus, B. 1988. N₂ Fixation by *Sesbania rostrata* and *Sesbania sesban* estimated using ¹⁵N And N difference methods. *Soil Biol. Biochem.* 20, 209-213.
- Ndoye, I., Gueye, M., Danso, S.K.A., 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.

- Neves, M.C.P., Rumjanek, N.G. 1997. Diversity and adaptability of Soybean and Cowpea Rhizobia in tropical soils. *Soil Biol. Biochem.* 29, 889-895.
- Nick, G., De Lajudie, P., Eardly, B. D., Suomalainen, S., Paulin, L., Zhang, X., Gillis, M., Lindstrom, K. 1999. *Sinorhizobium arboris* sp. Nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. Nov. isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1359-1368.
- Normand, P., Cournoyer, B., Nazaret, S., Simonet, P. 1992. Analysis of a ribosomal RNA operon in the *Actinomycete Frankia*. *Gene.* 111, 119-124.
- Normand, P., Orso, S., Cournoyer, B., Jeannin, P., Chapelon, C., Dawson, J., Evtushendro, L. Misra, A. K. 1996. Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of the Family *Frankiaceae*. *Int. J. Syst. Bact.* 46, 1-9.
- Norris, D.O. 1965. Acid production by *Rhizobium*: a unifying concept. *Plant and Soil.* 22, 143-166.
- Nour, S.M., Cleyet-Marel, J.C., Normand, P., Fernandez, M.P. 1995. Genomic heterogeneity of strains nodulating Chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 640-648.
- Nour, S.M., Fernandez, M.P., Normand, P., Cleyet-Marel, J. C. 1994. *Rhizobium ciceri* sp. nov. , Consisting of strains that nodulate Chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 511-522.
- Odee, D.W., Sutherland, J.M., Makatiani, E.T., McInroy, S.G., Sprent, J. I. 1997. Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. *Plant Soil.* 188, 65-75.
- Oliveira, V.M., Coutinho, H.L.C., Sobral, B.W.S., Guimaraes, C.T., van Elsas, J.D., Manfio, G.P. 1999. Discrimination of *Rhizobium tropici* and *R. leguminosarum* strains by PCR – specific amplification of 16S-23S rDNA spacer region fragments and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) *Let. Appl. Microbiol.* 28, 137-141.
- Oliveira, V.M., Rosato, Y.B., Coutinho, H.L.C., Manfio, G.P. 1997. Design of a 16S rRNA –directed oligonucleotide probe for *Bradyrhizobium* tropical strain. In 11th International Congress on Nitrogen Fixation, Proceeding, p 581. Edited

by C. Elmerich, A. Kondorosi & W.E. Newton. Dordrecht, the Netherlands : kluwer Academic publishers.

Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S. Dean, L.A. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. In United States Department of Agriculture Circular n° 939.

Peoples, M. B., Turner, G.L., Shah, Z., Shah, S.H., Aslam, M., Ali, S., Markey, S.L., Afandi, F., Schwenke, G.D., Herridge, D.F. 1997. Evaluation of the ^{15}N natural abundance technique for measuring N_2 fixation in experimental plots and farmers fields . In: Rupela OP, Johansen C. and Herridge DF (eds) Proceeding of an international workshop

Perriere, G., Gouy, M. 1996. WWW-Query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie*. 78, 364-369.

Ponsonnet, C., Nesme, X. 1994. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal region. *Arch. Microbiol.* 161, 300-309.

Pot, B., Vandamme, P., Kersters, K. 1993. Analysis of electrophoretic whole organism protein fingerprints, pp. 493-521. In: Chemical methods in prokaryotic Systematics (M. Goodfellow, A. G. O'donnell eds), John Wiley and Sons, Chichester, England.

Puig, H, Riera, B., Lescure, J. 1990. Phytomasse et productivité. *Bois et forêts des Tropiques* 220, 25-32.

Rennie, R.J., Rennie, D.A, Fried, M. 1978. Concepts of ^{15}N usage in dinitrogen fixation studies. In : *Isotopes in Dinitrogen Fixation*. STI/PUB/478. Vienna, Austria, IAEA, 107-133.

Rinaudo, G. Orenge, S., Fernandez, M.P., Meugnier, H., Bardin, R. 1991. DNA homologies among members of genus *Azorhizobium* and other stem and root nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 114-120.

Roggy, J.C., Prévost, M.F., Garbaye, J., Domenach, A.M. 1999. Nitrogen cycling in the tropical rain forest of French Guiana: comparison of two sites with contrasting soil types using $\delta^{15}\text{N}$. *J. Trop. Ecol.* 15, 1-22.

- Roskoski, J.P., Montano, J., van Kessel, C., Castillejo, G. 1982. Nitrogen fixation by tropical woody legumes : Potential source of soil enrichment. In: BNF Technology for Tropical Agriculture. Cali, Eds P. H. Graham and S.C. Harris. CIAT, 447-454.
- Rouvier, C, Prin, Y, Reddell, P., Normand, P., Simon, 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 979-985.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. 1988. Primer -directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239, 487-491.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Sanginga, N. 1990. Influence of reference trees on N₂ fixation estimates in *Leucaena leucocephala* and *Acacia albida* using ¹⁵N labelling techniques. *Biol and Fertil of Soils.* 9, 341-346.
- Sanginga, N., Mulongoy, K., Ayanaba, A. 1989. Nitrogen fixation of field -inoculated *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit estimated by the ¹⁵N and the difference method. *Plant and soil.* 117, 269-274.
- Scatena, F.N., Silver W., Siccama, T., Johnson, A., Sanchez, M.J. 1993. Biomass and nutrient content of the Bisley experimental Watersheds, Luquillo experimental forest, Puerto Rico, before and after Hurricane Hugo, 1989. *Biotropica.* 25, 15-27
- Schaede, R. 1940. Die knölchen der adventiven wasserwurzeln von *Neptunia olosericea* und ihre Bacterien symbiose. *Planta.* 31, 1-21.
- Schulze, E.D., Gebauer, G., Ziegler, H., Lange, O.L. 1991. Estimates of nitrogen fixation by trees on an aridity gradient in Namibia. *Oecologia* 88, 451-455.
- Segovia, L., Young, J.P., Martinez-Romero, E. 1993. Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 374-377.

Shearer, G., Kohl, D.H. 1986. N₂ fixation in field setting: estimation based on natural ¹⁵N abundance. Aust J Plant Physiol 13, 699-756.

Shearer, G., Kohl, D.H., Virginia, R.A., Bryan, B.A., Skeeters, J.L., Nilsen, E.T., Sharifi, M.R., Rundel, P.W. 1983. Estimates of N₂ fixation from variation in the natural abundance of ¹⁵N in Sonorian desert ecosystem. Ecologia (Berlin). 56, 365-373.

Singh, C.S. 1996. Arbuscular mycorrhiza (AM) in association with *Rhizobium* sp. improves nodulation, N₂ fixation, and N utilization of pigeon pea (*Cajanus cajan*), as assessed with a ¹⁵N technique, in pots. Microbiol. Res. 151, 87-92.

Siquiera, J.O., Franco, A.A. 1988. Biotechnologia do solo : Fundamentos e perspectivas. Pp. 236. Lavras. FAEPEABEAS/MEC/ESAL.

Smith, G.B., Wollum II, A.G. 1991. Bacterial culture history affects the attachment of *Bradyrhizbium japonicum* to host *Glycine max* roots. Can. J microbiol. 37, 730-736.

Smith, S.E., Read, D.J. 1996. Mycorrhizal symbiosis. 2nd edition. London : Academic Press.

Sougoufara, B., Danso, S.K.A., Diem, H.G., Dommergues, Y.R. 1990. Estimating N₂ fixation and N derived fom soil by *Casuarina equisetifolia* using labelled ¹⁵N fertilizer : some problems and solutions. Soil Biol and Biochem. 12, 695-701.

Stackebrandt, E., Fredericksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A. D., Kämpfer, P., Maiden, M. C. J., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Trüper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C., Whitman, W. B. 2002. Report of the ad hoc comity for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Evolutionary Microbiol. 52, 1043-1047.

Stackebrandt, E., Goebel, B.M. 1994. Taxonomic note : a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 846-849.

Stackebrandt, E., Liesack, W. 1993. Nucleic acids and classification. In : Handbook of new bacterial systematics. Goodfellow, M. et O'Donnell, A.G. (Eds). Academic Press Ltd, London. pp 151-194.

- Subba Rao, N.S., Tilak, K.V.B.R., Singh, C.S. 1986. Dual inoculation with *Rhizobium* sp. and *Glomus fasciculatum* enhances nodulation yield and nitrogen fixation in chick pea (*Cicer arietinum* Linn.). *Plant and Soil* 95, 351-359.
- Sutherland, J.M., Odee, D.W., Muluvi, G.M., McInroy, S.G., Patel, A. 2000. Single and multi-strain rhizobial inoculation of African Acacias in nursery conditions. *Soil Biol and Biochem* 32:323-333
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., De Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., Dreyfus, B. 2001. *Methylobacterium* Bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* 183, 214-220.
- Sylla, S.N. 1996. Contribution à l'étude de la symbiose fixatrice d'azote chez *Pterocarpus erinaceus* Poir. (ven) et *P. lucens* au Sénégal; Thèse de Doctorat de troisième cycle. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Sénégal pp.94
- Sylla, S.N., Ndoye, I, Ba, A.T., Dreyfus, B. 1997. Spécificité de la symbiose chez *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens*. *Bull Inst. Fond. Afr. Noire.* 49,17-36.
- Sylla, S.N., Ndoye, I., Ba, A.T., Gueye, M., Dreyfus, B. 1998. Assessment of Nitrogen fixation in *Pterocarpus erinaceus* and *P. lucens* using the ¹⁵N labelling methods. *Ar Soil Res and Rehabil* 12, 257-253
- Sylla, S.N., Samba, R.T., Neyra, M., Ndoye, I., Giraud, E., Willems, A., de Lajudie, P., Dreyfus, B. 2002. Phenotypic and genotypic diversity of rhizobia nodulating *Pterocarpus erinaceus* and *P. lucens* in Senegal. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 572-583.
- Tan, Z.Y., Kan, F.L., Peng, G.X., Wang, E.T., Reinhold-Hurek, B., Chen, W.X. 2001. *Rhizobium yangligense* sp. nov., isolated from rid and semi arid regions in china. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 51, 909-914.
- Thomson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. 1997. The clustal X windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids res.* 25, 4876-4882.
- Trinick, M.J. 1980. Relationships among fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobia groups. *J. Appl. Bacteriol.* 49, 39-53.

- Triplet, E.W. 1990. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 3, 199-206.
- Unkovitch, M.J., Pate, J.S., Sanford, P., Armstrong, E.L. 1994. Potential precision of the ¹⁵N natural abundance method in field estimates of nitrogen fixation by crop and pasture legumes. In south-west Australia. *Aust J Agric Res* 45, 119-132.
- Van Berkum, P., Beyene, D., Bao, G., Campbell, T.A., Eardly, B.D. 1998. *Rhizobium mongolense* sp. nov. Is one of the three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* (L.). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 13-22.
- Van Berkum, P., Eardly, B.D. 2002. The aquatic Budding *Bacterium Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeshchynomene indica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1132-1136.
- Van Berkum, P., Fuhrmann, J. F. 2000. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 50, 2165-2172.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Reviews.* 60, 407-438.
- Vauterin, L., Vauterin P. 1992. Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *Eur. Microbiol.* 1, 37-41.
- 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., Martinez-Molina, E. 2001. *Mesorhizobium chacoense* sp. nov, a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco arido region (Argentina). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 51, 1011-1021.
- Vincent, J.M., 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria, international Biological Programme Handbook N° 15. Blackwell Scientific Publication, Ltd, Oxford, UK.

- Virginia, R.A., Jarrel, W.M., Rundel, P.W., Shearer, G., Kohl, H. 1989. The use of variation in natural abundance of ^{15}N to assess symbiotic nitrogen fixation by woody plants. *Ecological study* 68, 375-394
- Vose, P.B., Ruschel, A.P., Victoria, R.L., Saito, S.M.T., Matsui, E. 1982. ^{15}N as a Tool in Biological Nitrogen Fixation Research. In : *Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture, Cali*, (Graham P. H. and Harris S.C., eds.), Centro International de Agricultura Tropical. Pp. 575-592.
- Wang, E.T., Van Berkum, P., Beyene, D., Chen, W.X., Martinez-Remero, E. 1999. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 51-55.
- Wang, E.T., Van Berkum, P., Beyene, D., Sui, X., Dorado, O., Chen, W.X., Martinez-Romero, E. 1998. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 687-699.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, P., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P., Truper, H.G. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 463-464.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Bacteriol.* 173, 697-703.
- Willems, A., Collins, M. D. 1993. Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 51, 111-117.
- Willems, A., Coopman, R., Gillis, M. 2001a. Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridations in *Bradyrhizobium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 51, 623-632.
- Willems, A., Coopman, R., Gillis, M. 2001b. Phylogenetic analysis of *Rhizobia* and *Agrobacteria* based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 706-711.
- Witty, J.F. 1983. Estimating N-fixation in the field using ^{15}N -labelled fertilizer : some problems and solutions. *Soil Biol. Biochem.* 15, 631-639.

- Woese, C.R. 1991. Prokaryote systematics : the evolution of a science. 3-18. The Prokaryotes. Balows, A., Trüpe, H.G., Dworkin, M. Harder, W., and Schleifer, K.H. (eds). Springer, New York.
- Woese, C.R., Fox, G.E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain : the primary kingdoms. PNAS. 74, 5088-5090.
- Xu, L. M., Ge, C., Cui, Z., Li, J., Fan, H. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybean. Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 706-711.
- Yanagi, M., Yamasato, K. 1993. Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. FEMS Microbiol. Lett. 107, 115-120.
- Yoneyama, T., Ladha, J.K., Watanabe, I. 1987. Nodule bacteroids and *Anabaena* : natural ¹⁵N enrichment in the legume-*Rhizobium* and *Azolla Anabaena* symbiotic system. J Plant Physiol 127:251-259
- Yoneyama, T., Murakami, T., Boonkerd, N., Wadisirisuk, P., Siripin, S., Kouno, K. 1990. Natural ¹⁵N abundance in shrub in tree legumes. *Casuarina*, and non-N₂-fixing plants in Thailand. Plant Soil 128, 287-292.
- Yoneyama, T., Muraoka, T., Murakami, T., Boonkerd, N. 1993. Natural ¹⁵N abundance in tropical plants with emphasis on tree legumes. Plant and Soil 153, 295-304
- Young J.P.W., Downer, H.L., Eardly, B.D. 1991. Phylogeny of the phototrophic rhizobium strain BTAi1 by polymerase chain reaction based sequencing of 16S rRNA gene segment. J. Bacteriol. 173, 2271-2277.
- Young, J.M., Bull, C.T., De Boer, S.H., Firrao, G., Garder, L., Saddler, G.E., Stead, D.E., Takikawa, Y. 2001. Classification nomenclature, and plant pathogenic bacteria. A clarification. Phytopathology. 91, 617-620.
- Zhang, X., Harper R., Karsisto M., Lindstrom, K. 1991. Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from root nodules of leguminous trees. Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 104-113.
- Zhang, X., Nick, G., Kaijalainen, S. Terefework, Z., Paulin, L., Tighe, S.W., Graham, P.H., Lindstrom, K. 1999. Phylogeny and diversity of

Bradyrhizobium strains isolated from the root nodules of peanut (*Arachis hypogea*) in Sichan, China. Syst. Appl. Microbiol. 22, 378-386.

ANNEXES

ANNEXES

Alignement multiple des séquences de gènes 16S rDNA

Numéro d'accèsion dans GENBANK / à partir du 31/05/2003.

ORS196 = AF514792; ORS199 = AF514794; ORS204 = AF5147916; ORS206 = AF5147918; ORS207 = AF514800; ORS214 = AF514801 et ORS217 = AF514802.

```

ORS214      ....TGAAGA GTTAGATCTT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCAGGCTTA
ORS204      .....      .TTTGATCCT GGCTCAGAGC GAACGCTGGC GGCAGGCTTA
ORS217      ....TGAGA GTTAGATCTT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCAGGCTTA
ORS206      .....      .TTTGATCCT GGCTCAGAGC GAACGCTGGC GGCAGGCTTA
ORS207      .....      ...AGATCTT GGCTCAGAAC GAACGCTGGC GGCAGGCTTA
ORS199      .....TTGAA AGTTAATCTT GGCTCAGAGC GAACGCTGGC GGCAGGCTTA
ORS196      .....      ...AGATCTT GGCTCAGAGC GAACGCTGGC GGCAGGCTTA

```

```

ORS214      ACACATGCAA GTCGAGCGCC C..... GCAAG.....
ORS204      ACACATGCAA GTCGAGCGGG CAT.....A GCAAT.....
ORS217      ACACATGCAA GTCGAGCGCC C.....C GCAAG.....
ORS206      ACACATGCAA GTCGAGCGGG CGT.....A GCAAT.....
ORS207      ACACATGCAA GTCGAGCGCC C..... GCAAG.....
ORS199      ACACATGCAA GTCGAGCGGG CGT.....A GCAAT.....
ORS196      ACACATGCAA GTCGAGCGGG CAT.....A GCAAT.....

```

```

ORS214      .....      .....      .....      .....      .....GGG
ORS204      .....      .....      .....      .....      .....ATG
ORS217      .....      .....      .....      .....      .....GGG
ORS206      .....      .....      .....      .....      .....ACG
ORS207      .....      .....      .....      .....      .....GGG
ORS199      .....      .....      .....      .....      .....ACG
ORS196      .....      .....      .....      .....      .....ATG

```

```

ORS214      ..AGCGGCAG ACGGGTGAGT AACCGGTGGG AATCTACCTT TTGGTTCGGA
ORS204      TCAGCGGCAG ACGGGTGAGT AACCGGTGGG AACGTACCTT TTGGTTCGGA
ORS217      ..AGCGGCAG ACGGGTGAGT AACCGGTGGG AATCTACCTT TTGGTTCGGA
ORS206      TCAGCGGCAG ACGGGTGAGT AACCGGTGGG AACGTACCTT TTGGTTCGGA
ORS207      ..AGCGGCAG ACGGGTGAGT AACCGGTGGG AATCTACCCA TCTCTACGGA
ORS199      TCAGCGGCAG ACGGGTGAGT AACCGGTGGG AACGTACCTT TTGGTTCGGA
ORS196      TCAGCGGCAG ACGGGTGAGT AACCGGTGGG AACGTACCTT TTGGTTCGGA

```

```

ORS214      ATAACGCAGG GAAACTTTGTG CTAATACCGT ATGTGTCCTT CGGGAGAAAG
ORS204      ACAACTGAGG GAAACTTCAG CTAATACCGG ATAAGCCCTT ACGGGGAAAG
ORS217      ATAACGCAGG GAAACTTTGTG CTAATACCGT ATGTGTCCTT CGGGAGAAAG
ORS206      ACAACACAGG GAAACTTTGTG CTAATACCGG ATAAGCCCTT ACGGGGAAAG
ORS207      ACAACTCCGG GAAACTGGAG CTAATACCGT ATACGTCCTT CGGGAGAAAG
ORS199      ACAACACAGG GAAACTTTGTG CTAATACCGG ATAAGCCCTT ACGGGGAAAG
ORS196      ACAACTGAGG GAAACTTCAG CTAATACCGG ATAAGCCCTT ACGGGGAAAG

```

```

ORS214      ATTTATCGGC AAGAGATGAG CCCGCGTTGG ATTAGCTAGT TGGTGGGGTA
ORS204      ATTTATCGCC GAAAGATCGG CCCGCGTCTG ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA
ORS217      ATTTATCGGC AAGAGATGAG CCCGCGTTGG ATTAGCTAGT TGGTGGGGTA
ORS206      ATTTATCGCC GAAAGATCGG CCCGCGTCTG ATTAGCTAGT TGGTAGGGTA
ORS207      ATTTATCGGA GATGGATGAG CCCGCGTTGG ATTAGCTAGT TGGTGGGGTA
ORS199      ATTTATCGCC GAAAGATCGG CCCGCGTCTG ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA
ORS196      ATTTATCGCC GAAAGATCGG CCCGCGTCTG ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA

```

```

ORS214      AAGGCCTACC AAGGCGACGA TCCATAGCTG GTCTGAGAGE ATGATCAGCC

```

Annexes

ORS204	ATGGCTCACC	AAGGCGACGA	TCAGTAGCTG	GTCTGAGAGG	ATGATCAGCC
ORS217	AAGGCTTACC	AAGGCGACGA	TCCATAGCTG	GTCTGAGAGG	ATGATCAGCC
ORS206	ATGGCTTACC	AAGGCGACGA	TCAGTAGCTG	GTCTGAGAGG	ATGATCAGCC
ORS207	ATGGCTTACC	AAGGCGACGA	TCCATAGCTG	GTCTGAGAGG	ATGATCAGCC
ORS199	ATGGCTCACC	AAGGCGACGA	TCAGTAGCTG	GTCTGAGAGG	ATGATCAGCC
ORS196	ATGGCTCACC	AAGGCGACGA	TCAGTAGCTG	GTCTGAGAGG	ATGATCAGCC
ORS214	ACATTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAAACCTCC	TACGGGAGGC	AGCAGTGGGG
ORS204	ACATTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAAACCTCC	TACGGGAGGC	AGCAGTGGGG
ORS217	ACATTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAAACCTCC	TACGGGAGGC	AGCAGTGGGG
ORS206	ACATTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAAACCTCC	TACGGGAGGC	AGCAGTGGGG
ORS207	ACACTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAGACTCC	TACGGGAGGC	AGCAGTGGGG
ORS199	ACATTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAAACCTCC	TACGGGAGGC	AGCAGTGGGG
ORS196	ACATTGGGAC	TGAGACACGG	CCCAAACCTCC	TACGGGAGGC	AGCAGTGGGG
ORS214	AATATTGGAC	AATGGGCGCA	AGCCTGATCC	AGCCATGCCG	CGTGAGTGAT
ORS204	AATATTGGAC	AATGGGCGCA	AGCCTGATCC	AGCCATGCCG	CGTGAGTGAT
ORS217	AATATTGGAC	AATGGGCGCA	AGCCTGATCC	AGCCATGCCG	CGTGAGTGAT
ORS206	AATATTGGAC	AATGGGGGCA	ACCCTGATCC	AGCCATGCCG	CGTGAGTGAT
ORS207	AATATTGGAC	AATGGGCGAA	AGCCTGATCC	AGCCATGCCG	CGTGAGTGAT
ORS199	AATATTGGAC	AATGGGGGCA	ACCCTGATCC	AGCCATGCCG	CGTGAGTGAT
ORS196	AATATTGGAC	AATGGGCGCA	AGCCTGATCC	AGCCATGCCG	CGTGAGTGAT
ORS214	GAAGGCCCTA	GGGTTGTAAA	GCTCTTTTAC	CGGAGAAGAT	AATGACGGTA
ORS204	GAAGGCCCTA	GGGTTGTAAA	GCTCTTTTGT	GCGGGAAGAT	AATGACGGTA
ORS217	GAAGGCCCTA	GGGTTGTAAA	GCTCTTTTAC	CGGAGAAGAT	AATGACGGTA
ORS206	GAAGGCCCTA	GGGTTGTAAA	GCTCTTTTGT	GCGGGAAGAT	AATGACGGTA
ORS207	GAAGGCCCTA	GGGTTGTAAA	GCTCTTTCAA	CGGTGAAGAT	AATGACGGTA
ORS199	GAAGGCCCTA	GGGTTGTAAA	GCTCTTTTGT	GCGGGAAGAT	AATGACGGTA
ORS196	GAAGGCCCTA	GGGTTGTAAA	GCTCTTTTGT	GCGGGAAGAT	AATGACGGTA
ORS214	TCCGGAGAAG	AAGCCCCGG.	.CTAACTTCG	TGCC.AGCAG	CCGCGGTAAT
ORS204	CCGCAAGAAT	AAGCCCCGG.	.CTAACTTCG	TGCCAAGCAG	CCGCGGTAAT
ORS217	TCCGGAGAAG	AAGCCCCGG.	.CTAACTTCG	TGCC.AGCAG	CCGCGGTAAT
ORS206	CCGCAAGAAT	AAGCCCCGG.	.CTAACTTCG	TGCC.AGCAG	CCGCGGTAAT
ORS207	ACCGTAGAAG	AAGCCCCGG.	.CTAACTTCG	TGCC.AGCAG	CCGCGGTAAT
ORS199	CCGCAAGAAT	AAGCCCCGG.	.CTAACTTCG	TGCC.AGCAG	CCGCGGTAAT
ORS196	CCGCAAGAAT	AAGCCCCGG.	.CTAACTTCG	TGCC.AGCAG	CCGCGGTAAT
ORS214	AC.GAAGGGG	GCTAGCGTTG	TTCGGAATTA	CTGGGCGTAA	AGCGCACGTA
ORS204	AC.GAAGGGG	GCTAGCGTTG	CTCGGAATCA	CTGGGCGTAA	AGGGTGCCTA
ORS217	ACTGAAGGGG	GCTAGCGTTG	TTCGGAATTA	CTGGGCGTAA	AGCGCACGTA
ORS206	AC.GAAGGGG	GCTAGCGTTG	CTCGGAATCA	CTGGGCGTAA	AGGGTGCCTA
ORS207	AC.GAAGGGG	GCTAGCGTTG	TTCGGAATTA	CTGGGCGTAA	AGCGCACGTA
ORS199	AC.GAAGGGG	GCTAGCGTTG	CTCGGAATCA	CTGGGCGTAA	AGGGTGCCTA
ORS196	AC.GAAGGGG	GCTAGCGTTG	CTCGGAATCA	CTGGGCGTAA	AGGGTGCCTA
ORS214	GGCGGATCGA	TCAGTCA.GG	GGTAAAATCC	CAGGGCTCAA	CCCTGGAACT
ORS204	GGCGGGTCTT	TAAGTCA.GG	GGTAAAATCC	TGGAGCTCAA	CTCCAGAACT
ORS217	GGCGGATCGA	TCAGTCA.GG	GGTAAAATCC	CAGGGCTCAA	CCCTGGAACT
ORS206	GGCGGGTCTT	TAAGTCA.GG	GGTAAAATCC	TGGAGCTCAA	CTCCAGAACT
ORS207	GGCGGATACT	TAAGTCA.GG	GGTAAAATCC	CAGGGCTCAA	CCCTGGAACT
ORS199	GGCGGGTCTT	TAAGTCA.GG	GGTAAAATCC	TGGAGCTCAA	CTCCAGAACT
ORS196	GGCGGGTCTT	TAAGTCA.GG	GGTAAAATCC	TGGAGCTCAA	CTCCAGAACT
ORS214	GCCTTTGATA	CTGTCTGA.TC	TGGAGTATGG	AAGAGGTGAG	TGGAATTCGG
ORS204	GCCTTTGATA	CTGAAGA.TC	TTGAGTTCGG	GAGAGGTGAG	TGGAACTGCG
ORS217	GCCTTTGATA	CTGTCTGA.TC	TGGAGTATGG	AAGAGGTGAG	TGGAATTCGG
ORS206	GCCTTTGATA	CTGAAGA.TC	TTGAGTTCGG	GAGAGGTGAG	TGGAACTGCG
ORS207	GCCTTTGATA	CTGGGTA.TC	TGGAGTCCGG	AAGAGGTGAG	TGGAATTCGG
ORS199	GCCTTTGATA	CTGAAGA.TC	TTGAGTTCGG	GAGAGGTGAG	TGGAACTGCG
ORS196	GCCTTTGATA	CTGAAGA.TC	TTGAGTTCGG	GAGAGGTGAG	TGGAACTGCG

Annexes

ORS214	AGTGTAGAGG	TGAAATTCGT	AGATATTCGG	AGGAACACCA	GTGGCGAAGG
ORS204	AGTGTAGAGG	TGAAATTCGT	AGATATTCGC	AAGAACACCA	GTGGCGAAGG
ORS217	AGTGTAGAGG	TGAAATTCGT	AGATATTCGG	AGGAACACCA	GTGGCGAAGG
ORS206	AGTGTAGAGG	TGAAATTCGT	AGATATTCGC	AAGAACACCA	GTGGCGAAGG
ORS207	AGTGTAGAGG	TGAAATTCGT	AGATATTCGG	AGGAACACCA	GTGGCGAAGG
ORS199	AGTGTAGAGG	TGAAATTCGT	AGATATTCGC	AAGAACACCA	GTGGCGAAGG
ORS196	AGTGTAGAGG	TGAAATTCGT	AGATATTCGC	AAGAACACCA	GTGGCGAAGG
ORS214	CGGCTCACTG	GTCCATTACT	GACGCTGAGG	TGCGAAAAGCG	TGGGGAGCAA
ORS204	CGGCTCACTG	GCCCGATACT	GACGCTGAGG	CACGAAAAGCG	TGGGGAGCAA
ORS217	CGGCTCACTG	GTCCATTACT	GACGCTGAGG	TGCGAAAAGCG	TGGGGAGCAA
ORS206	CGGCTCACTG	GCCCGATACT	GACGCTGAGG	CACGAAAAGCG	TGGGGAGCAA
ORS207	CGGCTCACTG	GTCCGGTACT	GACGCTGAGG	TGCGAAAAGCG	TGGGGAGCAA
ORS199	CGGCTCACTG	GCCCGATACT	GACGCTGAGG	CACGAAAAGCG	TGGGGAGCAA
ORS196	CGGCTCACTG	GCCCGATACT	GACGCTGAGG	CACGAAAAGCG	TGGGGAGCAA
ORS214	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	AATGTTAGCC
ORS204	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	AATGCCAGCC
ORS217	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	AATGTTAGCC
ORS206	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	AATGCCAGCC
ORS207	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	GAAGCTAGCC
ORS199	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	AATGCCAGCC
ORS196	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	GTAAACGATG	AATGCCAGCC
ORS214	GTCGGGCAGT	ATACTGTTTCG	GTGGCGCAAG	CTAA.CGCAT	TAAACATTCC
ORS204	GTTAGTGGGT	TTACTCACTA	GTGGCGCA.G	CTAA.CGCTT	TAAGCATTCC
ORS217	GTCGGGCAGT	ATACTGTTTCG	GTGGCGCA.G	CTAAGCGCAT	TAAACATTCC
ORS206	GTTAGTGGGT	TTACTCACTA	GTGGCGCA.G	CTAA.CGCTT	TAAGCATTCC
ORS207	GTTGGCAAGT	TTACTTGTTCG	GTGGCGCA.G	CTAA.CGCAT	GAAGCTTCCC
ORS199	GTTAGTGGGT	TTACTCACTA	GTGGCGCA.G	CTAA.CGCTT	TAAGCATTCC
ORS196	GTTAGTGGGT	TTACTCACTA	GTGGCGCA.G	CTAA.CGCTT	TAAGCATTCC
ORS214	GCCTGGGGAG	TACGGTCGCA	AGATTAAAAC	TCAAAGGAAT	T.GACGGGGG
ORS204	GCCTGGGGAG	TACGGTCGCA	AGATTAAAAC	TCAAAGGAAT	T.GACGGGGG
ORS217	GCCTGGGGAG	TACGGTCGCA	AGATTAAAAC	TCAAAGGAAT	T.GACGGGGG
ORS206	GCCTGGGGAG	TACGGTCGCA	AGATTAAAAC	TCAAAGGAAT	T.GACGGGGG
ORS207	GCCTGGGGAG	TACGGTCGCA	AGATTAAAAC	TCAAAGGAAT	T.GACGGGGG
ORS199	GCCTGGGGAG	TACGGTCGCA	AGATTAAAAC	TCAAAGGAAT	T.GACGGGGG
ORS196	GCCTGGGGAG	TACGGTCGCA	AGATTAAAAC	TCAAAGGAAT	T.GACGGGGG
ORS214	CCCGCACAAG	CGGTGGAGCA	TGTGGTTTAA	TTCGAAGCAA	CGCGCAGAAC
ORS204	CCCGCACAAG	CGGTGGAGCA	TGTGGTTTAA	TTCGACGCAA	CGCGCAGAAC
ORS217	CCCGCACAAG	CGGTGGAGCA	TGTGGTTTAA	TTCGAAGCAA	CGCGCAGAAC
ORS206	CCCGCACAAG	CGGTGGAGCA	TGTGGTTTAA	TTCGACGCAA	CGCGCAGAAC
ORS207	CCCGCACAAG	CGGTGGAGCA	TGTGGTTTAA	TTCGAAGCAA	CGCGCAGAAC
ORS199	CCCGCACAAG	CGGTGGAGCA	TGTGGTTTAA	TTCGACGCAA	CGCGCAGAAC
ORS196	CCCGCACAAG	CGGTGGAGCA	TGTGGTTTAA	TTCGACGCAA	CGCGCAGAAC
ORS214	CTTACCAGCC	CTTGACAT.C	CCGT..GTTA	CCCAGAGAGA	TTTGGGG..T
ORS204	CTTACCAGCC	CTTGACAT.C	CCGGTCGCGG	ACTCCAGAGA	CGGAGTTC.T
ORS217	CTTACCAGCC	CTTGACAT.C	CCGT..GTTA	CCCAGAGAGA	TT..TGGGGT
ORS206	CTTACCAGCC	CTTGACATGT	CCAGGACCGG	TC.GCAGAGA	CGT.GACCTT
ORS207	CTTACCAGCC	CTTGACAT.C	CCGGTCGCGG	TTTCCAGAAA	TGAAAACC.T
ORS199	CTTACCAGCC	CTTGACATGT	CCAGGACCGG	.TCGAGAGA	TG..TGACCT
ORS196	CTTACCAGCC	CTTGACAT.C	CCGGTCGCGG	ACTCCAGAGA	CGGAGTTC.T
ORS214	CCACTTCGG.	TGGCG.CGG.	AGACAGGTGC	TGCATGGCTG	TCGTCAAGCTC
ORS204	TCAGTTCGGC	TGGAC.CGG.	AGACAGGTGC	TGCATGGCTG	TCGTCAAGCTC
ORS217	CCACTTCGG.	TGGCG.CGGA	.GACAGGTGC	TGCATGGCTG	TCGTCAAGCTC
ORS206	.CTCTTCGGA	.GCCT.GGAA	.CACAGGTGC	TGCATGGCTG	TCGTCAAGCTC
ORS207	TCAGTTCGGC	TGGAC.CGGT	.GACAGGTGC	TGCATGGCTG	TCGTCAAGCTC
ORS199	TCTCTTCGG.	.AGCC.TGGA	ACACAGGTGC	TGCATGGCTG	TCGTCAAGCTC
ORS196	TCAGTTCGGC	TGGAC.CGGA	.GACAGGTGC	TGCATGGCTG	TCGTCAAGCTC

Annexes

ORS214 GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA CCCTCGCCCT
 ORS204 GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA CCCCCGTCCT
 ORS217 GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA CCCTCGCCCT
 ORS206 GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA CCCCCGTCCT
 ORS207 GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA CCCTCGCCCT
 ORS199 GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA CCCCCGTCCT
 ORS196 GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA CCCCCGTCCT

ORS214 TAGTTGCCAG CATTGTTGTTG GGCACCTCTAA GGGGACTGCC GGTGATAAGC
 ORS204 TAGTTGCTAC CATTGTTGTTG AGCACTCTAA GGAGACTGCC GGTGATAAGC
 ORS217 TAGTTGCCAG CATTGTTGTTG GGCACCTCTAA GGGGACTGCC GGTGATAAGC
 ORS206 TAGTTGCTAC CATTGTTGTTG AGCACTCTAA GGAGACTGCC GGTGATAAGC
 ORS207 TAGTTGCCAT CATTGTTGTTG GGCACCTCTAA GGGGACTGCC GGTGATAAGC
 ORS199 TAGTTGCTAC CATTGTTGTTG AGCACTCTAA GGAGACTGCC GGTGATAAGC
 ORS196 TAGTTGCTAC CATTGTTGTTG AGCACTCTAA GGAGACTGCC GGTGATAAGC

ORS214 CGAGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAGTCC TCATGGCCCT TACGGGCTGG
 ORS204 CGCGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAGTCC TCATGGCCCT TACGGGCTGG
 ORS217 CGAGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAGTCC TCATGGCCCT TACGGGCTGG
 ORS206 CGCGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAGTCC TCATGGCCCT TACGGGCTGG
 ORS207 CGAGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAGTCC TCATGGCCCT TACGGGCTGG
 ORS199 CGCGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAGTCC TCATGGCCCT TACGGGCTGG
 ORS196 CGCGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAGTCC TCATGGCCCT TACGGGCTGG

ORS214 GCTACACACG TGCTACAATG GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GCACGCGAGT
 ORS204 GCTACACACG TGCTACAATG GCGGTGACAA TGGGATGCTA AGGGGCGACC
 ORS217 GCTACACACG TGCTACAATG GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GCACGCGAGT
 ORS206 GCTACACACG TGCTACAATG GCGGTGACAA TGGGATGCGA AGACGCAAGT
 ORS207 GCTACACACG TGCTACAATG GTGGTGACAG TGGGCAGCGA GACCGCGAGG
 ORS199 GCTACACACG TGCTACAATG GCGGTGACAA TGGGATGCGA AGGGGTAACC
 ORS196 GCTACACACG TGCTACAATG GCGGTGACAA TGGGATGCTA AGGGGCGACC

ORS214 GTGAGCTAAT CTCCAAAAAGC CATCTCAGTT CGGATTGCAC TCTGCAACTC
 ORS204 CTTCGCAAA CTCAAAAAAGC CGTCTCAGTT CGGATTGGGC TCTGCAACTC
 ORS217 GTGAGCTAAT CTCCAAAAAGC CATCTCAGTT CGGATTGCAC TCTGCAACTC
 ORS206 CCTAGCAAAT CTCAAAAAAGC CGTCTCAGTT CGGATTGGGC TCTGCAACTC
 ORS207 TCGAGCTAAT CTCCAAAAAGC CATCTCAGTT CGGATTGCAC TCTGCAACTC
 ORS199 CCTAGCAAAT CTCAAAAAAGC CGTCTCAGTT CGGATTGGGC TCTGCAACTC
 ORS196 CTTCGCAAA CTCAAAAAAGC CGTCTCAGTT CGGATTGGGC TCTGCAACTC

ORS214 GAGTGCATGA AGTTGGAATC GCTAGTAATC GCGGATCAGC ATGCCGCGGT
 ORS204 GAGCCCATGA AGTTGGAATC GCTAGTAATC GTGGATCAGC ACGCCACGGT
 ORS217 GAGTGCATGA AGTTGGAATC GCTAGTAATC GCGGATCAGC ATGCCGCGGT
 ORS206 GAGCCCATGA AGTTGGAATC GCTAGTAATC GTGGATCAGC ACGCCACGGT
 ORS207 GAGTGCATGA AGTTGGAATC GCTAGTAATC GCGGATCAGC ATGCCGCGGT
 ORS199 GAGCCCATGA AGTTGGAATC GCTAGTAATC GTGGATCAGC ACGCCACGGT
 ORS196 GAGCCCATGA AGTTGGAATC GCTAGTAATC GTGGATCAGC ACGCCACGGT

ORS214 GAATACGTTT CCGGGCCTTG TACACACC GC CCGTACACC ATGGGAGTTG
 ORS204 GAATACGTTT CCGGGCCTTG TACACACC GC CCGTACACC ATGGGAGTTG
 ORS217 GAATACGTTT CCGGGCCTTG TACACACC GC CCGTACACC ATGGGAGTTG
 ORS206 GAATACGTTT CCGGGCCTTG TACACACC GC CCGTACACC ATGGGAGTTG
 ORS207 GAATACGTTT CCGGGCCTTG TACACACC GC CCGTACACC ATGGGAGTTG
 ORS199 GAATACGTTT CCGGGCCTTG TACACACC GC CCGTACACC ATGGGAGTTG
 ORS196 GAATACGTTT CCGGGCCTTG TACACACC GC CCGTACACC ATGGGAGTTG

ORS214 GTTTTACCCG AAGGTAGTGC GCTAACC.GC AAGG.AGGCA GCTAACCACG
 ORS204 GTTTTACCTG AAGACGGTGC GCTAACC.GA AAGG.GGGCA GCCGGCCACG
 ORS217 GTTTTACCCG AAGGTAGTGC GCTAACC.GC AAGG.AGGCA GCTAACCACG
 ORS206 GCTTTACCTG AAGACGGTGC GCTAACCACG AATGGAGGCA GCCGGCCACG
 ORS207 GTTTTACCCG AAGGCGGTGT GCTAACC.GC AAGG.AGGCA GCGGACCACG
 ORS199 GTTTTACCTG AAGACGGTGC GCTAACCACG AATGGAGGCA GCCGGCCACG

Annexes

ORS196	GTTTTACCTG	AAGACGGTGC	GCTAACC.GA	AAGG.GGGCA	GCCGGCCACG
ORS214	GTAGGGTCAG	CGACTGGGGT	GAAGTCGTAA	CAAGGTAGCC	GTAGGGG...
ORS204	GTAGGGTCAG	CGACTGGGGT	GAAGTCGTAA	CAAGGTAGCC	GTAGGGGAAC
ORS217	GTAGGGTCAG	CGACTGGGGT	GAAGTCGTAA	CAAGGTAGCC	GTAGGGG...
ORS206	GTAGGGTCAG	CGACTGGGGT	GAAGTCGTAA	CAAGGTAGCC	GTAGGGGAAC
ORS207	GTAGGGTCAG	CGACTGGGGT	GAAGTCGTAA	CAAGGTAGCC	GTAGGGG...
ORS199	GTAGGGTCAG	CGACTGGGGT	GAAGTCGTAA	CAAGGTAGCC	GTAGGGG...
ORS196	GTAGGGTCAG	CGACTGGGG.	GAAGTCGTAA	CAAGGTAGC.
ORS214
ORS204	CTGCGGCTGG	ATCACCTCCT	TAA.....
ORS217
ORS206	CTGCGGCTGG	ATCACCTCCT	TAAGCTTA..
ORS207
ORS199
ORS196

Annexes

Alignement multiple des séquences de l'Intergène 16S-23S rDNA.

Numéro d'accèsion dans GENBANK / à partir du 31/05/2003.

ORS196 = AF514793 ; RS199 = AF514795 ; ORS204 = AF514797 et
ORS206 = AF514799

séquences de gène tRNA Ile : sur fond gris clair

séquences de gène tRNA Ala : sur fond gris foncé

```

ORS196      .GGACCCCTC CTTTCTAAGG ATGATCCTTC AGCG.AGCTC .....A
ORS199      TGATCCCTC CTTTCTAAGG ATGATCCTTC AGCG.AGCTC .....A
ORS204      TGATCCCTC CTTTCTAAGG ATGATCCTTC AGCG.AGCTC .....A
ORS206      .....CCCTC CTTTCTAAGG ATGGTTCTTC AGA..AGCTT .....

ORS196      CGCTCACTAT CGGATCGTTT TA..GAAACA TTCAGGGGCC AACAG.TT.T
ORS199      CGCTCACTAT CGGATCGTTT TA..GAAACA T.CAGTGGCC AACAG.ATCG
ORS204      CGCTCACTAT CGGATCGTTT TA..GAAACA TTCAGGGGCC AACAG.TTT.
ORS206      .GCT.TCTAT CGAACCGTTT TA..GAAACA T.CAGTGGCC AACAG.ATCG

ORS196      CAGGATTGTT GAGCTCCATT GGCGGGATTT CGCCGTCTTC GTTTCCTCTTT
ORS199      CCAGATCGTT GAGCTGCATT GGCGGGATTT CGCCGTCTTC GTTTCCTCTTT
ORS204      CAGGATTGTT GAGCTCCATT GGCGGGATTT CGCCGTCTTC GTTTCCTCTTT
ORS206      CCAGATCGTT GAGCTGCATT GGCGGGATTT CGCCGTCTTC GTTTCCTCTTT

ORS196      CTTCGC.GGA CGAACACGCG C.CAGGGGCT GA.GCGCTGT .....
ORS199      CTTCGC.GGA CGAACACGCG C.T.GGGCCT G.....
ORS204      CTTCGC.GGA CGAACACGCG C.CAGGGGCT GA.GCGC...
ORS206      CTTCGC.GGA CGAACACGCG C.T.GGGCCT G.....

ORS196      .....GCG AT.GCATC.. ..... .GACTTCGGG TGCGCGCCGG
ORS199      ..... CAACGG CAG..... .GATCCAAGG TCCTTAACGG
ORS204      ....TGTCG AT.GCATCGA CTT..... .CAGGTCGGG TGCGCGCCGG
ORS206      ..... CAACGG CAG..... .GATCCAAGG TCCTTAACGG

ORS196      CATGTCTCTC GT..... ..GT TAGGGGCTTG TAGCTCAGTT
ORS199      GATAT..... GC..... ..GT TAGGGGCTTG TAGCTCAGTT
ORS204      CATGTCTCTC GT..... ..GT TAGGGGCTTG TAGCTCAGTT
ORS206      GATAT..... GC..... ..GT TAGGGGCTTG TAGCTCAGTT

ORS196      GGTTAGAGCG CGCGCTTGAT AAGCGTGAGG TCGGAAGTTC AAGTCTTCCC
ORS199      GGTTAGAGCG CGCGCTTGAT AAGCGTGAGG TCGGAAGTTC AAGTCTTCCC
ORS204      GGTTAGAGCG CGCGCTTGAT AAGCGTGAGG TCGGAAGTTC AAGTCTTCCC
ORS206      GGTTAGAGCG CGCGCTTGAT AAGCGTGAGG TCGGAAGTTC AAGTCTTCCC

ORS196      AGGCCCACCA GCCTTCGCGC TTCGCTGCTT CAGCTAGGC. ....AGGC
ORS199      AGGCCCACCA .....
ORS204      AGGCCCACCA .....
ORS206      AGGCCCACCA GCCTTCGCGC GCTTTGCTG CTTCGGCTCG GCGAGCCGGA

ORS196      CTTCCAAGAT GAAGGCTGCT GCGC....C. .... ..GCAGCCTT
ORS199      ..... ..CT TT.....
ORS204      ..... T TTT.....
ORS206      GATTGAGCGA AGGCTGTCGC GCCGAAGCCG AAAGGCGAAG GCGGACTAGT

ORS196      GCGAAGGCG AGCG..... ..GGTATC AACAAATGCGC T CG C C
ORS199      ...C..ATCG AGTG..... ..AGCAT. ..CG C C
ORS204      .....GATCG AGTGC.... ..GAGCAT. ....CG C C
ORS206      TGACCCGATC AGTGCTTGGC TTGAGCAT. ....CG C C
b
ORS196      GG .ACGGGG CCA AGC CA GC GGGAGAG CGCG GC G TAGGA GA
ORS199      GG .ACGGGG CCA AGC CA GC GGGAGAG CGCG GC G TAGGA GA
ORS204      GG .ACGGGG CCA AGC CA GC GGGAGAG CGCG GC G TAGGA GA

```

Annexes

ORS206	GG	GGGG	CGA	CGC	CGC	GGG	G	G	CG	G	G	G
ORS196	GG	CG	CGG	CGA	CGCG	C	GGC	CGAC	CAG.....
ORS199	GG	CG	CGG	CGA	CGCG	C	GGC	CGAC	CAG.....
ORS204	GG	CG	CGG	CGA	CGCG	C	GGC	CGAC	CAG.....
ORS206	GG	CG	CGG	CGA	CGCG	C	GGC	CGAC	CAGCCTTCGC	AGGCTACGCC		
ORS196	ATGGAATTGA	AGCTCGAGAA		
ORS199	ATGGT.TTGA	TCACCGAGG.		
ORS204	ATGGT.TTGA	TCACCAACG.		
ORS206	TGCTT	CGGGCT	AGGCG	AGCCA	GCCGG	TAGCG	AAGGC	.TGCC	GCGCC	GAAAGC		
ORS196	TACG.....	.CCTT	GCTTG	AGAGG	CTCTG	TTC.ATA...	..TCG	TCCGC				
ORS199	TCATG	C.....	ACCG.	..TCG	TCCGC		
ORS204	GCGTT	ACCG.	..TCG	TCCGC		
ORS206	CGAAA	GGCGA	AGGCG	GGGCTA	CTTCT	GATCC	CGTA	.ACCA.	AATCG	TCCGC		
ORS196	GAAAC	ATCAC	TTCGCA	.CGC	ATTGG	TCCGG	ATGGAC	CGGTG	ACGT	.GCGTG		
ORS199	GAAAC	ATCAC	TTCGC	ATCCT	GCTAG	TCTGG	ATAGAC	AGCA	AGTT	.GCGTG		
ORS204	GAAAC	ATCAC	TTCGCA	.CGC	ATTGG	TCCGG	ATGGAC	CGGTG	ACGT	.GCGTG		
ORS206	GAAAC	ATCAC	TTCGC	ATCCT	GCTAG	TCTGG	ATAGAC	AGCA	AGTT	.GCGTG		
ORS196	TTTTCT	GACA	TCGTA	AAAGAG	GAGAT	CGATC	CGAGTT	TGGA	..TCC	AGCG.		
ORS199	TTTTCT	GACA	TCGTA	AAAGAG	GAGAT	CGATC	CGAGTT	TGGT	CGT	GAGCA.		
ORS204	TTTTCT	GACA	TCGTA	AAAGAG	GAGAT	CGATC	CGAGTT	TGGA	..TCC	AGCG.		
ORS206	TTTTCT	GACA	TCGTA	AAAGAG	GAGAT	CGATC	CGAGTT	TGGT	..CGT	GTA..		
ORS196	.AAGCA	AATT.	CGCGG	GTACC	A.TTC	CTAAT	CTCCAG	..AT	CGTTT	TCGGC		
ORS199	.TATCG	TTGC	..GC	..GAGC	C.TTC	ATTAT	CTCCGG	..AT	CATTT	TCGGC		
ORS204	.AAGCA	AATT.	CGCGG	GTACC	A.TTC	CTAAT	CTCCAG	..AT	CGTTT	TCGGC		
ORS206	GCAG	ATTGC.	TGCGG	AATC	C.TTC	ATTAT	CTCCGG	..AT	CATTT	TCGGC		
ORS196	GCTCG	GCAT	CGCAG	CTCA.	TCGCAA	.GA.....	..TG	AGT	GAGG		
ORS199	GCTCG	CG...	.T...	.C.CG.	ACCG	CAAG.....	GTT	GCC		
ORS204	GCTCG	GCAT	C.....GC	AGCTCA	TC...G	CAAAG	ATG	AGT	GAGG	
ORS206	GCTCG	A....	CG.....	..CT	G...A	..CCG	CAAG.....	GTT	GCTG..		
ORS196	T.GAG	CGAGT	TGTAA	.AAC	GATCT.	TTGTAG	CGA.	AGCTT	GACCG		
ORS199	T.G	CGAGT	TGTAA	.AAT	GATC.C	TTTTAG	CGA.	AGCTT	GACCG		
ORS204	T.GAG	CGAGT	TGTAA	.AAC	GATCT.	TTGTAG	CGA.	AGCTT	GACCG		
ORS206	CGAGT	TGTAA	.AAT	GATC.C	TTTTAG	CGA.	AGCTT	GACCG		
ORS196	CCTCG	TATC	GGGCC	GATCT	TACGA	AAGCAA	GCTGG	TCTTT	CTAGT	CAATG		
ORS199	CCTCG	TATC	GGAAC	GATCT	TACGA	AAGCAA	GCTGG	TCTTT	CTAGT	CAATG		
ORS204	CCTCG	TATC	GGGCC	GATCT	TACGA	AAGCAA	GCTGG	TCTTT	CTAGT	CAATG		
ORS206	CCTCG	TATC	GGAAC	GATCT	TACGA	AAGCAA	GCTGG	TCTTT	CTAGT	CAATG		
ORS196	TCCGG	CTGCG	CAA	.TCGCAT	TCATC	GAGGA	TGCGC	GCCTG	GGACT	TC..G		
ORS199	TCCGG	CTGTG	AGA	ATAGCGT	CCATC	GAGGG	CGCGT	GCCTT	AGAG	ATTT	TCG	
ORS204	TCCGG	CTGCG	C.AAT	CGCAT	TCATC	GAGGA	TGCGC	GCCTG	AGA	..CTT	TCG	
ORS206	TCCGG	CTGTA	CG..	TAGCGT	TCATC	GAGGG	CGCGT	GCCTT	AGAG	ATTT	TCG	
ORS196	GTCTT	TGGGC	AATTG	TGCAG	ACAAC	ATTCT	GCCG	AGTGTG	TGG	ACATT	GAG	
ORS199	GTCTC	TTAGC	AATTCT	TGCAG	ACAAC	ATTCT	GCCG	AGTGTG	TGG	ACATT	GAG	
ORS204	GTCTT	TGGGC	AATTG	TGCAG	ACAAC	ATTCT	GCCG	AGTGTG	TGG	ACATT	GAG	
ORS206	ATCTC	CTGGC	AATCG	TACAG	ACAAC	ATTCT	GCCG	AGTGTG	TGG	ACATT	GAG	
ORS196	TAATG	AGAGC	AATCA	AGTGC	CTTA	AGGGTG	TTCGG	TGGAT	GCCTT	TGGCGC		
ORS199	TAATG	AGAGC	AATCA	AGTGC	CTTA	AGGGTG	TTCGG	TGGAT	GCCTT	TGGCGC		
ORS204	TAATG	AGAGC	AATCA	AGTGC	CTTA	AGGGTG	TTCGG	TGGAT	GCCTT	TGGCGC		
ORS206	TAATG	AGAGC	AATCA	AGTGC	CTTA	AGGGTG	TTCGG	TGGAT	GCCTT	TGGCGC		
ORS196	TGAG	AGGCGA	TGA	AGGACGT	GCTAC	GCTGC	GATA	AAGCCGT	GGGG	AGCTGC		

REFERENCE DES ARTICLES TIRES DE CE TRAVAIL

Sylla SN, Ndoye I, Gueye M, Ba AT, Dreyfus B (2002) Estimates of biological nitrogen fixation by *Pterocarpus lucens* in a semi arid natural forest park in Senegal using ¹⁵N natural abundance method. Afr. J. Biotechnol. 1: 50-56.

Sylla SN, Samba RT, Neyra M, Ndoye I, Giraud E, Willems A, de Lajudie P, Dreyfus B (2002) Phenotypic and genotypic diversity of rhizobia nodulating *Pterocarpus erinaceus* and *P. lucens* in Senegal. System. Appl. Microbiol. 25: 572-583.

Sylla SN, Neyra M, Samba RT, Thiao M, Bâ AM (...) Symbiotic performances and growth of *Pterocarpus erinaceus* influenced by dual inoculation of arbuscular mycorrhizal fungus and rhizobium in low fertility soils. Soumis à Appl. Soil. Ecol.

Auteur : El hadji Samba Ndao SYLLA
Année : 2003
Titre : Thèse de Doctorat d'État ès Sciences (Biologie Végétale)
Sujet : Caractérisation phénotypique et génotypique des rhizobiums, optimisation du potentiel fixateur d'azote et évaluation de la FBA en milieu naturel chez *Pterocarpus erinaceus* (venn) et *P. lucens* au Sénégal.

Résumé :

Cinquante isolats comprenant des rhizobiums à croissance lente et des rhizobiums à croissance rapide nodulant *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens* ont été caractérisés. Parmi ces rhizobiums, des représentants des groupes prédéfinis sur la base de l'analyse numérique des protéines totales bactériennes ont été sélectionnés pour la caractérisation génotypique. Les techniques moléculaires utilisées ont été la PCR-RFLP du gène 16S rDNA, le séquençage du gène 16S rDNA et de l'intergène (IGS) 16S-23S. Les données obtenues ont été comparées entre elles et avec celles disponibles dans GENBANK. Les résultats obtenus ont permis de disposer d'une banque de séquences de gènes 16S et IGS 16S-23S rDNA de rhizobiums isolés de *Pterocarpus*. Les résultats de l'étude de la diversité génotypique des souches de notre collection corroborent ceux obtenus dans les études phénotypiques. L'analyse des séquences de gènes 16S rDNA et de l'IGS 16S-23S rDNA montre de manière très précise la différenciation intra et inter générique des groupes de souches à croissance rapide appartenant aux genres *Rhizobium* et *Mesorhizobium* et celles à croissance lente appartenant au genre *Bradyrhizobium*. Certaines de ces souches à croissance rapide occupent des positions séparées. Les groupes de souches à croissance lente s'identifient soit à l'espèce *Bradyrhizobium elkanii*, soit à l'espèce *Bradyrhizobium japonicum*. Cependant parmi ces souches à croissance lente, il y en a une qui ne s'identifie à aucune des espèces connues du genre *Bradyrhizobium*.

Une expérience a été menée en serre, dans le but de déterminer l'influence de la double inoculation rhizobium et endomycorhize ainsi que l'influence du type de sol sur les performances symbiotiques, la croissance ainsi que la nutrition minérale des jeunes plants de *Pterocarpus erinaceus*. Nous avons également utilisé la technique de marquage moléculaire par PCR-RFLP de l'intergène (IGS) 16S-23S de l'ADN pour mettre en évidence la compétitivité des souches de rhizobiums ayant servi d'inoculum. Les résultats ont montré que l'inoculation simultanée avec des souches effectives de rhizobiums et de champignons endomycorhiziens permettait d'accroître de manière significative les performances symbiotiques des jeunes plants de *P. erinaceus*. Les effets positifs de l'inoculation avec les endophytes sur la croissance et la nutrition des jeunes plants de *P. erinaceus* étaient plus remarquables sur les sols dont les teneurs en N et P sont les plus faibles. La comparaison des profils de restriction enzymatique de l'IGS 16S-23S d'ADN extrait de nodules a révélé la présence de souches de rhizobium natives de certains sols utilisés et qui sont capables d'infecter les plants de *Pterocarpus*. La détermination du % d'occupation des nodules montre que la souche de *Bradyrhizobium* ORS 206 apparaît comme étant la plus compétitive des souches infectant dans les nodules.

Le bilan de l'azote fixé par des plants adultes de *Pterocarpus lucens* a été estimé dans un écosystème naturel, le Ferlo, au Sénégal. La méthode utilisée est celle de l'abondance isotopique naturelle en ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$). Les investigations ont eu lieu dans deux sites qui se distinguent en particulier par les caractéristiques du sol. Des ligneux non fixateurs d'azote que l'on trouve dans les mêmes aires de répartition que *P. lucens* ont servi comme plants de référence. Les résultats ont montré que les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ sont plus élevées chez les plantes de référence que chez *P. lucens*. Par contre, aucune différence significative n'est observée dans les pourcentages de N total mesuré entre ces deux types de plantes. Les calculs du % Ndfa chez *P. lucens* ont donné des taux variant entre 26 et 49%. Ces valeurs relatives varient selon la plante de référence et selon le site. La contribution de l' N_2 dérivé de la FBA chez *P. lucens* atteint 28,9 kg.N/ha et 10,8 kg.N/ha respectivement dans les sols ferrugineux et dans les sols sableux.

Mots clés : *Pterocarpus*, PCR-RFLP, Séquençage, Nodulation, Mycorhization, Traçage isotopique naturel ^{15}N , Fixation biologique de l'azote, Compétitivité des rhizobiums.