
N° d'ordre : 2298

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

Ibtissam EL-HILALI

Discipline : Biologie

Spécialité : Microbiologie et Biologie Moléculaire

**LA SYMBIOSE RHIZOBIUM-LUPIN :
BIODIVERSITÉ DES MICROSymbIOTES
ET MISE EN EVIDENCE D'UNE MULTI-INFECTIOn
NODULAIRE chez LUPINUS LUTEUS**

Soutenue le 25 / 03 / 2006

Devant le jury :

Mr. Abdelkarim FILALI-MALTOUF

Professeur, Faculté des Sciences, Rabat

Président

Mme Fatiha BRHADA

Professeur, Faculté des Sciences, Rabat

Mr. Bernard DREYFUS

Directeur de recherche, IRD, Montpellier, France

Mme Imane THAMI-ALAMI

Directeur de recherche, INRA, Rabat

Mr. Chaouki AL FAIZ

Directeur de recherche, INRA, Rabat

Examineurs

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

Ibtissam EL-HILALI

Discipline : Biologie

Spécialité : Microbiologie et Biologie Moléculaire

UFR : SV 02/98

Responsable de l'UFR : Professeur Abdelkarim Filali Maltouf

Période d'accréditation : 1998/2006

Titre de la thèse : La symbiose Rhizobium – Lupin : Biodiversité des Microsymbiotes et mise en évidence d'une Multi-Infection Nodulaire chez *Lupinus luteus*

RESUME

Ce travail a été réalisé afin d'évaluer la diversité génétique et phénotypique qui existe au sein d'une collection de cent cinquante neuf symbiotes isolés à partir des nodosités de six espèces de lupin issues de différentes régions du Maroc.

La PCR/REP a révélé un grand niveau de polymorphisme moléculaire entre les isolats. Cette technique nous a permis de mettre en évidence la possibilité d'une infection multiple chez *Lupinus luteus*.

Toutes les souches sont infectives vis-à-vis de *L. luteus*. L'efficacité relative, comprise entre 60% et 80%, s'est révélée plus importante avec les symbiotes isolés des espèces sauvages.

La croissance rapide des souches ainsi que l'assimilation des substrats carbonés a révélé des profils comparables à ceux du *Rhizobium*. A l'opposé, elles se sont révélées, comme les *Bradyrhizobium*, très résistantes aux métaux lourds et aux antibiotiques.

Une large tolérance au NaCl, au pH et à la température a été notée pour l'ensemble de la collection. La moitié des souches ont pu hydrolyser l'urée et réduire le nitrate.

L'ARDRA a révélé une grande diversité entre les souches et a confirmé la distinction du genre *Bradyrhizobium*.

Nous avons pu repérer, sur la base du potentiel fixateur d'azote et la tolérance à l'alcalinité, des candidats très performants qui ont été utilisés pour des inoculations au champ.

Mots-clefs : *Lupinus* – rhizobium – Biodiversité – REP – ARDRA

N° d'ordre : 2298

UNIVERSITE MOHAMMED V - AGDAL
FACULTE DES SCIENCES
RABAT

THESE

Présentée par :

Ibtissam EL-HILALI

Pour l'obtention du DOCTORAT
Spécialité : Microbiologie et Biologie Moléculaire

**LA SYMBIOSE RHIZOBIUM-LUPIN :
BIODIVERSITÉ DES MICROSOMBIOTES
ET MISE EN EVIDENCE D'UNE MULTI-INFECTION
NODULAIRE chez *LUPINUS LUTEUS***

Soutenue le 25 / 03 / 2006
Devant la commission d'examen :

Mr. Abdelkarim FILALI-MALTOUF

Professeur, Faculté des Sciences, Rabat

Président

Mme Fatiha BRHADA

Professeur, Faculté des Sciences, Rabat

Mr. Bernard DREYFUS

Directeur de recherche, IRD, Montpellier, France

Mme Imane THAMI-ALAMI

Directeur de recherche, INRA, Rabat

Mr. Chaouki AL FAIZ

Directeur de recherche, INRA, Rabat

Examineurs

PREAMBULE

Le travail présenté ici a été réalisé dans le laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire à la Faculté des Sciences, Université Mohammed V - Agdal à Rabat, en collaboration avec l'unité de recherche « Amélioration, Conservation et Valorisation des Ressources Génétiques » à l'INRA de Rabat.

Ce travail a bénéficié du soutien financier dans le cadre du :

- Projet PROTARS N° P5T2/13 (Valorisation de la culture du lupin dans les sols calco-alcalins du Maroc par l'exploitation du potentiel fixateur d'azote de la symbiose *Bradyrhizobium* - lupin).
- Projet AIRE développement/I.R.D. 01-2-MAR-28-1.

Il a été primé lors de manifestations scientifiques nationale et internationale.

Publications

↳ **EL HILALI I., BRHADA F., THAMI ALAMI I. AND FILALI-MALTOUF A. 2003.** Characterization of *Lupinus* rhizobia isolated from Moroccan soils. In “Lupin-high protein plant of XXI century”, Sciences Academy of Wroclaw, Pologne N° 495.

↳ **EL HILALI I., BRHADA F., THAMI ALAMI I. AND FILALI-MALTOUF A.** Etude de la variabilité moléculaire et phénotypique de rhizobia isolés d'un même amas nodulaire de *Lupinus luteus*. Proceedings of the Symposium «Applications Biotechnologiques de la Fixation Symbiotique de l'Azote», Hammamet, Tunisie, Décembre 2002 INRST -Tunisie (sous press).

↳ **EL HILALI I., BRHADA F., THAMI ALAMI I. AND FILALI-MALTOUF A. 2005.** Evidence of the presence of genetically different rhizobial strains in one root nodule of lupine. Journal of Agronomy (Soumis).

Communications orales

◆ **EL HILALI I., BRHADA F., THAMI ALAMI I. AND FILALI-MALTOUF A.** Analyse physiologique et moléculaire des symbiotes du lupin. 3^{ème} Congrès National de Biologie et Biologie Moléculaire. Tanger, Maroc, 18-20 Décembre 2003.

◆ **EL HILALI I., BRHADA F., THAMI ALAMI I. AND FILALI-MALTOUF A.** Caractérisation phénotypique et moléculaire des rhizobia nodulant le lupin au Maroc. 1^{ère} Rencontre du Pôle de Compétence *MiSoBioP*. Fès, Maroc, 10-11 Décembre 2004.

Communications dans les Colloques, Séminaires et Congrès

A l'échelle internationale

↳ **EL HILALI I., BRHADA F., THAMI ALAMI I. AND FILALI-MALTOUF A. 2002.** Characterization of rhizobia from one nodule obtained from *Lupinus luteus* cultivated in north Morocco. Presented in the 5th European Nitrogen Fixation Conference, organised by Norwich University, Norwich, Angleterre.

↳ **EL HILALI I., BRHADA F., THAMI ALAMI I. AND FILALI-MALTOUF A. 2002.** Caractérisation phénotypique et moléculaire de souches de *Bradyrhizobium* nodulant le lupin au Maroc, présenté aux 8^{èmes} Journées Scientifiques du Réseau « Biotechnologies, Amélioration des plantes et Sécurité Alimentaire », organisées par l'Agence Universitaire de la Francophonie, Octobre 2002, Marrakech.

↳ **EL HILALI I., BRHADA F., THAMI ALAMI I. AND FILALI-MALTOUF A. 2003.** Characterization of *Lupinus* rhizobia isolated from Moroccan soils, presented in the Conference “Lupin-high protein plant of XXI century.”, organised by the Polish Lupine Association, Kudowa-Zdroj, Pologne.

↳ **EL HILALI I., BRHADA F., THAMI ALAMI I. ET FILALI-MALTOUF A. 2004.** Diversity of indigenous rhizobia nodulating *Lupinus* spp. in Morocco, Presented in the 6th European Nitrogen Fixation Conference, Toulouse, France.

A l'échelle nationale

↳ **EL HILALI I., BRHADA F., THAMI ALAMI I. ET FILALI-MALTOUF A. 2003.** Etude de la diversité génétique et phénotypique d'une collection marocaine de rhizobium nodulant le lupin 3^{ème} Congrès National de Génétique et Biologie Moléculaire. Décembre 2003, Tanger.

↳ **EL HILALI I., BRHADA F., THAMI ALAMI I. ET FILALI-MALTOUF A. 2004.** Caractérisation phénotypique et moléculaire de rhizobia nodulant le lupin au Maroc. Projet fédérateur - Axe lupin. Première rencontre Nationale du Pôle de Compétences en Microbiologie des Sols et Biotechnologie des Plantes, Communication orale, Décembre 2004, Fès.

↳ **EL HILALI I., BRHADA F., THAMI ALAMI I. ET FILALI-MALTOUF A. 2004.** Séminaire International : le développement des cultures fourragères : une nécessité pour améliorer les productions animales et atténuer la dégradation des ressources naturelles, Mars 2004, INRA, Rabat.

Prix reçus

★ Prix du meilleur poster. 5th European Nitrogen Fixation Congress. Norwich, Angleterre, 6 - 10 Septembre 2002.

★ Prix du meilleur poster et de communication orale. 3^{ème} Congrès National de Biologie et Biologie Moléculaire. Tanger, Maroc, 18 - 20 Décembre 2003.

AVANT-PROPOS

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés dans le Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire à la Faculté des Sciences, Université Mohammed V - Agdal à Rabat.

Au terme de ce travail, j'aimerais exprimer mon profond remerciement à mon professeur Fatiha Brhada, Professeur à la Faculté des sciences de Rabat, pour le grand honneur qu'elle m'a fait en acceptant de diriger ce travail, pour ses recommandations et ses discussions perspicaces ainsi que pour ses conseils qui ont beaucoup enrichi non seulement ma recherche au sein du laboratoire mais également différents aspects de ma vie.

Mon appréciation et ma gratitude vont aussi à mon professeur Abdelkarim Filali-Maltouf, Chef du Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire à la Faculté des sciences de Rabat, pour avoir accepté de présider ce jury mais surtout pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire, pour avoir cru en moi, pour ses encouragements et pour son implication et les conseils scientifiques qu'il m'a accordés.

Ma gratitude va à Mme Imane Thami-Alami, Directeur de recherche et Chef du Centre Régional de la Recherche Agronomique à Rabat, pour avoir accepté de juger ce travail, pour ces vifs encouragements et pour son amitié.

Ma gratitude va à Mr Chaouki El Faiz, Directeur de recherche et Coordinateur de l'Unité de Recherche « Amélioration, Conservation et Valorisation des Ressources Génétiques » à l'Institut National de Recherche Agronomique de Rabat, pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse et pour son amabilité.

Je suis très reconnaissante à Mr Bernard Dreyfus, Directeur de recherche (DR 1) et Directeur d'UMR à l'Institut National de Recherche pour le Développement (IRD) Montpellier, France, pour avoir accepté aimablement de juger ce travail et de participer au jury de cette thèse.

Je tiens à remercier également les professeurs El Bekkay Berraho, Jamal Aurag, Bouchra Belkadi, Ilham Bouhmouch et Jamila Maâtallah pour leur sympathie et leurs encouragements, ainsi que toutes les amies au sein du laboratoire LMBM et toutes celles que j'y ai rencontré : Najlae Elâafi, Farah Ait Ouhmane, Salwa Moussaid, Loubna Temsamani, Nargisse Bennani,

Siham Brhada, Bouchra Mouhcine, Nezha Mlajji, Amina Sorouri, Laila Medraoui, Leila Sbabou et Fatiha El Maghi.

Je remercie également tous (es) les amis (es) que j'ai rencontré à l'INRA de Rabat et au CNESTEN.

Mes vifs remerciements reviennent à Jamaledine El Jamali et Ibrahim Konaté pour être de très bons amis et pour avoir été là à chaque fois que j'avais besoin d'eux.

Mes très spéciaux remerciements reviennent à mes très chères amies : Lamiae Filali, Amal Berkia, Amine Bradley et Emame Michèle Majdoline pour tous les moments partagés ensemble, pour leurs soutiens et leurs mots encourageants et pour leur amitié sincère.

Finalement, mon plus grand merci revient à ma mère Amina Jad et à mon père Houssine El Hilali et à toute ma grande famille pour le pouvoir de leur amour sur moi, pour être leur fierté, et pour me faire sentir d'être si spéciale pour eux.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide deoxyribonucléique
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
Ap-PCR	Arbitrarily primed PCR
ARDRA	Amplified ribosomal DNA restriction analysis
ARNt	ARN de transfert
BSA	Sérum Albumine Bovine

BTB	Bleu de bromothymol
bv	Biovar
CEC	Capacité d'échange cationique
DAF	DNA amplification fingerprinting
dNTP	Désoxyribonucléotides triphosphate
DO	Densité optique
EDTA	Acide éthylènediaminotétraacétique
EPS	Exopolysaccharides
ER	Efficience relative
ERIC	Enteric Repetitive Intergenic Consensus
FAME	Fatty Acid Methyl Electrophoresis
G+C	Guanine + Cytosine
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
HCl	Acide chlorhydrique
HgCl ₂	Chlorure mercurique
<i>hsn</i>	Gènes de la spécificité de l'hôte
IGS	Espace intergènique
ITCF	Institut Technique des Céréales et des Fourrages
ITS	Espace intergènique transcrit
K ₂ O	Oxyde de potassium
KCl	Chlorure de potassium
KNO ₃	Nitrate de potassium
LCO	oligosaccharide de Lipo-chitine
LPS	Lipopolysaccharide
LSU	Grande sous unité
M	Molaire
MES	2- (N-morpholino)-ethanesulfonic acid
MgCl ₂	Chlorure de Magnésium
min.	Minutes
MLEE	Multilocus enzyme electrophoresis
mm – cm -- m	Millimètre – centimètre– mètre
MO	Matière organique
N ₂	Nitrogène
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NH ₃	Nitrate
<i>nod</i>	Gènes de nodulation
P ₂ O ₅	Super oxyde de phosphore
pb	Paire de base
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
ppm	Partie pour millions
pSym	Plasmide symbiotique
RAPD	ADN amplifié de manière aléatoire
REP	Séquence répétitive extragènique palindromique
RFLP	Polymorphisme de la longueur des fragments de restriction
RNA	Acide ribonucléique
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrilamide gel electrophoresis
SSU	Petite sous unité

TBE	Tris – Acide borique – EDTA
TY	Tryptone Yeast Extract
UPGMA	Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean
USDA	United States Department of Agriculture
v/v	Volume par volume
w/v	Poids par volume
YEM	Yeast Extract Mannitol

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Réduction de l'azote moléculaire et conversion du NH_3 en formes d'acides aminés assimilés par la plante 14
- Figure 2 :** Organisation de l'opéron de l'ADN ribosomique observé chez les procaryotes 34
- Figure 3 :** Résolution taxonomique des différentes techniques utilisées pour l'étude de la diversité des rhizobiums 41

Figure 4 :	Arbre phylogénétique des rhizobiums et des espèces apparentées construite par la méthode du neighbor joining à partir de la séquence complète de l'ADNr 16S	44
Figure 5 :	Position géographique des zones de prospection	58
Figure 6 :	Extraction de l'ADN génomique par la méthode de la lyse alcaline	69
Figure 7 :	Electrophorèse des amplifiats obtenus par PCR/REP de quelques souches nodulant le lupin	69
Figure 8 :	Dendrogramme résultant de l'analyse par PCR/REP des souches nodulant le lupin	71
Figure 9 :	Coupe longitudinale de l'amas nodulaire	74
Figure 10 :	Electrophorèse des amplifiats obtenus par PCR/REP des souches de l'amas nodulaire	76
Figure 11 :	Dendrogramme résultant de l'analyse par PCR/REP des 14 souches de l'amas nodulaire	76
Figure 12 :	Photo indiquant des plantes de <i>Lupinus luteus</i> inoculées comparées au control négatif et au control fertilisé par du KNO ₃	83
Figure 13 :	Forme de nodosités obtenues sur <i>Lupinus luteus</i> inoculé par la souche MSMC 5419 (A) et la souche INRA L23 (B)	85
Figure 14 :	Infectivité des souches nodulant le lupin évaluée sur <i>L. luteus</i>	86
Figure 15 :	Efficiencie relative des souches nodulant le lupin évaluée huit semaines après l'inoculation des plantes	86
Figure 16 :	Croissance des souches nodulant le lupin évaluée dans le milieu YEM	91
Figure 17 :	Assimilation de différents substrats carbonés par les souches nodulant le lupin	94

-
- Figure 18 :** Dendrogramme indiquant les affinités d'assimilation entre les souches nodulant le lupin 97
- Figure 19 :** Effet des antibiotiques sur la croissance des souches nodulant le lupin 102
- Figure 20 :** Effet des métaux lourds sur la croissance des souches nodulant le lupin 108
- Figure 21 :** Tolérance des souches de lupin à différentes concentrations en NaCl 112
- Figure 22 :** Tolérance aux pH des souches nodulant le lupin 119
- Figure 23 :** Tolérance des souches nodulant le lupin à différentes températures 122
- Figure 24 :** Phénogramme indiquant les similarités phénotypiques entre les souches nodulant le lupin issues de différentes régions du Maroc sur la base de l'analyse numérique 127
- Figure 25 :** Profil de la bande de l'ADNr 16S de quelques souches nodulant le lupin 138
- Figure 26 :** Profils électrophorétiques de la restriction par RFLP de l'ADNr 16S obtenus pour quelques souches de références après la digestion par les endonucléases *HhaI* (A), *MspI* (B), *HinfI* (C) et *TaqI* (D) 138
- Figure 27 :** Profils électrophorétiques de la restriction par RFLP de l'ADNr 16S obtenus pour quelques souches de l'amas nodulaire après la digestion par les endonucléases *HhaI* (A), *MspI* (B), *HinfI* (C) et *TaqI* (D) 140
- Figure 28 :** Profils électrophorétiques de la restriction par RFLP de l'ADNr 16S obtenus pour quelques souches nodulant le lupin après la digestion par les endonucléases *HhaI* (A), *MspI* (B), *HinfI* (C) et *TaqI* (D) 141
- Figure 29 :** Dendrogramme construit par UPGMA indiquant la position phylogénétique des souches de références utilisées sur la base de la PCR/RFLP de l'ADNr 16S 147
- Figure 30 :** Dendrogramme construit par UPGMA indiquant la position phylogénétique des souches nodulant le lupin et des souches de références sur la base de la PCR/RFLP de l'ADNr 16S 149

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Classification actuelle des différentes espèces de rhizobia	47
Tableau 2 :	Liste des différents sites géographiques de prélèvement	58
Tableau 3 :	Analyse minérale et granulométrique des sols collectés	59
Tableau 4 :	Nombre des isolats obtenus à partir de chaque espèce de lupin et dans chaque site	62
Tableau 5 :	Nombre des isolats obtenus à partir de chaque espèce de lupin selon les prospections menées par l'INRA de Rabat	63
Tableau 6 :	Liste des souches sélectionnées à partir des différents clusters délimités par l'analyse PCR/REP	73
Tableau 7 :	Temps de génération des souches nodulant le lupin et pH final du milieu de culture	89
Tableau 8 :	Réaction des souches nodulant le lupin sur le milieu YEM+BTB	93
Tableau 9 :	Pourcentage d'assimilation de différents types de carbohydrates par les souches nodulant le lupin	95
Tableau 10:	Hydrolyse de l'urée et réduction du nitrate par les souches nodulant le lupin	99
Tableau 11 :	Résistance intrinsèque des souches nodulant le lupin à différents types d'antibiotiques	103
Tableau 12 :	Résistance intrinsèque des souches nodulant le lupin aux métaux lourds	106
Tableau 13 :	Marge de tolérance des rhizobia nodulant le lupin au NaCl, au pH et à la	113

température

Tableau 14 :	Souches sélectionnées pour les inoculations	123
Tableau 15 :	Résultats des tests phénotypiques différenciant entre les souches nodulant le lupin des différents clusters formés par l'analyse UPGMA	125
Tableau 16 :	Liste des souches de références utilisées	132
Tableau 17 :	Séquences des deux amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNr 16S	135
Tableau 18 :	Tableau indiquant le site de clivage de la séquence nucléotidique spécifique reconnue par les quatre enzymes de restriction utilisées	137
Tableau 19 :	Groupes de ribotypes des souches de références utilisées déterminés par l'analyse PCR/RFLP du gène de l'ADNr 16S	143
Tableau 20 :	Groupes ribotypes des souches nodulant le lupin déterminés par l'analyse PCR/RFLP du gène de l'ADNr 16S	144
Tableau 21 :	Groupes de souches nodulant le lupin formant les différents clusters délimités par la PCR/RFLP du gène de l'ADNr 16S par rapport à la plante et la région d'origine.	150

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 :	Paramètres climatiques des sites échantillonnés	190
Annexe 2 :	Composition du milieu YEM	191
Annexe 3 :	Coloration de Gram	191
Annexe 4 :	Composition du milieu ½ TY	192
Annexe 5 :	Préparation des solutions du tampon de lyse	192
Annexe 6 :	Composition du tampon TE	192
Annexe 7 :	Composition du tampon de charge	193
Annexe 8 :	Composition du tampon TBE	193
Annexe 9 :	Préparation du Bromure d’Ethidium	193
Annexe 10 :	Composition de la solution nutritive sans azote	194
Annexe 11 :	Préparation de la solution du BTB	194
Annexe 12 :	Méthode de préparation des solutions d’antibiotiques et leur mode d’action	195

- Annexe 13 :** Profil d'assimilation de 49 substrats carbonés par les souches nodulant le lupin 196
- Annexe 14 :** Tolérance des rhizobia nodulant le lupin à différentes concentrations du NaCl. 202

RESUME

Ce travail a été réalisé afin d'évaluer la diversité génétique et phénotypique qui existe au sein d'une collection de cent cinquante neuf symbiotes isolés à partir des nodosités de six espèces de lupin issues de différentes régions du Maroc.

La PCR/REP a révélé un grand niveau de polymorphisme moléculaire entre les isolats. Cette technique nous a permis de mettre en évidence la possibilité d'une infection multiple chez *Lupinus luteus*.

Toutes les souches sont infectives vis-à-vis de *L. luteus*. L'efficacité relative, comprise entre 60% et 80%, s'est révélée plus importante avec les symbiotes isolés des espèces sauvages.

La croissance rapide des souches ainsi que l'assimilation des substrats carbonés a révélé des profils comparables à ceux du *Rhizobium*. A l'opposé, elles se sont révélées, comme les *Bradyrhizobium*, très résistantes aux métaux lourds et aux antibiotiques.

Une large tolérance au NaCl, au pH et à la température a été notée pour l'ensemble de la collection. La moitié des souches ont pu hydrolyser l'urée et réduire le nitrate.

L'ARDRA a révélé une grande diversité entre les souches et a confirmé la distinction du genre *Bradyrhizobium*.

Nous avons pu repérer, sur la base du potentiel fixateur d'azote et la tolérance à l'alcalinité, des candidats très performants qui ont été utilisés pour des inoculations au champ.

Mots clés: *Lupinus* – rhizobium – Biodiversité – REP – ARDRA

SUMMARY

This study was made to assess the genetical and phenotypical diversity of one hundred and fifty nine symbiotes isolated from six *Lupinus* species harvested in different geographical regions of Morocco.

The REP/PCR method revealed a high polymorphism among the isolates. It helped to identify a multiple infection process of *Lupinus luteus*.

Symbiotic data indicated that all strains were infective with *L. luteus*. Relative efficiency ranging between 60% and 80% was higher with symbiotes isolated from the wild species.

The fast growth rate of the strains and their carbohydrates assimilation results showed profiles similar to those of *Rhizobium*. However, they were highly resistant to heavy metals and antibiotics like *Bradyrhizobium*.

The whole bacterial collection showed a wide range of tolerance to NaCl, pH and temperature. Half of the strains were scored to have a positive reaction for urea hydrolysis and nitrate reduction.

ARDRA analyses indicated a great diversity among the strains and confirmed that they were distinct from the genus *Bradyrhizobium*.

We were able, on the basis of the nitrogen fixing potential and the tolerance to alkalinity, to recover useful candidates for field inoculations.

Keywords: *Lupinus* – rhizobium – Biodiversity – REP – ARDRA

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	6
CHAPITRE 1 - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	9
1 – APERÇU GENERAL SUR LE PROCESSUS DE LA SYMBIOSE	9
1. 1 – Mécanismes et spécificité de la reconnaissance symbiotique	9
1. 2 – Initiation et développement nodulaire	12
2- SYMBIOSE LUPIN - RHIZOBIUM	16
2.1 – Aperçu général sur la Plante	16
2. 1. 1- Taxonomie et caractéristiques du genre <i>Lupinus</i>	16
2. 1. 2- Le lupin au Maroc	18
2. 1. 2. 1- <i>Caractéristiques botaniques</i>	18
2. 1. 2. 2- <i>Ecologie</i>	18
2. 1. 2. 3- <i>Exploitation</i>	19
2. 2 - Aperçu général sur le partenaire microbien	20
3 - BIODIVERSITE DES RHIZOBIUMS	21
3. 1 – Méthodes d'étude de la diversité	22
3. 1. 1 – Les marqueurs phénotypiques	22
3. 1. 1. 1 - <i>La croissance</i>	22
3. 1. 1. 2 - <i>Les critères symbiotiques</i>	23
3. 1. 1. 3 - <i>Utilisation des sources de carbone</i>	24
3. 1. 1. 4 - <i>Tolérance à la salinité</i>	25
3. 1. 1. 5 - <i>Tolérance au pH</i>	26

<i>3. 1. 1. 6 - Tolérance à la température</i>	27
<i>3. 1. 1. 7 - Résistance intrinsèque aux antibiotiques</i>	28
<i>3. 1. 1. 8 - Résistance intrinsèque aux métaux lourds</i>	29
3. 1. 2 - Les marqueurs moléculaires	30
<i>3. 1. 2. 1 – Le pourcentage en nucléotides G+C</i>	30
<i>3. 1. 2. 2 – Le polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP)</i>	30
<i>3. 1. 2. 3 – L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE)</i>	31
<i>3. 1. 2. 4 – Méthodes utilisant des amorces aléatoires (RAPD – AP-PCR – DAF)</i>	31
<i>3. 1. 2. 5 – Le polymorphisme de la longueur des fragments amplifiés (AFLP)</i>	32
<i>3. 1. 2. 6 - Les séquences répétitives (REP, ERIC et BOX)</i>	32
<i>3. 1. 2. 7 - Les gènes ribosomiques</i>	33
<i>3. 1. 2. 8 - Les gènes symbiotiques</i>	35
<i>3. 1. 2. 8. 1 - Les gènes <i>nif</i></i>	35
<i>3. 1. 2. 8. 2 - Les gènes <i>nod</i></i>	35
<i>3. 1. 2. 9 - Le séquençage</i>	36
<i>3. 1. 2. 10 - L'hybridation des acides nucléiques</i>	37
<i>3. 1. 2. 11 - Les plasmides</i>	37
3. 1. 3 - Autres marqueurs	38
<i>3. 1. 3. 1 - Analyse des protéines cellulaires totales par SDS-PAGE</i>	38
<i>3. 1. 3. 2 – Le polymorphisme enzymatique (MLEE)</i>	38
<i>3. 1. 3. 3 - Analyse des acides gras</i>	39
<i>3. 1. 3. 4 - La sérologie</i>	39
3. 1. 4 – Etude polyphasique	40
4 – TAXONOMIE ET PHYLOGENIE DES RHIZOBIUMS	40
4. 1 – Taxonomie ou systématique des rhizobiums	40
4. 2 – Phylogénie des rhizobiums	43

4. 3 – Classification actuelle des rhizobiums	46
4. 3. 1 – <i>Allorhizobium</i>	46
4. 3. 2 – <i>Azorhizobium</i>	46
4. 3. 3 – <i>Bradyrhizobium</i>	49
4. 3. 4 – <i>Mésorhizobium</i>	50
4. 3. 5 – <i>Rhizobium</i>	51
4. 3. 6 – <i>Sinorhizobium</i>	52
4. 3. 7 – Cas particulier du genre <i>Agrobacterium</i>	53
4. 4 – Taxonomie des souches nodulant le genre <i>Lupinus</i>	54
CHAPITRE 2 - CONSTITUTION D'UNE COLLECTION DE RHIZOBIA NODULANT LE LUPIN ET EVALUATION DE SA DIVERSITE GENETIQUE PAR PCR/REP	56
1 - Introduction	56
2 - Constitution d'une collection de rhizobia nodulant le lupin	57
2. 1 – Site de collecte et analyse des échantillons de sol	57
2. 2 – Constitution d'une collection de rhizobia	61
2. 2. 1 – Isolement et purification des rhizobia	61
2. 2. 2 – Authentification des isolats	64
2. 2. 2. 1 – <i>Germination aseptique des graines</i>	64
2. 2. 2. 2 – <i>Culture et inoculation des plantules de lupin</i>	65
2. 2. 3 – Stockage et nomenclature des isolats	65
3 – Evaluation de la diversité génétique des souches de la collection par PCR/REP	66
3. 1 – Matériels et méthodes	66
3. 1. 1 – Souches bactériennes et milieu de culture	66
3. 1. 2 – Extraction de l'ADN génomique	66

3. 1. 3 – Amplification par PCR des séquences répétitives	67
3. 1. 4 – Analyse des données	68
3. 2 – Résultats et discussion	68
3. 2. 1 – Qualité de l'ADN	68
3. 2. 2 – Diversité génétique révélée par PCR/REP	68
3. 2. 3 – Cas particulier de l'amas nodulaire	72
CHAPITRE 3 – CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES RHIZOBIA NODULANT LE LUPIN	78
1 - INTRODUCTION	78
2 - MATERIELS ET METHODES	79
2. 1 – Evaluation des paramètres symbiotiques	79
2. 2 – Temps de génération sur YEM liquide	80
2. 3 – Test du bleu de bromothymol (BTB)	80
2. 4 – Utilisation des substrats carbonés	80
2. 5 – Hydrolyse de l'urée	81
2. 6 – Réduction du nitrate	81
2. 7 – Résistance intrinsèque aux antibiotiques	81
2. 8 – Résistance intrinsèque aux métaux lourds	82
2. 9 – Tolérance à la salinité	82
2. 10 – Tolérance au pH	82
2. 11 – Tolérance à la température	84
2. 12 – Analyse des données	84
3 – Résultats et discussion	84
3. 1 – Caractérisation Symbiotique	84
3. 2 – Croissance sur le milieu YEM	90

3. 3 – Test du bleu de bromothymol (BTB)	92
3. 4 – Utilisation des substrats carbonés	96
3. 5 – Hydrolyse de l'urée et réduction du nitrate	100
3. 6 – Résistance intrinsèque aux antibiotiques	101
3. 7 – Résistance intrinsèque aux métaux lourds	105
3. 8 – Tolérance à la salinité	111
3. 9 – Tolérance au pH	117
3. 10 – Tolérance à la température	120
3. 11 – Analyse numérique	124
CHAPITRE 4 – CARACTERISATION MOLECULAIRE DES SOUCHES PAR PCR/RFLP DE L'ADNr 16S	131
1 - INTRODUCTION	131
2 - MATERIELS ET METHODES	133
2. 1 – Souches bactériennes et milieu de culture	133
2. 2 – Méthodes d'extraction de l'ADN	133
2. 3 – Amplification par PCR de l'ADNr 16S	134
2. 4 – Digestion des produits de l'amplification par les enzymes de restriction	135
2. 5 – Analyse des données	136
3 – RESULTATS	137
3. 1 – Amplification par PCR de l'ADNr 16S	137
3. 2 – Analyse par PCR / RFLP de l'ADNr 16S	137
3. 3 – Ribotypes déterminés par PCR / RFLP de l'ADNr 16S	142
3. 4 – Etudes des groupements phylétiques établis par l'analyse UPGMA	146
4 – DISCUSSION	151
CONCLUSION GENERALE et PERSPECTIVES	153

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	158
ANNEXES	190

Le sol constitue un support pour différents cycles d'échanges d'énergie et de transfert de substances entre les différentes entités qui l'abritent. Un des cycles les plus importants est le cycle de l'azote. La fixation biologique de l'azote (N_2) s'est généralement concentrée sur le système symbiotique entre les légumineuses et les rhizobiums, parce que ces associations ont le plus grand impact quantitatif sur ce cycle. Il existe approximativement 700 genres et 13000 espèces de légumineuses mais seule une portion de 20% qui constitue les légumineuses d'importance agricole a été étudiée.

En plus du rôle que les légumineuses jouent dans l'agriculture, l'économie et dans les balances alimentaires de nombreuses populations humaines, elles sont aussi très importantes écologiquement vu qu'elles sont responsables pour une partie substantielle de la conversion du flux global de l'azote atmosphérique en forme fixe tel que l'azote ammoniacal qui est à son tour converti en composés organiques assimilables. La réduction de l'azote est réalisée généralement au niveau des racines des plantes dans des organes spécialisés appelées nodosités. Le processus de la fixation symbiotique d'azote aide la plante à survivre et à rivaliser efficacement sur les sols pauvres en azote. En retour, les bactéries tirent profit de l'interaction symbiotique en obtenant des hydrates de carbone produits par la plante pendant la photosynthèse.

Dans l'interaction plante – rhizobium, on note un haut degré de spécificité. Une légumineuse entre en symbiose avec un nombre limité d'espèces de rhizobium. En revanche, certains microsymbiotes s'associent avec plusieurs partenaires alors que d'autres ont une gamme d'hôtes étroite. Cette spécificité est basée sur une communication moléculaire entre les deux partenaires symbiotiques (Pawlowski et Bisseling, 1996). De ce fait, l'introduction d'inoculums n'a souvent été d'aucun effet sur l'augmentation du rendement de certaines cultures de légumineuses à cause de la grande compétitivité avec les souches des rhizobia indigènes. Ces derniers représentent donc un réservoir important dans un environnement donné grâce à la résistance qu'ils ont développé au fil du temps pour survivre et persister. Ainsi, l'exploitation effective de la fixation symbiotique de l'azote pour l'amélioration de la production agricole exige non seulement la sélection du meilleur cultivar hôte mais exige également que la population des rhizobia natifs soit correctement et suffisamment caractérisée.

Sur le plan pratique, la sélection d'un couple plante hôte et son rhizobium approprié dépend également du milieu édaphique. Ce dernier subit une série d'irrégularités selon l'intensité et la nature des cultures, l'environnement géographique et les conditions du sol. Les contraintes environnementales les plus importantes sont les suivantes : la salinité, les pH extrêmes, le taux de nitrate dans le sol et l'humidité insuffisante ou excessive du sol.

D'autres facteurs peuvent influencer la fixation symbiotique d'une façon bien marquée telles que les composantes biotiques du milieu (biocide, photosynthèse inadéquate de la plante hôte), la pression humaine (augmentation de la charge ionique des sols par l'apport d'engrais dans les systèmes d'agriculture intense) et les facteurs climatiques. Il s'avère donc nécessaire d'évaluer les facteurs environnementaux afin que le couple symbiotique sélectionné possède les aptitudes nécessaires qui lui permettent de s'établir dans un type de sol donné et de répondre aux exigences définies.

Des facteurs climatiques défavorables, une utilisation intensive des terres ainsi que des pratiques agricoles inadéquates peuvent aboutir à la dégradation des écosystèmes naturels et à l'accroissement des terres marginales. Les associations rhizobiums-légumineuses ont une application potentielle dans la restauration des terres dégradées en régénérant et en maintenant leur fertilité. De ce fait et pour limiter également l'érosion génétique massive d'un certain nombre d'espèces et/ou d'écotypes, des stratégies de protection des plantes spontanées et des bactéries associées doivent être entreprises via des programmes de conservation *in-* et *ex-situ*. L'exploitation de la diversité naturelle des légumineuses et la constitution de collections de souches de rhizobia indigènes pourraient donc contribuer à la revalorisation de la culture de ces légumineuses et à la réinstallation par la suite du couvert végétal sur des sols dégradés.

Les lupins sont des légumineuses fourragères utilisées communément comme engrais vert naturel. Ils sont également utilisés pour l'alimentation humaine et animale. En fait, les lupins possèdent un taux élevé en protéines de l'ordre de 40% contre 36% pour le soja (Guillemand, 1999). Les plantes ainsi que les graines sont d'une grande richesse en matières azotées. La teneur en matières azotées digestibles (MAD) de lupin est évaluée à 299g par kilogramme de matière sèche de plantes et la teneur en matières azotées totales (MAT) est évaluée à 340g/Kg (Pointereau, 2001). Les lupins jouent aussi un rôle important dans l'amélioration de la fertilité du sol. Le potentiel de fixation d'azote évalué pour *L. luteus* varie de 145 à 208 kg ha⁻¹ année⁻¹ et le taux d'azote résiduel dans le sol après la culture est évalué entre 40 à 75 kg ha⁻¹ année⁻¹ (Annon.).

Il a été rapporté que la culture du lupin fut introduite au Maroc vers les années trente (Foury, 1954). Cependant, ce n'est que récemment que des études précises ont été établies pour évaluer la biodiversité des différents écotypes spontanés ou introduits (Thami Alami et Bounejmate, 1997 ; El Mzouri et Thami Alami, 2000 ; Thami Alami et al., 2004). Cette biodiversité est d'autant plus importante que les ressources naturelles sont indispensables pour l'amélioration potentielle des plantes cultivées. Cependant, l'étude de la biodiversité des populations des micro-organismes symbiotiques autochtones reste nécessaire pour toute sélection de couples symbiotiques performants ou de leur introduction dans un nouvel environnement.

La présente étude porte en priorité sur l'évaluation de la biodiversité des micro-organismes symbiotiques nodulant les lupins au Maroc. Le programme fait partie d'un projet de coopération technique entre la faculté des sciences et l'INRA de Rabat. L'objectif du projet consiste en la conservation des différentes espèces de lupin rencontrées au Maroc via le stockage des semences et des bactéries fixatrices d'azote existant au niveau des nodosités racinaires et dans la rhizosphère, l'étude de la biodiversité des deux partenaires symbiotiques et la sélection de souches bactériennes et de plantes adaptées aux conditions environnementales prédominantes dans les régions "candidates" pour sa culture.

Ainsi, dans le cadre du travail relatif à ce mémoire, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- La prospection de différents sites localisés dans les aires de répartition géographique des différentes espèces de lupin existantes au Maroc, et réalisation de collecte de plantes nodulées afin de pouvoir constituer une collection de symbiontes indigènes nodulant le lupin.
- La caractérisation moléculaire et phénotypique des souches de la collection afin d'évaluer leur diversité génétique et fonctionnelle en prenant en compte l'hétérogénéité entre les espèces et les variations liées aux différents types de sol et en vue de sélectionner les souches les plus performantes pour des applications potentielles.
- L'évaluation de la position taxonomique et caractérisation phylogénétique des différentes souches de la collection.

1 – APERÇU GENERAL SUR LE PROCESSUS DE LA SYMBIOSE

Le processus d'une symbiose fixatrice d'azote se traduit par la capacité des rhizobiums à induire la formation de nodosités au niveau des racines ou des tiges d'une plante hôte particulière. La présence de nodosités chez les légumineuses était historiquement bien connue, mais leur origine était controversée. Woronin (1866) fut le premier à signaler l'observation des micro-organismes ressemblant aux bactéries dans les nodosités de *Lupinus mutabilis*. Hellriegel et Wilfarth (1888) ont montré que la formation des nodosités est le résultat d'une infection externe chez les espèces *Lupinus*, *Phaseolus*, *Ornithopus*, *Vicia*, et *Trifolium*. Cependant, c'était Beyerinck qui a fourni la première preuve que les bactéries sont à l'origine de la formation des nodosités, en préparant des cultures pures d'organismes provenant des nodosités de *Vicia faba* et en infectant avec ces mêmes cultures des plants de fève cultivées sur un sol stérile (Beyerinck, 1888, 1890).

En fait, la formation de nodosités survient quand les rhizobiums pénètrent leurs hôtes d'une manière strictement coordonnée et contrôlée. Les exigences génétiques de la reconnaissance spécifique sont partagées entre le rhizobium et la plante hôte. Chacun des deux partenaires possède des gènes qui ne sont exprimés que dans la présence de l'autre (Djordjevic *et al.*, 1987).

La formation d'une nodosité suit en général les étapes de développement qui suivent :

- Chimiotactisme et attachement des rhizobiums aux racines de l'hôte,
- Déformation des poils absorbants,
- Invasion du cytoplasme des cellules corticales par les bactéries à travers les cordons d'infection,
- Division des cellules du cortex aboutissant à la formation d'un primordium nodulaire,
- Différentiation des bactéries en bactéroïdes et du primordium nodulaire en nodosité.

1. 1 – Mécanismes et spécificité de la reconnaissance symbiotique

Les interactions entre les légumineuses et les rhizobiums se produisent dans la rhizosphère suite à la libération de molécules carbonées (sucres, acides organiques, hormones, vitamines et substances phénoliques) par exsudation, sécrétion, ou autolyse des vieilles cellules de la racine. Beaucoup des substances organiques libérées par les racines ont un faible poids

moléculaire et sont donc facilement décomposables par les micro-organismes. Cela conduit à l'existence d'une grande population microbienne autour de la racine. D'autres composés trouvés dans les exsudats racinaires exercent des pressions sélectives sur la communauté microbienne. Les (iso) flavonoides, stachydrines et acides aldoniques sont les plus importants de point de vue symbiotique (Ara Begum *et al.*, 2001). Ils constituent les premiers signaux de l'hôte qui déclenchent chez la bactérie l'expression du gène de régulation de la nodulation *nod D* et induisent le mécanisme du chimiotactisme des rhizobiums (Petes et Verma, 1990). Une légumineuse peut sécréter différents (iso) flavonoides. De même, la présence de plus d'un gène de *nod D* a été rapportée (cas de *S. meliloti* et *R. leguminosarum*) (Davis et Johnston, 1990).

D'autres molécules originaires de la plante telles que les lectines jouent un rôle important dans le processus de l'infection. Les propriétés et la séquence en acides aminés d'une lectine isolée chez la légumineuse *Dolichos biflorus* (Etzler *et al.*, 1999) ont montré qu'il s'agit d'une metalloprotéine qui présente une grande affinité pour le facteur Nod. Différents analogues de cette lectine sont connus pour stimuler l'adsorption des rhizobiums (Lodeiro *et al.*, 2000). Ils constituent de ce fait une entité spécifique parmi les récepteurs opérationnels au niveau membranaire (Bhagwat *et al.*, 1996, Hirsch, 1999).

Les gènes de rhizobium essentiels pour l'infection et la nodulation incluent les gènes *nod* (*nod*, *nol*, *noe*), les gènes *hsn* (gènes de nodulation spécifique de l'hôte) et d'autres gènes qui codent pour l'expression et la synthèse des molécules de structure de la surface bactérienne tels que les gènes *ndv* responsables de la synthèse des β -glucans, les gènes *exo* responsables de la synthèse des exopolysaccharides, et les gènes *lps* responsables de la synthèse des lipopolysaccharides (Broughton *et al.*, 2000 ; Spaink, 2000, 1999).

En ce qui concerne les gènes de nodulation, les gènes *nod* ne sont exprimés que par l'action d'un activateur de transcription, le Nod D. Le gène *nod D* est exprimé de manière constitutive (Geurts et Bisseling, 2002), il est activé par des molécules produites par les plantes telles que les flavonoides (Spaink, 1987 ; Zuanazzi *et al.*, 1998). Les gènes *nod ABCIJ* sont des gènes communs très conservés chez les différentes espèces de rhizobia.

Les facteurs Nod sont des lipo-chito-oligosaccharides (LCOs) produits par les différents gènes *nod*, *nol* et *noe*. Les LCOs sont formés par 3 à 5 résidus N-acétyl-glucosamine liés en configuration β ,1-4. Un acide gras est lié à la partie non réductrice du sucre terminal. La

longueur et la saturation de la chaîne de l'acide gras ainsi que les différents substituants greffés sur le squelette du LCO jouent un rôle crucial dans la spécificité entre la bactérie et la plante (Perret *et al.*, 2000).

Les facteurs Nod chez *Azorhizobium* et *Sinorhizobium* sont très similaires (Lorquin *et al.*, 1997), cela suggère l'acquisition des gènes qui déterminent la structure des LCOs par transfert latéral (Suominen, 2000). La plupart des gènes symbiotiques sont localisés sur de grands plasmides. Cet emplacement renforce l'idée que ces gènes ont la possibilité d'être transférés horizontalement. Bien que les grands plasmides ne soient pas transmissibles, ils sont en rapport avec d'autres plasmides très transmissibles (Hirsch *et al.*, 2001). Le mécanisme de l'excision et de l'intégration de ces régions dans le chromosome bactérien a été également démontré (Sullivan et Ronson, 1998).

En ce qui concerne les composants de la surface cellulaire codés par les gènes *ndv*, *exo* et *lps* on trouve les β -glucans, les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides qui sont considérés comme d'importants facteurs dans l'efficacité symbiotique (Breedveld et Miller, 1998),

Les β -glucans sont majoritairement des molécules du périplasme qui permettent la croissance des bactéries sous des conditions hypoosmotiques (Pfeffer *et al.*, 1994). Ils ont également un rôle spécifique dans l'interaction symbiotique (Breedveld et Miller, 1998). D'après Bhagwat *et al.* (1996), ces molécules jouent un rôle important dans la suppression du déclenchement du mécanisme de défense par les phytoalexines chez l'hôte.

Les exopolysaccharides (EPS) sont formés par des unités répétitives de sucres avec une chaîne latérale à substitutions variables. Deux EPS sont connus, le EPS I de type succinoglucan et le EPS II de type galactoglucan. Gonzalez *et al.* (1996) ont montré que ces molécules fonctionnent comme des messagers pendant l'infection.

Les lipopolysaccharides (LPS) sont formés par trois constituants (Forsberg et Carlson, 1998), le lipide A, partie hydrophobe du LPS localisée dans la partie externe de la double couche membranaire, le core, un oligosaccharide dont la structure de base est similaire chez plusieurs rhizobiums, et l'antigène O, partie hydrophile qui constitue le composant le plus variable du LPS (Niehaus *et al.*, 1998). La présence ou l'absence de ce dernier composant engendre respectivement l'apparence de colonies bactériennes lisses S-LPS (smooth LPS) ou rugueuses R-LPS (rough LPS) (Lerouge *et al.*, 2001).

Chez les rhizobia, les mutants défectifs en la synthèse ou à faible production de LPS n'ont pas la capacité d'induire la formation de cordons d'infection, perdent leur capacité compétitive ou forment des nodosités incomplètement développées (Lagares *et al.*, 1992). Il a été récemment découvert que les rhizobiums adaptent des structures différentes de LPS (composition en sucres, type et degré de modifications par acétylation et méthylation) en réponse aux conditions de l'environnement (Kannenberg et Carlson, 2001 ; Noel *et al.*, 2000, Berkia, 2004).

Les associations entre la légumineuse et le rhizobium sont généralement sélectives. Par exemple, *Sinorhizobium meliloti* peut s'associer efficacement avec les genres *Medicago*, *Melilotus* et *Trigonella*, alors que *Bradyrhizobium japonicum* ne nodule que *Glycine max*. A l'opposé, ces associations peuvent être moins strictes. Ainsi, la souche *Sinorhizobium* sp. NGR 234 peut noduler 353 espèces de légumineuses appartenant à 112 genres différents et elle peut même noduler une plante non légumineuse, *Parasponia andersonii* (Pueppke et Broughton, 1999).

1. 2 – Initiation et développement nodulaire

L'infection débute juste après que le rhizobium s'adsorbe par chimiotactisme au poil racinaire. Le poil se recourbe et forme une sorte de boucle tout autour de la bactérie. L'hydrolyse de la paroi cellulaire du poil absorbant permet la pénétration du rhizobium par invagination de la membrane plasmique. Celle-ci forme alors une structure tubulaire connue sous le nom de cordon d'infection (Hirsch, 1992). Parallèlement, les cellules du cortex racinaires subissent des divisions rapides pour la formation d'un primordium nodulaire (Vance *et al.*, 1998). Ces divisions paraissent être arrêtées à la phase G2 de la mitose (Stougaard, 2000). Les cordons d'infection atteignent le primordium nodulaire et y relâchent les bactéries par le phénomène d'entocytose (Bassett *et al.*, 1977). Les bactéries se trouvent alors entourées par une membrane qui dérive de l'hôte, la membrane péribactéroïdale qui protège les bactéries des molécules de défenses de l'hôte. Dans ces unités fermées appelés symbiosomes (Roth et Stacey, 1989), les bactéries commencent à se différencier en bactéroïdes.

Le cordon d'infection continue à pénétrer à travers les couches cellulaires dans la zone méristématique active jusqu'aux cellules les plus internes. L'apparition continue de bactéries dans les cellules s'accompagne de l'augmentation de la dimension de l'ébauche nodulaire

(Beringer *et al.*, 1979). Dans ce processus de développement, les bactéries subissent des changements morphologiques et physiologiques qui mènent à la formation de bactéroïdes (Irigoyen *et al.*, 1990).

La fixation de l'azote atmosphérique est assurée par la nitrogénase. Mais, les bactéroïdes ne sont pas capables de fixer l'azote tant que l'oxygène désactive la nitrogénase et bloque la transcription du gène de cet enzyme. Ce dernier est alors protégé par la leghemoglobine, protéine sécrétée par la plante et qui joue un rôle dans le transport de l'oxygène en maintenant une forte pression du O₂ dans le cytoplasme des cellules racinaires de la plante pour la phosphorylation oxydative et en fournissant un niveau bas soutenu d'oxygène aux bactéroïdes (Verma et Long, 1983). L'atmosphère dans l'environnement nodulaire étant alors favorable, la nitrogénase devient active et catalyse la réduction du N₂ en NH₄⁺.

La production de nodulines (tardives) est particulièrement intéressante au développement nodulaire. Elles activent entre autres, l'expression des gènes *nif*, *fix*, *etc.* qui codent pour la synthèse de différents enzymes de la fixation comme la nitrogénase, l'uricase, le glutamate déshydrogénase, la glutamine synthétase, *etc.* Ainsi, le N₂ fixé est converti en glutamate, glutamine, aspartate, asparagine *etc.* qui seront transportés dans la sève du xylème de la plante (figure 1). Une abondance de composés carbonés est fournie en retour aux bactéroïdes.

Le type de nodosité développée est déterminé par la plante hôte :

- Nodosités à croissance indéterminée où l'activité méristématique se maintient (cas de la vigne, du pois, la vesce et la luzerne). De nouvelles cellules apicales sont continuellement infectées. Cela résulte en une forme cylindrique de la nodosité.
- Nodosités à croissance déterminée où l'activité méristématique cesse tôt (cas du soja, de l'haricot et l'arachide). Les cellules infectées engendrent d'autres cellules infectées et la nodosité en grandissant par expansion acquiert une forme sphérique. Ce type de nodosité existe seulement chez les légumineuses (Hirsch *et al.*, 2001).
- Un troisième type intermédiaire a été identifié chez le genre *Lupinus* et *Sesbania rostrata*. Les divisions cellulaires se font soit dans le cortex externe soit dans le cortex interne, conduisant à la formation de nodosités soit déterminées soit indéterminées (Hirsch, 1992, Hirsch *et al.*, 2001).

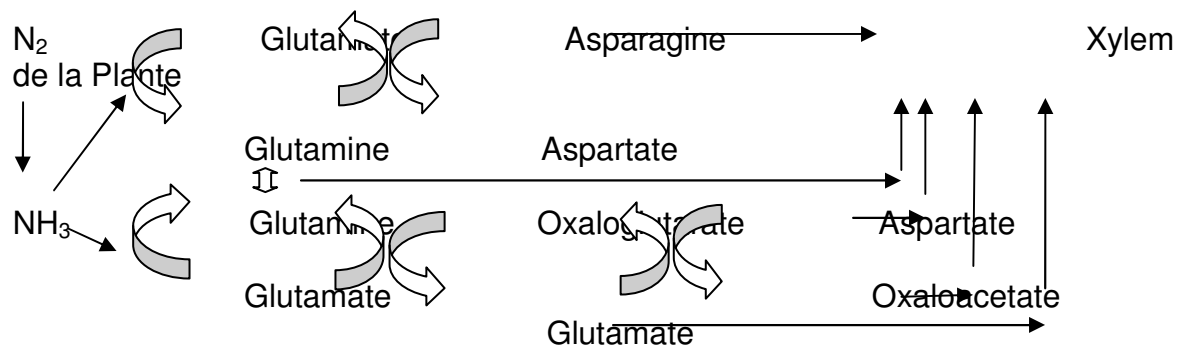


Figure 1. Réduction de l'azote moléculaire et conversion du NH_3 en formes d'acides aminés assimilés par la plante.

- Deux autres types ont été signalés chez *Arachis hypogaea* (Ndoye *et al.*, 1994) et chez *Mimosa scabrella* (de Faria *et al.*, 1988). Pour ces espèces, le mode d'infection est un cas particulier. Les rhizobiums pénètrent directement dans les cellules du cortex entre les cellules épidermiques dans le premier cas et à travers les jonctions des cellules épidermiques dans le second cas.
- Un mécanisme exceptionnel d'infection épidermique directe a été récemment rapporté chez le lupin blanc (González-Sama *et al.*, 2004). Par l'usage des techniques basées sur la microscopie électronique, ces auteurs ont montré que les espèces *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) et *Mesorhizobium loti* peuvent pénétrer dans la racine au niveau de la jonction située entre la base du poil racinaire et les cellules épidermiques adjacentes, ce qui entraîne la formation de nodosités indéterminées typiques.

Selon Corby (1988), le lupin est distingué par des nodosités dites de type lupinoid. Celles-ci peuvent se développer soit sur les racines latérales sous forme de nodosités individuelles, arrondies et rugueuses, soit sur la racine principale sous forme de clusters de nodosités ou d'amas nodulaires en forme de cône de pin. Chaque nodosité de l'amas possède son propre point d'attachement au niveau de la racine et peut croître par diffusion latérale couvrant ainsi la surface de la racine existant tout autour de son point d'attachement. La couche des cellules corticales qui protègent la nodosité progresse et s'épaissit avec l'élargissement de la nodosité.

Les nodosités indéterminées de type lupinoid caractérisent le genre *Lupinus*. Cependant, l'auteur a signalé leur présence également chez le genre *Lotononis*.

Selon le même auteur, les amas nodulaires chez le lupin peuvent être très volumineuses. La taille d'un amas peut atteindre un diamètre de 16 mm dans le cas de *Lupinus mutabilis*, voire même celle d'une pomme de terre moyenne (Frank, 1980, cité par Corby, 1988).

La présence d'une autre forme de nodosité dite de type crotalaroid a été rapportée chez les plantes de lupin (Erikson, 1873, cité par Corby, 1988). Ces nodosités possèdent généralement une forme en éventail plus ou moins aplatie avec plusieurs lobes qui émergent à partir d'un seul point d'attachement au niveau de la racine et progressent par diffusion latérale des

méristèmes apicales. Mais dans le cas du lupin, les différents lobes restent soudés et progressent par un moulage circulaire autour de la racine.

2 – SYMBIOSE LUPIN-RHIZOBIUM

2. 1 – Aperçu général sur la plante

2. 1. 1 - Taxonomie et caractéristiques du genre *Lupinus*

Le genre *Lupinus* comprend plus de 300 espèces (Cowling *et al.*, 1998). L'aire de répartition géographique de ces espèces comprend la région méditerranéenne, l'Asie et le continent américain (Gladstones, 1998). Au siècle dernier, différentes espèces de lupin ont été introduites en Afrique du Sud ainsi qu'en Australie (Kass et Wink, 1997).

En 1974, Gladstones a proposé une distinction taxonomique des lupins sur la base de l'aspect des graines : un groupe d'espèces à graines rugueuses et un autre groupe à graines lisses.

Les lupins ont été communément considérés comme des herbes annuelles, mais l'existence d'espèces vivaces, arbrisseaux et sous-arbrisseaux dans le continent américain a permis la répartition des espèces en 1984 en deux grands groupes géographiquement séparés :

- Les espèces du monde ancien, au nombre de douze espèces, toutes annuelles et à larges graines (Plitman and Heyn, 1984).
- Les espèces du nouveau monde qui s'étendent de l'Alaska jusqu'en Argentine et qui comprennent des plantes annuelles et vivaces à petites graines (Dunn, 1984).

Dans la même année, il a été proposé qu'une espèce à feuille simple originaire du Brésil pourrait être un ancêtre primitif des lupins, mais cette proposition a été rejetée par Monteiro et Gibbs (1986).

Une nouvelle espèce : *L. anatolicus* a été récemment proposée par Swiecicki *et al.* (1996). Toutefois, Clements *et al.* (1996) ont montré qu'il s'agit d'une nouvelle accession de *L. pilosus* à graines lisses.

La classification initiale du lupin subdivisait le genre en deux sous genre *Eulupinus* et *Platycarpus* (Ascherson et Graebner, 1907). Jusqu'à nos jours, la répartition établie en 1984 est retenue, avec cependant une subdivision du genre en deux nouveaux sous genres : Le premier est d'origine méditerranéenne (Subgenus *Lupinus*) et le second est natif de l'Amérique (Subgenus *Platycarpus*) (Kurlovick *et al.*, 1995 cité par Cowling *et al.*, 1998).

Parmi toutes les espèces de lupin, quatre seulement sont actuellement cultivées : *L. luteus*, *L. albus*, *L. angustifolius* et *L. mutabilis* (Gladstones, 1998).

Les lupins sont classés de point de vue taxonomique dans le genre *Lupinus*, la tribu des Génistées, la sous Famille des Papilionacées, la famille des légumineuses (ou Fabaceae), l'ordre des Fabales (anciennement Rosales), la sous-classe des Rosidae, la classe des Dicotylédones, le sous embranchement des Angiospermes, l'embranchement des Spermaphytes, le phylum des Trachéophytes, le sous règne des Trachéobiontes et le règne du Plantae.

Le genre *Lupinus* est distingué des autres genres de Papilionacées par la forme des feuilles. Celles-ci sont composées habituellement de feuillettes velus qui rayonnent pour former une feuille palmée ou digitée à disposition en forme d'éventail.

Plusieurs espèces de lupin sont riches en différents types d'alcaloïdes toxiques (lupanine, hydroxylupanine, sparteine, etc.) donnant un goût amer aux graines et au fourrage (Wink, 1993). Mais on dispose actuellement de variétés sélectionnées, d'hiver ou de printemps, dépourvues ou à faible teneur en alcaloïdes qu'on nomme les lupins doux.

Depuis les temps anciens le lupin a été utilisé pour enrichir le sol et dans les cultures en rotation avec d'autres légumineuses ou céréales (Gladstones, 1998). Les romains ont cultivé le lupin annuel (principalement *L. albus*) comme nourriture pour les humains et les animaux.

De nos jours, les graines hautement protéiques de quelques espèces sont utilisées pour la consommation humaine (lupin en conserve, lupin rôtis, etc.).

Le lupin est aussi utilisé comme fleur de jardin, plante ornementale (Gladstones, 1998) et comme plante de couvert pour l'amélioration et la conservation de la stabilité du sol (Williams, 1993).

D'après le rapport du Février (2000) de l'Union Nationale Interprofessionnelle des plantes riches en Protéines (UNIP), le premier producteur mondial de lupin est l'Australie qui assure 86% de la production mondiale (1786000 tonnes). L'Australie est aussi le premier exportateur mondial de lupin. En Europe, le premier producteur de lupin est l'Allemagne avec 71% de la production européenne (108000 tonnes).

2. 1. 2 - Le lupin au Maroc

2. 1. 2. 1 - Caractéristiques botaniques

Le genre *lupinus* est représenté au Maroc par six espèces : *L. luteus*, *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. atlanticus* et *L. cosentinii*. Toutes les espèces sont annuelles avec un système racinaire très robuste et une hauteur comprise entre 30 et 70 cm, cette dernière peut atteindre les 150 cm de long dans le cas de *L. albus*. Les fleurs sont unicolorées et la durée de végétation est de l'ordre de cent trente à cent cinquante jours (Birouk, 1990 ; Gladstones, 1998).

2. 1. 2. 2 - Ecologie

Les lupins exigent des sols aérés et se développent mieux sur les sols grossiers ou moyennement grossiers de texture sableuse ou de type terreux et peu fertiles. Ils sont ainsi dénommés « les plantes d'or des sables ». Au Maroc, ces plantes sont rencontrées à l'état spontané principalement sur les terrains accidentés secs, les falaises ou sur les sables côtiers.

La plupart des espèces sont sensibles aux sels solubles. La température optimale de la croissance est d'environ 20 à 25°C (Dracup, 1993).

La distribution spontanée des six espèces est variable et dépend principalement de l'altitude, la pluviométrie et des caractéristiques liées au sol telles que la nature de la roche mère et le pH (Gladstones, 1973 ; 1980).

– *L. luteus* est adaptée aux basses altitudes (< 500 m), aux terres sablonneuses acides et aux pluviométries variant de 300 à 1000 mm. L'espèce est sensible au froid et la floraison est influencée par la photopériode.

- *L. albus* est adaptée aux sites de basse altitude, aux sols sablonneux ou sablo - limoneux acides ou voisins de la neutralité. L'espèce existe dans des régions à pluviométrie allant de 400 à 1200 mm.
- *L. angustifolius* est l'espèce la plus précoce et la plus résistante au froid. L'aire de répartition est plus large. Elle abonde dans les zones littorales ainsi qu'en hautes altitudes mais reste toutefois limitée dans la région Nord du pays. Elle peut s'installer sur des sols pauvres et peu fertiles sous des pluviométries comprises entre 100 et 1400 mm.
- *L. atlanticus* qui est une espèce endémique du Maroc, est adaptée aux altitudes élevées des chaînes de l'Atlas, aux sols lourds *et alcalins* et aux pluviométries variant de 100 à 700 mm.
- *L. pilosus* est adaptée aux altitudes élevées, aux sols alcalins à texture fine et aux pluviométries variant de 300 à 2000 mm.
- *L. cosentinii* abonde surtout dans les zones littorales dans des sites sableux. Toutefois, on peut rencontrer des populations isolées dans les chaînes de l'Atlas à des altitudes d'environ 1000 m et à pluviométrie abondante.

2. 1. 2. 3 - Exploitation

Au Maroc, deux espèces sont actuellement exploitées : *L. albus* ou le lupin blanc avec la variété douce et précoce Multolupa et *L. luteus* ou le lupin jaune avec une population ancienne du Gharb. Ces espèces sont principalement utilisées comme fourrage, comme engrais vert et pour la production des graines (Thami-Alami et Bounejmate, 1997).

Selon une étude établie sur une vingtaine d'années dans la région du Gharb par l'Office Régional de la Mise en Valeur du Gharb (ORMVAG) (1999), on peut noter que la superficie de la culture de lupin est passée d'un chiffre de 120 ha en 1982/83 pour atteindre un maximum de 3225 ha en 1991/92 puis à 676 ha en 1997/98. Toutefois, la superficie notée pour 2000/2005 est de l'ordre de 4000 ha (MADR, 2005 DPV).

Le lupin est essentiellement exploité en culture dans la zone côtière du Gharb avec une superficie de 700 ha, la région de Khémisset (500 ha), le Loukkos (464 ha), la région de Rabat-Salé (250 ha) et enfin la région de Benslimane (12 ha) (DPV-DREF, 2000). Cependant, la production du lupin au titre de la campagne 1999/2000 (DPV-DREF, 2000) ne dépassait guère les 31.9 milliers de tonnes de matière verte. Selon l'organisation mondiale FAO (Food

& Agricultural Organization), la production marocaine en lupin pour la campagne 2003/2004 est de l'ordre de 14000 tonnes.

La réduction notable de la superficie de culture et de la production du lupin était due au déficit hydrique, au retard des pluies qu'a connu le pays durant les dernières années, mais essentiellement à la non disponibilité des semences sélectionnées et à la politique qui favorisait d'autres cultures céréalières et fourragères notamment la luzerne, le trèfle d'Alexandrie et le maïs fourrager.

L'introduction de la culture du lupin dans d'autres zones sableuses et marginalisées du pays pourrait avoir un effet bénéfique sur le plan agricole vu la contribution de cette légumineuse dans l'approvisionnement du sol en azote ainsi que le développement de l'élevage. Mais la qualité du rendement d'une espèce donnée de lupin dépend de la variété utilisée, des conditions de l'environnement et surtout de la formation de nodosités par des souches indigènes spécifiques appartenant au groupe des rhizobia qui assurent la nutrition azotée de la plante hôte (Birouk, 1990).

2. 2 – Aperçu général sur le partenaire microbien

Les microsymbiotes de lupin ont fait l'objet de plusieurs études au cours des dernières années. Ces études ont permis de noter la présence de souches autochtones de rhizobia nodulant différentes espèces de lupin aux Etats-Unis d'Amérique (Bottomley *et al.*, 1994, Robinson, 2000), en Nouvelle Zélande, en Europe (Amarger *et al.*, 1977 ; Hoeflich *et al.*, 1994) et au Mexique (Barrera *et al.*, 1997).

D'autres recherches ont porté plus d'attention sur l'augmentation du rendement de la plante hôte par le biais de l'inoculation avec des souches performantes de lupin. De telles études ont été principalement rapportées en Australie où le lupin ainsi que son microsymbiote ont été tous les deux introduits au pays (Gault *et al.*, 1986).

Quelques études ont été réalisées pour déterminer la capacité des symbiotes de lupin à noduler d'autres plantes légumineuses (Jensen et Hansen, 1968) et pour évaluer leur efficacité symbiotique (Amarger *et al.*, 1977). La sélection de souches performantes sous différentes conditions a été également abordée (Hoeflich *et al.*, 1994 ; Robinson, 1997 ; Abdallah, 1999).

D'autres études incluent la détermination de la densité bactérienne à appliquer aux graines ainsi que l'étude de la survie et la multiplication de ces bactéries dans le sol et dans la rhizosphère (Roughley *et al.*, 1993 ; Robinson *et al.*, 2000) et l'étude des mécanismes d'adsorption et d'infection (Wiesniewski et Delmote, 1996 ; Gagnon et Ibrahim, 1998). En fait, des techniques de mesure plus précises ont permis de mettre en évidence les particularités de la structure et des mécanismes d'adaptation des flagelles des rhizobia de lupin (Cohen-Krausz et Trachtenberg, 1998 ; Scharf *et al.*, 2001). Novikova et Gordienko (2001) ont montré, en utilisant la microscopie électronique, que même la structure des cordons d'infection visualisés dans les racines du lupin est bien différente par rapport à celle des cordons d'infection chez une dizaine d'autres espèces de légumineuses.

Sur le plan génétique, la caractérisation des rhizobia de lupin a été initialement rapportée par Heumann (1979). De nombreux rhizobia indigènes caractérisés ont été attribués au genre *Bradyrhizobium* (Jensen, 1967 ; Jordan, 1984 ; Legocki *et al.*, 1997). Jusqu'à nos jours, l'étude de la diversité génétique des souches de lupin s'est portée essentiellement sur l'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction du gène de l'ADNr 16S amplifié par PCR (Laguerre *et al.*, 1994 ; 1997 ; Xu *et al.*, 1995) et sur l'analyse de la séquence de ce gène (Scholla *et al.*, 1990 ; Barrera *et al.*, 1997).

Au Maroc, le lupin est spontanément nodulé par des rhizobia dans son aire naturelle et dans les sols où il a été introduit (Birouk, 1990). Très peu d'études ont été menées pour la caractérisation du microsymbiote par rapport à la plante hôte (Guedira, 2002). Cependant, aucune étude n'a été jusqu'à lors établie pour étudier la diversité génétique des rhizobia indigènes.

3 – BIODIVERSITE DES RHIZOBIA

Les rhizobiums sont connus comme des bactéries fixatrices d'azote ayant la faculté d'établir des relations symbiotiques avec plusieurs espèces de la famille des fabacées. Toutefois, une large population de rhizobiums non symbiotiques peut exister dans le sol ou dans la rhizosphère des plantes légumineuses (Segovia *et al.*, 1991 ; Sullivan *et al.*, 1996). Ils peuvent également exister comme des cellules viables dans l'eau où ils sont capables d'infecter et de noduler des légumineuses aquatiques telles que *Aechynomene* spp. et *Sesbania* spp. (Chaintreuil *et al.*, 2000 ; Wang et Martinez-Romero, 2000). Récemment, les rhizobiums ont

été également identifiés comme endophytes de plusieurs non légumineuses telles que le maïs, le riz et le blé (Ueda *et al.*, 1995 ; Engelhard *et al.*, 2000).

D'une manière générale, la biodiversité des rhizobiums ou de tout autre organisme peut être définie comme suit " La diversité biologique, ou biodiversité, est la variété et la variabilité de tous les organismes vivants. Ceci inclut la variabilité génétique à l'intérieur des espèces et de leurs populations, la variabilité des espèces et de leurs formes de vie, la diversité des complexes d'espèces associées et de leurs interactions, et celle des processus écologiques qu'ils influencent ou dont ils sont les acteurs " d'après la XVIII^{ème} Assemblée Générale de l'Union Internationale pour la Nature (UICN) tenue à Costa Rica (1988).

3. 1 – Méthodes d'étude de la diversité

Plusieurs techniques ont été utilisées par les microbiologistes pour évaluer la diversité des rhizobiums. Ces techniques ont permis l'analyse de différents traits phénotypiques et génétiques qui sont devenus par la suite une base de définition du concept de l'espèce.

3. 1. 1 – Les marqueurs phénotypiques

La caractérisation phénotypique classique des rhizobia se base sur des critères morphologiques, symbiotiques, biochimiques, et physiologiques (Graham *et al.*, 1991).

Les critères morphologiques regroupent les caractéristiques de la cellule bactérienne (forme, nombre et type de flagelles, coloration Gram, présence d'endospores) et les caractéristiques de la colonie (couleur, dimension, forme).

Les critères symbiotiques indiquent la capacité infective, effective et compétitive d'une souche donnée.

Les critères biochimiques évaluent la présence et/ou l'activité de différents enzymes tels que la glutamate déshydrogénase, la glucose 6-phosphate déshydrogénase, l'indole- phénol oxydase, la nitrate réductase, l'uréase, l'adénylate kinase ainsi que d'autres enzymes impliqués dans les voies métaboliques d'assimilation des substrats carbonés.

Les critères physiologiques regroupent le taux de croissance de la bactérie sur le milieu YEM (Yeast Extract Mannitol) (Vincent, 1970), la capacité d'utiliser différents carbohydrates et

différentes sources d'acides aminés comme seule source de nitrogène, la croissance à différentes températures, la tolérance aux variations du pH et à différentes concentrations en sels, la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds.

3. 1. 1. 1 – La croissance

La croissance dans le milieu YEM figure parmi les critères phénotypiques les plus importants dans la caractérisation des rhizobia (Vincent, 1970).

La première classification des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote en deux genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* s'était basée sur ce critère (Jordan, 1982, 1984). En fait, les souches à croissance rapide du genre *Rhizobium* possèdent un taux de génération inférieur à 4 heures et forment des colonies circulaires convexes généralement translucides avec un diamètre de 2 à 4 mm après 3 à 5 jours sous des conditions optimales d'incubation. En revanche, les souches à croissance lente du genre *Bradyrhizobium* possèdent un taux de génération de 6 à 8 heures et forment des colonies circulaires convexes et rarement translucides avec un diamètre de 1 à 2 mm après 5 à 7 jours d'incubation.

Des souches qui présentent un temps de génération intermédiaire ont été rapportées par Jarvis *et al.* (1997). Ces souches ont été assignées à un nouveau genre *Mesorhizobium*. D'autres souches présentant un temps de génération extrêmement lent pouvant atteindre les 39 heures ont été également identifiées (Xu *et al.*, 1995). Ces souches restent toutefois groupées avec les bradyrhizobiums.

3. 1. 1. 2 – Les critères symbiotiques

L'infectivité des rhizobia exprime le pouvoir de la bactérie à noduler une ou plusieurs légumineuses hôtes. Elle peut être facilement évaluée par le dénombrement des nodosités formées.

L'efficacité est la capacité de réduire efficacement l'azote atmosphérique en ammonium. Différentes techniques d'estimation de l'efficacité sont disponibles. Trois sont les plus utilisées, la méthode Kjeldahl qui permet de mesurer l'azote total de la partie végétative de la plante, la méthode de l'activité réductrice de l'acétylène (ARA) qui permet d'évaluer l'activité de la nitrogénase par l'apport de l'acétylène comme substrat et par la mesure de l'éthylène dégagé comme produit de réduction final, la troisième méthode consiste à déterminer le poids sec de la partie végétative des plantes inoculées par la souche et recevant

tous les éléments nutritifs essentiels à la plante sauf l'azote par rapport à celui de deux témoins, l'un non inoculé et l'autre également non inoculé mais recevant de l'azote sous forme minérale. La différence entre les poids enregistrés permet d'évaluer indirectement l'apport de l'azote fourni par la souche à la plante. La diversité de la capacité fixatrice de différentes souches nodulant le lupin a été évaluée par plusieurs auteurs (Ayisi *et al.*, 1992 ; Kurlovick *et al.*, 1997 ; Howieson *et al.*, 1998). En fait, l'étude de la diversité de l'efficacité des souches est un critère de base d'un grand intérêt aussi bien sur le plan pratique que dans la caractérisation des rhizobia.

La compétitivité représente la résistance de la souche bactérienne considérée aux micro-organismes antagonistes et la concurrence avec les souches indigènes pour la nodulation.

3. 1. 1. 3 - Utilisation des sources de carbone

Les rhizobiums sont des bactéries hétérotrophes. Ils ont besoin de composés organiques déjà synthétisés par les plantes qu'ils utilisent pour la synthèse de leurs propres molécules organiques (Lynch et Whipps, 1990).

Dans la rhizosphère, les rhizobia sont fortement stimulés par les exsudats racinaires et par les débris cellulaires qui contiennent différents hydrates de carbone. La concentration des substrats carbonés a un effet stimulant sur la croissance et la survie de nombreuses espèces de rhizobium (Whipps, 1990). En symbiose, ces substrats fournissent l'énergie nécessaire pour le développement des bactéroïdes et pour le bon fonctionnement des différentes étapes de la réduction de l'azote atmosphérique.

Toutefois, les rhizobiums diffèrent dans leur aptitude à assimiler les variables sources de carbone (Allen *et al.*, 1950).

Selon Graham (1964), les bactéries à croissance rapide présentent un spectre d'assimilation très large vis-à-vis des substrats carbonés par rapport aux bactéries à croissance lente. Plusieurs études ultérieures ont indiqué que les rhizobiums montrent une bonne croissance par l'utilisation préférentielle des disaccharides. Cet aspect a permis à Jordan (1984) de faire la distinction entre les deux genres établis à l'époque, *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*.

L'étude de l'assimilation de diverses sources de carbone par différentes souches a indiqué que les bactéries du genre *Rhizobium* ont une grande aptitude à assimiler les mono- et les disaccharides, et d'une manière restreinte les trisaccharides et les polyalcools. A l'opposé, les

bactéries du genre *Bradyrhizobium* ont une aptitude variable pour l'assimilation des monosaccharides, moindre pour les disaccharides et rare pour les trisaccharides (Stowers, 1985).

La description de nouveaux genres de rhizobiums s'est accompagnée par la révélation d'une grande diversité des profils d'utilisation de sources de carbone (Zhang *et al.*, 1991 ; de Lajudie *et al.*, 1994 ; Stowers et Elkan, 1984 ; Odee *et al.*, 1997).

3. 1. 1. 4 - Tolérance à la salinité

Parmi les facteurs environnementaux, la salinité constitue la contrainte majeure limitant le développement et la productivité des plantes cultivées. Environ 40% de la surface terrestre présente des problèmes potentiels de salinité (Cordovilla *et al.*, 1994). Les zones à problèmes se localisent essentiellement dans les régions tropicales et méditerranéennes (FAO, 1988). Le facteur causal de la salinisation des sols est principalement l'irrigation (Szabolcs, 1986). L'augmentation de la teneur en sel est également liée au lessivage des cations, à l'évapotranspiration, aux conditions climatiques et à la nature du sol.

Le stress salin affecte d'une manière délétère la croissance et la persistance des souches rhizobiennes dans le sol. La croissance des rhizobiums sous des conditions salines varie d'une espèce à l'autre et d'un type de sel à l'autre (El Sheikh et Wood, 1989).

La plupart des rhizobiums sont inhibés par des concentrations de 100 mM NaCl (Singleton *et al.*, 1982). Différentes souches de *Bradyrhizobium* sont complètement inhibées entre 50 et 90 mM NaCl. Cependant, il existe des souches très tolérantes au NaCl, par exemple *Sinorhizobium meliloti* peut croître à des concentrations variant de 300 à 700 mM NaCl, des souches de *Bradyrhizobium* nodulant le soja et de *Mesorhizobium* nodulant le pois chiche peuvent tolérer 340 mM NaCl. Il a été rapporté que chez la même espèce *Rhizobium leguminosarum*, il existe des souches dont la croissance est inhibée par 150 mM NaCl (Rai, 1983) et d'autres qui supportent 350 mM NaCl (Breedveld *et al.*, 1993). Zahran *et al.* (1994) ont rapporté l'existence de souches hautement tolérantes chez le lupin qui peuvent survivre à une concentration aussi élevée que 1700 mM NaCl.

Concernant le type de sel, il a été rapporté que les chlorures sont plus toxiques que les sulfates (El Sheikh et Wood, 1989). La croissance de *Sinorhizobium meliloti* a été sévèrement affectée

par les chlorures associés aux ions de magnésium que par les ions de sodium et de potassium (Jian *et al.*, 1993).

Les cellules de rhizobia exposées aux concentrations élevées de sel accumulent souvent des osmolytes organiques protecteurs tels que des acides aminés comme la proline, la bétaine (et dérivés), l'ectoïne et le glutamate ou des carbohydrates comme le tréhalose, le saccharose et autres afin de maintenir la turgescence de la cellule et de limiter les dégâts causés par le sel (Boncompagni *et al.*, 1999 ; Botsford et Lewis, 1990 ; Brhada *et al.*, 1997 ; Gouffi *et al.*, 1999).

La sélection des souches osmotolérantes à haut potentiel fixateur d'azote doit être intégrée dans toute sélection de légumineuses pour des régions présentant des problèmes de salinité.

3. 1. 1. 5 - Tolérance au pH

Les pH extrêmes affectent les deux partenaires symbiotiques. La majorité des légumineuses nécessitent des pH neutres ou légèrement acides pour s'établir dans le sol (Bordeleau et Prévost, 1994). Cependant, dans les sols acides, les fortes teneurs en manganèse et surtout en aluminium inhibent la croissance racinaire, le nombre des nodosités diminue et l'activité de la nitrogénase ainsi que l'ultrastructure nodulaire se trouvent très affectées.

Le pH du sol a une grande influence sur la survie et la multiplication des rhizobiums. Le pH optimal pour les diverses phases de la croissance des rhizobiums peut varier, mais en général ce sont des bactéries neutrophiles. Graham et Parker (1964) ont montré que le pH bas critique pour la croissance de *Rhizobium japonicum* et de *Rhizobium lupini* est compris entre 4 et 6. Des études ultérieures ont indiqué que les rhizobiums présentent des réponses variées face aux variations du pH (Jordan, 1984 ; Glenn et Dilworth, 1994).

L'acidité est beaucoup plus répandue que l'alcalinité dans plusieurs régions du monde. A l'opposé, les sols acides sont rares au Maroc. Le pH le plus bas enregistré pour différentes régions du pays est de l'ordre de 5 unités (Aurag et Sasson, 1992).

Face à l'acidité, les souches de rhizobium varient largement dans leur tolérance. *Sinorhizobium meliloti* a été rapporté être sensible au pH acide (Brockwell *et al.*, 1991). Une souche appartenant à cette espèce a été récemment caractérisée par une tolérance satisfaisante dans un champ de sol à pH 5.0 (Howieson *et al.*, 1998). *Rhizobium tropici* et *Mesorhizobium loti* sont considérés comme des souches très tolérantes à l'acidité (Graham *et al.*, 1994 ; Wood

et al., 1988). Certaines souches rhizobiennes peuvent même supporter et survivre dans un pH très bas de l'ordre de 3,5 (Yadav et Vyas, 1973).

Les mécanismes d'adaptation physiologiques et biochimiques des rhizobiums sous les conditions acides sont nombreux (O'Hara et Glenn, 1994 ; Graham *et al.*, 1994). Ces mécanismes incluent entre autres l'exclusion et l'expulsion des protons H⁺ (Chen *et al.*, 1993a), la forte teneur en potassium et en glutamate du cytoplasme des cellules stressées (Aaron et Graham, 1991), le changement de la composition du LPS (Chen *et al.*, 1993b), et l'accumulation de polyamines (Fujihara et Yoneyama, 1993).

L'alcalinité est moins néfaste sur la survie des rhizobiums. Jordan (1984) a montré que la majorité de ces bactéries peuvent tolérer des pH allant jusqu'à 9. Le même résultat a été retrouvé chez des souches nodulant l'acacia (Zerhari *et al.*, 2000) et le pois chiche (Mâatallah *et al.*, 2002). Cependant, l'effet négatif que représente le pH alcalin du sol est l'indisponibilité des minéraux indispensables autant pour le rhizobium que pour la plante hôte tel que le fer et le manganèse (Bordeleau and Prévost, 1994).

La sélection des souches tolérantes aux pH extrêmes peut constituer un moyen prometteur pour une augmentation symbiotique potentielle dans les zones à problèmes.

3. 1. 1. 6 - Tolérance à la température

La température joue un rôle important sur les équilibres microbiens du sol. L'influence de la température sur la croissance est en fait une mesure de l'influence de la température sur la turgescence et sur l'action des enzymes de la cellule. Les températures élevées engendrent la déshydratation et la dégradation des enzymes de la voie métabolique des bactéries. Par contre, les basses températures entraînent la gélification de l'eau cellulaire et l'inactivation parfois irréversible des enzymes. Le stress thermique (non extrême) induit généralement l'expression de protéines de stress thermique HcP (Heat shock proteins), qui assurent la protection des enzymes clefs de la physiologie microbienne (Cloutier *et al.*, 1992).

L'effet des basses températures sur les rhizobiums est moins rapporté par rapport aux températures élevées (Prévost *et al.*, 1987 ; Lynch et Smith, 1993 ; Roughley, 1970). En général, ces bactéries sont tolérantes aux basses températures de l'ordre de 4°C et 5°C. C'est le cas courant chez les souches isolées des régions arctiques (Bordeleau and Prévost, 1994). Hume et Shelp (1990) ont montré que la souche *Bradyrhizobium japonicum* 532C, isolée au

Canada, a été plus performante dans des tests d'inoculation de plantes de soja sous les conditions canadiennes que les souches USDA 110 et USDA 142 isolées aux Etats Unis.

Il a été rapporté que les températures basses extrêmes inhibent l'expression des gènes *nod* et donc l'infection et la nodulation (Zhang *et al.*, 1996). A l'opposé, la température élevée affecte la différenciation des rhizobia en bactéroïdes ainsi que le fonctionnement de la nodosité (Zahran, 1999). Piha et Munns (1987) ont rapporté que les nodosités de la fève formées à 35°C étaient de petite taille et que l'activité de la nitrogénase était très basse.

La température optimale de la fixation d'azote d'une espèce bactérienne est généralement corrélée avec la température de l'habitat normal de cette espèce. Il a été ainsi rapporté que les températures critiques de la fixation d'azote sont de 30°C pour la trèfle et le pois (Michiels *et al.*, 1994), de 30°C à 33°C pour le Haricot (Piha et Munns, 1987) et varient entre 35°C et 40°C pour les graines de cacahuètes et de soja (Michiels *et al.*, 1994).

Dans les conditions extrêmes, en l'occurrence sous stress thermique et hydrique, des souches de rhizobiums ayant une capacité supérieure d'adaptation peuvent être sélectionnées pour une exploitation effective de la fixation d'azote (Aurag et Brhada, 1995 ; Mpeperekki *et al.*, 1997).

3. 1. 1. 7 - Résistance intrinsèque aux antibiotiques

Le sol représente une niche écologique où différents microorganismes peuvent être présents. Les rhizobiums répondent de façon sélective aux différents stimuli émis par ces organismes. Ces derniers peuvent sécréter des antibiotiques afin d'inhiber la croissance ou de détruire les autres microorganismes voisins.

Schwinghamer (1967) et Brockwell *et al.* (1977) ont rapporté que les antibiotiques exogènes peuvent affecter extrêmement la capacité des rhizobiums à infecter leur plante hôte voire même entraîner la perte de leur capacité symbiotique.

L'action d'un antibiotique est caractérisée par la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui représente la plus faible concentration de l'antibiotique inhibant la croissance du rhizobium à la température optimale de 28°C. Les profils de la CMI de différents antibiotiques sont d'un intérêt écologique très important puisqu'ils permettent d'identifier une souche de rhizobium déterminée introduite dans un sol particulier (Obaton, 1971).

Les antibiotiques agissent globalement sur les enveloppes cellulaires (paroi, membrane cytoplasmique) et sur la synthèse des protéines et des acides nucléiques par des mécanismes spécifiques (Karanja et Wood, 1988). Le mode d'action de ces molécules varie en fonction du type de l'antibiotique (Graham, 1963) ainsi qu'en fonction de la concentration testée (Lindström et Lehtomäki, 1988).

La résistance intrinsèque aux antibiotiques a été étudiée aussi bien chez les souches de *Rhizobium* (Eaglesham, 1987 ; Zhang *et al.*, 1992) que celles de *Bradyrhizobium* (Kuykendall *et al.*, 1988). Le degré de la résistance peut varier d'une espèce à une autre et même entre les souches de la même espèce (Shishido et Pepper, 1990 ; Zhang *et al.*, 1991 ; Odee *et al.*, 1997). Une résistance multiple à différents types d'antibiotiques peut être identifiée chez une même souche de rhizobium (Cole et Elkan, 1979 ; Jenkins et Bottomley, 1985). La résistance des rhizobia de lupin à différents antibiotiques a été évaluée par Slizak-Wank et Piotrowski (1991).

Le mécanisme de résistance aux antibiotiques le plus répandu chez les bactéries Gram négatives est l'inactivation extra ou intracellulaire de l'antibiotique, ce qui aboutit à la perte de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible. Un autre mode connu de résistance consiste à la modification de la cible de l'antibiotique (Weaver et Frederick, 1982).

3. 1. 1. 8 - Résistance intrinsèque aux métaux lourds

Les métaux lourds sont présents naturellement dans le sol suite à la dégradation des roches mères. Plusieurs paramètres influencent la disponibilité et la mobilité des métaux dans le sol. Les plus importants à signaler sont le pH, le type du sol et les processus physico-chimiques exercés par les différents êtres vivants qui existent dans ce sol.

Certains métaux tels que le fer, le phosphore, le molybdène, le calcium et le nickel sont indispensables pour la croissance aussi bien des rhizobiums que de leurs plantes hôtes. D'autres métaux tels que le cadmium, l'aluminium, le mercure, etc. ne semblent présenter aucune utilité. La disponibilité de ces éléments se situe soit à des niveaux très bas ou très en excès, au point de la toxicité (Ernst, 1990).

La toxicité due aux métaux lourds dans le sol peut entraîner un déclin des populations de rhizobiums et affecter irréversiblement leur croissance et leur performance symbiotique (Mc Grath, 1994 ; Mc Grath *et al.*, 1995 ; Giller *et al.*, 1998). Tong et Sadowsky (1994) ont rapporté que les souches à croissance lente sont plus résistantes aux métaux lourds que les

souches à croissance rapide. Des résultats non concordants ont été toutefois observés chez les deux souches *Sinorhizobium meliloti* et *Sinorhizobium fredii* (Kinkle *et al.*, 1994).

Les rhizobiums réagissent variablement aux différents types de métaux lourds et ceci en fonction des concentrations appliquées (Kinkel *et al.*, 1987). Le traitement de *Rhizobium leguminosarum* et d'*Agrobacterium tumefaciens* avec du cadmium a abouti à des bactéries qui ont perdu la capacité de reproduction (Alexander *et al.*, 1999). Par contre, le traitement de *Bradyrhizobium japonicum* avec du nickel a entraîné favorablement une augmentation considérable de l'activité de l'hydrogénase dans les bactéroïdes (Klucas *et al.*, 1983).

Les mécanismes de résistance des bactéries aux métaux lourds sont très complexes. Ils consistent soit à la synthèse de protéines ou de polymères extracellulaires qui adhèrent au métal, soit par compartimentation à l'intérieur des cellules et soit par le moyen le plus commun, la diminution de l'assimilation et l'activation de l'exportation (Ross, 1993 ; Tomsett, 1993). Comme chez toutes les bactéries, les gènes de résistance aux métaux lourds chez les rhizobiums sont localisés au niveau des plasmides (Silver, 1992).

L'identification et la sélection de couples symbiotiques *Rhizobium*-légumineuse résistants aux métaux lourds peut constituer un moyen très efficace pour palier l'écotoxicologie des sols contaminés (Wetzel et werner, 1995).

3. 1. 2 – Les marqueurs moléculaires

Ces marqueurs regroupent différentes techniques utilisant les acides nucléiques ADN ou ARN pour étudier la localisation ou la variabilité en séquence des gènes ou de fragments de gènes. Les techniques les plus utilisées chez les rhizobiums sont les suivantes :

3. 1. 2. 1 – Le pourcentage en nucléotides G+C

L'évaluation du pourcentage en molarité des bases G+C contenus dans l'ADN (coefficient de Chargaff) est essentielle pour la description des bactéries (Vandamme *et al.*, 1996). Cette méthode peut être utilisée comme un premier moyen taxonomique des rhizobia. Toutefois, ce coefficient ne peut pas constituer à lui seul une base suffisante pour séparer entre les différents genres ou espèces de rhizobium. En effet, selon Graham *et al.* (1991), les souches de *Rhizobium* ont une valeur du pourcentage G+C qui varie de 59 à 64 %, les souches de

Badyrhizobium ont des valeurs comprises entre 61 et 65 % alors que les souches d'*Azorhizobium* présentent des valeurs élevées de 66 à 68 %.

3. 1. 2. 2 – Le polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP)

La RFLP (Restriction Fragment length Polymorphism) consiste en la coupure de fragments d'ADN amplifiés ou non par des enzymes de restriction à des sites spécifiques composés par 4, 6 ou 8 bases nucléotidiques. Cette technique est souvent couplée à la méthode de l'hybridation moléculaire par Southern Blot ou à la PCR (PCR-RFLP).

- Dans la PCR-RFLP, les fragments amplifiés par PCR sont digérés par des enzymes de restriction puis révélés par électrophorèse. Le nombre et la différence de migration des différents fragments obtenus permet l'évaluation et l'analyse du polymorphisme apparent. Une des techniques qui dérive de cette méthode est la PCR-RFLP du gène de l'ADNr 16S connu également par l'ARDRA (Gürtler *et al.*, 1991 ; Vaneechoutte *et al.*, 1992). Cette technique est largement utilisée pour l'étude de la diversité génétique ainsi que la classification des rhizobia (Willems et Collins, 1993 ; Laguerre *et al.*, 1994 ; 1997).
- Dans le cas du Southern Blot, l'ADN digéré est soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose puis les fragments obtenus sont sujets à l'hybridation par des sondes spécifiques à travers une membrane de nitrocellulose. Chez les rhizobiums, des sondes dérivés à partir de l'opéron de l'ADNr ont été utilisées (Sadowsky *et al.*, 1990 ; Grimont et Grimont, 1991 ; Eardly *et al.*, 1992).

3. 1. 2. 3 – L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE)

La PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) est un cas particulier de la RFLP. L'ADN est digéré avec des enzymes à faible fréquence de restriction. Par conséquent, les fragments obtenus sont plus faibles en nombre et plus grands en taille. L'analyse électrophorétique de ces fragments se fait par des modifications de la direction de migration à travers des changements successifs du courant. La vitesse de migration et la réorientation des fragments se fait selon leurs tailles respectives (Huber et Selenka-Pobell, 1994 ; Morton *et al.*, 2001).

La PFGE a été utilisée pour la différenciation entre les souches d'une même population de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Corich *et al.*, 1991) et entre les souches nodulant différents arbres légumineux originaires du Sudan (Haukka et Lindström, 1994).

3. 1. 2. 4 – Méthodes utilisant des amorces aléatoires (RAPD, l'AP-PCR , DAF)

La RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) est une technique d'amplification par PCR des séquences aléatoires dispersées sur tout l'ADN génomique. Les amorces utilisées sont courtes, généralement 10 nucléotides, et sont non spécifiques, par conséquent l'amplification génère de nombreux fragments de différentes tailles qui permettent de caractériser une souche de rhizobium d'une autre (Vinuesa *et al.*, 1998).

L'AP-PCR (Arbitrary primed PCR) utilise des amorces arbitraires de 10 à 20 nucléotides (Welsh et McClelland, 1990) alors que la technique DAF (DNA amplification fingerprinting) utilise des amorces dont la taille varie entre 5 et 10 nucléotides (Caetano-Anollés et Gresshoff, 1991).

Ces techniques sont très sensibles aux variations infimes de la concentration de l'ADN, des ions magnésium, de la polymérase et exigent une grande pureté de l'ADN (Berg *et al.*, 1994) ce qui rend leur reproductibilité très limitée.

3. 1. 2. 5 – Le polymorphisme de la longueur des fragments amplifiés (AFLP)

L'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) est l'amplification sélective de fragments de restriction à partir de l'ADN génomique totalement digéré (Vos *et al.*, 1995). La technique de l'AFLP permet une grande résolution génétique et elle est plus reproductible que les autres méthodes (Terefework *et al.*, 2001). Cette technique s'est révélée plus discriminative que l'ARDRA dans le cas des souches de *Bradyrhizobium* (Willems *et al.*, 2001a, b, c).

3. 1. 2. 6 – Les séquences répétitives (REP, ERIC et BOX)

Les séquences répétitives existent en multiples copies dans le génome de la plupart des bactéries Gram négatives et plusieurs Gram positives (Lupski et Weinstock, 1992). Trois types de séquences répétitives ont été identifiés chez les bactéries : des séquences répétitives inversées REP de 35 à 40 pb (Sharples et Lloyd, 1990), des consensus entérobactériens à séquences répétitives intergéniques ERIC de 124 à 127 pb (Hulton *et al.*, 1991) et les éléments BOX de 154 pb (Versalovic et Lupski, 1998). Ces séquences sont localisées en orientation inverse dans des zones distinctes sur le chromosome bactérien. Ces séquences paraissent hautement conservées chez les souches apparentées et très distinctes entre les différentes espèces ou genres bactériens (Versalovic *et al.*, 1991, 1992). L'amplification sélective des régions existant entre ces séquences conservées a été utilisée comme une méthode stable et rapide pour l'identification des bactéries (Versalovic *et al.*, 1998).

L'application de la PCR/REP aux rhizobiums a été initiée par de Bruijn (1992). Ce dernier a utilisé la PCR/REP chez des souches de *S. meliloti* en utilisant des amorces de 18 à 22 pb conçues d'une manière complémentaire aux séquences inversées (Versalovic *et al.*, 1991). Depuis, plusieurs auteurs ont adopté cette méthode (Judd *et al.*, 1993 ; Nick et Lindström, 1994 ; Laguerre *et al.*, 1996 ; Vinuesa *et al.*, 1998). Le point fort de la PCR/REP est que les fragments amplifiés issus d'une cellule cultivée en boîte, d'une préculture, voire même d'un extrait nodulaire, présentent des profils électrophorétiques similaires. Ce qui renforce le caractère stable de cette méthode dans l'étude de la diversité des souches, dans l'identification des bactéries et dans le suivi programmé de souches nouvellement introduites dans le sol (de Bruijn, 1992 ; Schneider et de Bruijn, 1996).

Dans un rapport récent, Rademaker *et al.* (2000) ont comparé la PCR/REP avec l'AFLP et l'hybridation ADN / ADN chez différentes espèces du genre *Xanthomonas*. Ils ont conclu que les différentes techniques ont engendré des résultats comparables et que le pouvoir discriminant des séquences répétitives est obtenu par la combinaison Box, ERIC et REP autrement dit la BER-PCR.

L'analyse génétique des séquences répétitives, en outre sa rapidité et sa stabilité, peut être également utilisée comme un premier moyen dans l'étude des relations taxonomiques et phylogénétiques des rhizobiums (Rademaker *et al.*, 2000).

3. 1. 2. 7 – Les gènes ribosomiques

Les gènes ribosomiques ont été utilisés comme marqueurs moléculaires dans l'étude phylogénétique de différents organismes en raison de leur universalité, leur abondance, leur taille convenable aux analyses comparatives (Ludwig et Schleifer, 1999). En effet, la structure de l'ADN ribosomique est d'une nature mosaïque. En effet, les ADNr contiennent des régions de séquence hautement conservée très utile pour la désignation des amorces (Hillis et Dixon, 1991 ; Stahl et Amman, 1991) et d'autres régions de séquence suffisamment variable pour servir comme un excellent moyen taxonomique (Grimont et Grimont, 1986).

Chez les procaryotes, les gènes codant pour les ARN ribosomiaux sont organisés en opérons appelés opérons *rrn* qui contiennent également des espaces intergéniques ainsi que d'autres gènes codant pour les ARNt (figure 2). Il existe trois types de l'ADN ribosomique : le 5S, le 16S et le 23S (Jensen et Straus, 1993). L'ADNr 5S est très peu utilisé vu sa petite taille d'environ 120 nucléotides, contrairement à l'ADNr 16S codant pour la petite sous unité

ribosomique (SSU : small subunit) d'environ 1500 pb (opéron *rrs* : ribosomal rna small subunit) et l'ADNr 23S codant pour la grande sous unité ribosomique (LSU : Large subunit) d'environ 2500 à 3000 pb (opéron *rrl* : ribosomal rna large subunit) (Gürtler et Stanisich, 1996). L'espace intergène entre ces deux opérons ribosomiques est transcriptionnel d'où la désignation ITS (intergenic transcribed spacer) (Normand *et al.*, 1996).

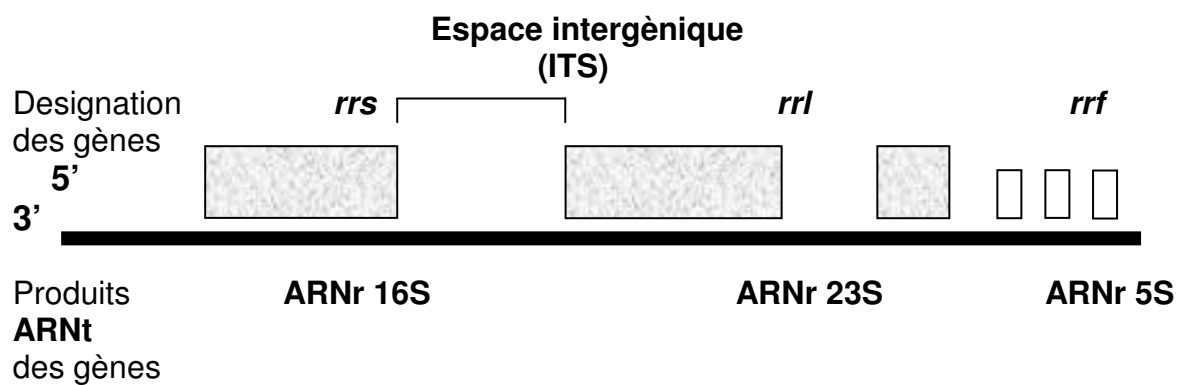


Figure 2. Organisation de l'opéron de l'ADN ribosomique observé chez les procaryotes.

Depuis que Woese (1987) a montré que le gène de l'ADNr 16S est présent chez tous les organismes, qu'il a la même fonction et que sa structure primaire est conservée, plusieurs chercheurs l'ont utilisé comme une approche rapide pour évaluer la variabilité génétique entre les souches de rhizobiums (Laguerre *et al.*, 1994 ; Nour *et al.*, 1994b).

L'usage de l'ADNr 23S a été initialement rapporté par Ludwig et Schleifer (1999). Un degré de divergence génétique plus important peut être également obtenu à partir de l'analyse de l'ITS situé entre les gènes de la SSU et de la LSU (Hillis et Dixon, 1991 ; van Berkum et Fuhrmann, 2000).

3. 1. 2. 8 – Les gènes symbiotiques

3. 1. 2. 8. 1 - Les gènes *nif*

Les gènes *nif* existent chez plusieurs bactéries dont les rhizobiums (Young et Haukka, 1996). Ces gènes codent pour la nitrogénase réductase. La phylogénie des gènes *nif H* a été rapportée comme étant en parfait accord avec celle qui dérive de l'analyse du gène de l'ADNr 16S (Hennecke *et al.*, 1985 ; Dobert *et al.*, 1994), en dépit de quelques exceptions (Eardly *et al.*, 1992). Ces dernières ont été supposées être dues aux recombinaisons génétiques et au transfert latéral des gènes *nif* (Martinez-Romero et Cabarello-Mellado, 1996).

Récemment, Haukka *et al.* (1998) ont comparé plusieurs séquences et ont conclu que la phylogénie résultant du gène *nif H* est différente de celle de l'ADNr 16S mais plutôt similaire à celle du gène *nod A*. Ce dernier résultat est plus logique du fait que les gènes *nif* et *nod* sont étroitement liés et sont tous les deux localisés sur des éléments transmissibles tels que les

plasmides chez beaucoup d'espèces de rhizobiums ou comme des transposons chez *Mesorhizobium loti* (Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan et Ronson, 1998). Plus de variabilité a été également révélée par l'analyse de l'espace intergénique existant entre les gènes *nif D* et *nif K* (Laguerre *et al.*, 1996).

3. 1. 2. 8. 2 – Les gènes *nod*

Les interactions entre les plantes légumineuses et les rhizobiums varient en degré de spécificité (Räsänen *et al.*, 1991 ; Pueppke et Broughton, 1999). Cette spécificité est déterminée par plusieurs éléments dont principalement les facteurs Nod codés par les gènes *nod*. 13 gènes de nodulation ont été déterminés : le *nod D* qui est un gène régulateur et les opérons *nod ABCIJ*, *nod FEL*, *nod MNT* et le *nod O* (Perret *et al.*, 2000). La localisation des gènes *nod* varie entre les rhizobiums, elle peut être soit au niveau chromosomique, soit au niveau plasmidique dans la majorité des cas (Mercado-Blanco et Toro, 1996). Le transfert latéral de ces gènes entre différentes espèces de rhizobiums est bien évident par plusieurs études (Ueda *et al.*, 1995 ; Lorenz et Wackernagel, 1994). Les arbres phylogénétiques basés sur l'analyse des séquences des gènes *nod* se sont révélés différents de ceux de l'ADNr 16S, mais ils montrent toutefois des corrélations informatives avec les spectres d'hôtes (Haukka *et al.*, 1998 ; Wernegreen et Riley, 1999 ; Suominen *et al.*, 2001).

3. 1. 2. 9 – Le séquençage

Les améliorations des techniques du séquençage partiel ou total de gènes ont pu renforcer son usage dans l'étude de la taxonomie bactérienne. La séquence la plus largement utilisée chez les rhizobiums est celle de l'ADNr 16S (Weisburg *et al.*, 1991). L'utilisation de la variation de la séquence de l'ADNr 16S pour un but taxonomique suppose que l'évolution du génome progresse à un taux constant et que les gènes sont hérités de manière stricte d'une génération à une autre sans aucun transfert latéral. L'élucidation de ce fait par van Berkum *et al* (2003) s'est basée sur la comparaison des séquences de l'ADNr 16S, de l'ADNr 23S et du ITS 16S-23S. Des analyses standard informatisées ont été exécutées et les données des séquences ont été utilisées pour construire des arbres phylogénétiques. Les résultats ont montré que les séquences de l'ITS et de l'ADNr 23S fournissent des résultats différents de ceux obtenus avec l'ADNr 16S. Les trois ensembles de données ont produit trois arbres distincts qui ont été impossible à combiner dans un seul arbre. Selon van Berkum *et al* (2003), cette hétérogénéité pourrait être due à des événements de conversions génétiques au sein des régions à séquences variables de l'opéron *rrn*.

En 1994, Huber et Selenka-Pobell ont rapporté l'existence de multiples opérons *rrn* chez les rhizobiums. Plusieurs copies de l'ADNr 16S peuvent exister chez les souches de la même espèce, voire même au sein de la même souche (Young et Haukka, 1996).

Les données des séquences de l'ADNr 16S reste à nos jours, le moyen le plus simple et le plus rapide pour l'étude phylogénétique des rhizobiums. Toutefois, plusieurs recherches ont été entamées dans le but d'évaluer les données de séquences à partir d'autres gènes tels que le *gln A*, le *nod C*, et le *rec A* (Laguerre *et al.*, 2001).

3. 1. 2. 10 – L'hybridation des acides nucléiques

Le taux d'homologie des acides nucléiques a été largement utilisé chez les rhizobiums (Jarvis *et al.*, 1980 ; Hollis *et al.*, 1981 ; Scholla *et al.*, 1984). Les valeurs d'homologie ADN / ADN sont utilisés pour identifier le degré de similitude entre des organismes apparentés, alors que les valeurs d'homologie ARN / ADN sont couramment utilisées pour évaluer les similitudes entre des organismes distincts (van Berkum et Eardly, 2003). Il a été convenu que l'hybridation ADN / ADN avec une valeur de 70% ou plus et une ΔT_m (stabilité thermique des hybrides) de 5% ou moins, devient une base standard pour la description de nouveaux genres ou d'espèces de rhizobiums (Graham *et al.*, 1991). Par conséquent, l'analyse de l'hybridation moléculaire est devenue un moyen permettant d'étudier les relations phylogénétiques entre les rhizobiums (van Berkum *et al.*, 1993) et d'élucider la position taxonomique de différentes souches ou d'espèces au sein des genres de rhizobiums connus (Willems *et al.*, 2001a).

3. 1. 2. 11 – Les plasmides

Chez les bactéries, une proportion significative du génome est composée par les plasmides (Teyssier *et al.*, 2004). Ceux-ci font partie d'un ensemble d'éléments génétiques transmissibles qui peuvent être transmis verticalement par le phénomène de la réplication ou horizontalement par conjugaison (Johston *et al.*, 1978 ; Djordjevic *et al.*, 1983). La plasticité génétique conférée par le flux horizontal des gènes joue un rôle principal dans la diversification des populations bactériennes (Ochman *et al.*, 2000). Les plasmides portent des gènes essentiels comme ceux de la synthèse des toxines, de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds, de la nodulation et de la fixation symbiotique, etc. (Downie et Young, 2001 ; Barnett *et al.*, 2001).

Chez les rhizobiums, les gènes symbiotiques tels que les gènes *nif*, *nod* et *fix* sont généralement portés sur des mégaplasmides appelés plasmides symbiotiques (pSym ou plasmide Sym). La taille et le nombre des mégaplasmides varient entre les espèces (Hartmann et Amarger, 1991 ; Perret *et al.*, 2000).

L'évidence du transfert latéral du pSym chez les populations du sol a été démontrée entre les souches d'une même espèce dans le cas de *R. leguminosarum* (Schofield *et al.*, 1987), entre deux espèces différentes dans le cas de *R. leguminosarum* et *Sinorhizobium fredii* (Kinkle et Schmidt, 1991), voire même entre des genres différents dans le cas de *R. leguminosarum* et *Enterobacter* (Dohler et Klingmuller, 1988). Cette instabilité plasmidique peut résulter à la perte ou au gain de la performance symbiotique (Martinez-Romero *et al.*, 1991 ; Zhang *et al.*, 2001).

La comparaison des séquences de plusieurs pSym a montré que les différents gènes portés par les plasmides peuvent avoir des origines bien différentes (Freiberg *et al.*, 1997). Les séquences totales du pSym de *Sinorhizobium* sp. NGR 234 (Freiberg *et al.*, 1997), de *Mesorhizobium loti* (Kaneko *et al.*, 2000) et de *Sinorhizobium meliloti* (Galibert *et al.*, 2001) ont été récemment publiées.

3. 1. 3 – Autres marqueurs

L'étude de la diversité des rhizobia emploie également d'autres marqueurs dont les plus couramment utilisés sont décrits ci-dessous,

3. 1. 3. 1 - Analyse des protéines cellulaires totales par SDS-PAGE

L'isolement des protéines cellulaires purifiées est une étape critique dans cette analyse. L'ensemble des protéines isolées est analysé par électrophorèse sur un gel d'acrylamide en conditions dénaturantes par la présence du SDS.

La SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) des protéines totales a été utilisée dans l'étude taxonomique de plusieurs souches de rhizobia très rapprochées (Moreira *et al.*, 1993 ; Vandamme *et al.*, 1996). Cette méthode permet l'étude de la diversité qui existe entre les souches avec un pouvoir de résolution allant du niveau souche à espèce. Dans le cas des rhizobia d'arbres légumineux telles que les acacias du sahel, cette technique s'est révélée très fiable comme un marqueur de discrimination entre les souches (de Lajudie *et al.*, 1994 ; Dupuy *et al.*, 1994).

3. 1. 3. 2 – Le polymorphisme enzymatique (MLEE)

Par la MLEE (Multilocus enzyme electrophoresis), plusieurs enzymes solubles peuvent être analysées (Selander *et al.*, 1986). L'évaluation de la variabilité enzymatique nécessite en premier lieu la culture de la bactérie en quantité suffisante pour l'extraction du culot protéique. Cette étape présente un inconvénient pour les bactéries ayant un taux de croissance assez long. La deuxième étape consiste à l'isolement d'un enzyme déterminé chez les différentes bactéries à analyser, la migration par électrophorèse SDS-PAGE, puis la révélation du polymorphisme par réaction colorée. Les différents types obtenus reflètent les variations relatives à chaque enzyme (Barrera *et al.*, 1997).

Les profils isoenzymatiques ont été analysés chez différents rhizobia pour estimer la diversité génétique qui existe entre les souches à croissance rapide et celles à croissance lente (Young, 1985) et entre les rhizobia appartenant à la même espèce telle que *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* (Pintero *et al.*, 1988) et *Rhizobium meliloti* (Eardly *et al.*, 1990).

3. 1. 3. 3 - Analyse des acides gras

Les acides gras sont les constituants majeurs de plusieurs variétés de lipides et de lipopolysaccharides. Ils ont été largement utilisés dans l'étude de la taxonomie bactérienne (Vandamme *et al.*, 1996).

- L'analyse des acides gras cellulaires ou FAME (fatty acid methyl esters) chez des souches de *Bradyrhizobium japonicum* a montré des résultats en concordance avec ceux de l'homologie ADN / ADN (Kuykendall *et al.*, 1988). Cette technique est largement décrite par Graham *et al* (1995).
- Les lipopolysaccharides présents au niveau de la membrane externe des bactéries Gram négatives peuvent être caractérisés par SDS-PAGE (de Maagd *et al.*, 1988). L'analyse des LPS a permis d'obtenir une bonne évaluation de la diversité qui existe entre différentes souches de *Rhizobium leguminosarum* (Cava *et al.*, 1989), de *Rhizobium* sp. (*Galegae*) (Lipsanen et Lindstrom, 1989) et des rhizobia nodulant différentes espèces d'acacia existantes au Maroc (Berkia, 2004).

3. 1. 3. 4 – La sérologie

La diversité sérologique chez les rhizobiums a été largement étudiée (Caldwell et Vest, 1968 ; Weber *et al.*, 1989 ; Fuhrmann, 1990). Les tests sérologiques sont basés sur des techniques

immunologiques utilisant des anticorps poly- ou monoclonaux et permettent l'identification des souches suivant des réactions d'immunoagglutination anticorps-antigènes. Ces réactions sont évaluées par immunodiffusion sur gel (Dudman, 1971), par immunofluorescence (Bohlool, 1987) et généralement par spectrophotométrie ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay).

L'évaluation de la spécificité sérologique est d'un grand intérêt dans l'étude écologique des rhizobiums (Keyser et Cregan, 1987 ; Damigri *et al.*, 1967). La variation sérologique chez les *Bradyrhizobium* nodulant *Glycine max* a permis la description de 17 sérogroupes différents (Date et Decker, 1965), ce qui indique une diversité génétique assez importante.

D'autres marqueurs phénotypiques sont relativement peu utilisés, tels que l'analyse des polyamines (Tabor et Tabor, 1985), la composition et la structure des peptidoglycans (Schleifer et Kandler, 1972), l'analyse des quinones membranaires (Collins, 1994), la production des rhizobitoxines (Fuhrmann, 1990), et le phage typing (Bromfield *et al.*, 1986).

3. 1. 4 – Etude polyphasique

Le terme de taxonomie polyphasique a été initié par Colwell (1970) cité par Nick (1998). A l'époque, la classification était basée sur la comparaison de différentes analyses phénotypiques et biochimiques. Cependant la révolution de différentes techniques moléculaires durant les vingt dernières années dont principalement la PCR (Mullis et Faloona, 1987) a permis la révision de l'application de la terminologie polyphasique. Ainsi, Graham *et al.* (1991) ont proposé les principes standard de la description de nouveaux genres ou d'espèces sur la base de l'analyse numérique qui est la synthèse des résultats de différents tests phénotypiques et moléculaires. Cette nouvelle définition de l'approche polyphasique a permis l'étude systématique appropriée de grands groupes bactériens, l'évaluation de la résolution taxonomique de différentes techniques (Vandamme *et al.*, 1996) (figure 3) et l'établissement de bases de données comparables entre différents laboratoires de microbiologie appliquée (Gillis *et al.*, 2001).

4 – TAXONOMIE ET PHYLOGENIE DES RHIZOBIA

4. 1 – Taxonomie ou systématique des rhizobiums

La taxonomie a pour but de rassembler des organismes partageant des caractéristiques communes en groupes ou taxons bien délimités. Les groupes sont définis selon trois études, l'identification, la nomenclature et la classification. La première nécessite l'isolement de la bactérie, sa caractérisation par des analyses phénotypiques et moléculaires universelles et la comparaison des caractères à ceux des bactéries connues. La deuxième consiste à donner un nom spécifique à la bactérie identifiée selon le Code International de Nomenclature Bactérienne qui comporte le nom du genre et de l'espèce. Tout genre doit être représenté par une espèce type et toute espèce doit être représentée par une souche type.

	Famille	Genre	Espèce	Souche
Marquage aux sondes d'ADN	■	■	■	■
Séquençage de l'ADN	■	■	■	■
Analyse phénotypique (classique, API, etc.)	■	■	■	■
Séquençage de l'ARN	■	■	■	■
Hybridation ADN : ARNr	■	■	■	■
Analyse chimiotaxonomique (polyamines, quinones, etc.)	■	■	■	■
FAME	■	■	■	■
Hybridation ADN : ADN	■	■	■	■
PCR/ARNr	■	■	■	■
% en G+C	■	■	■	■
RFLP – ARDRA	■	■	■	■
RAPD – DAF – APPCR	■	■	■	■
AFLP	■	■	■	■
Rep-PCR	■	■	■	■
Analyse des protéines cellulaires totales	■	■	■	■
Polymorphisme des isoenzymes	■	■	■	■
Phage typing	■	■	■	■

MLEE



Sérologie



Figure 3. Résolution taxonomique des différentes techniques utilisées pour l'étude de la diversité des rhizobiums (D'après Vandamme *et al.*, 1996 et de Bruijn *et al.*, 1997).

Par exemple, le genre *Bradyrhizobium* est représenté par l'espèce *Badyrhizobium japonicum* qui elle même est représentée par la souche USDA 110. La classification permet de regrouper les espèces par des approches moléculaires en niveaux taxonomiques plus élevés, du genre à la famille puis à l'ordre.

Les rhizobiums sont reconnus comme étant des bactéries fixatrices d'azote, Gram négatives, aérobiques et présentes soit à l'état libre et en général dans le sol soit en association avec des légumineuses. Ils appartiennent à la sous classe alpha des protéobactéries de la grande classe des eubactéries (Maidak *et al.*, 1994).

Les rhizobiums ont été antérieurement définis comme des micro-organismes symbiotiques capables de former des nodosités au niveau du système racinaire des légumineuses. Frank (1879) a rapporté que ces micro-organismes étaient des champignons en leur affectant le nom de *Schinzia leguminosarum*. En 1888, Hellriegel et Willfarth ont fourni une explication scientifique pour la fixation biologique de l'azote. Dans la même année, Beyerinck (1888) a pu isoler une bactérie d'une plante légumineuse et l'a nommée *Bacillus radicolica*. Par la suite, le bacille a été renommé *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889). Baldwin et Fred (1929) ont rapporté que la classification des différents rhizobiums devrait être basée sur la spécificité de l'espèce bactérienne par rapport à la plante hôte. Ainsi, Fred *et al.* (1932) ont pu identifier six groupes de nodulation croisée, *Rhizobium leguminosarum* pour *Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia* et *Lens* ; *R. trifolii* pour *Trifolium* ; *R. phaseoli* pour *Phaseolus* ; *R. meliloti* pour *Glycine max* et *R. lupini* pour *Lupinus*. Cette première classification a connu par la suite plusieurs critiques (Wilson, 1944).

Lohnis et Hansen (1921) ont montré que les rhizobiums présentent une croissance soit lente soit rapide dans le milieu synthétique. Le concept du taux de croissance a été repris par Norris (1965) qui a défini en plus le critère de l'affinité symbiotique. Selon l'auteur, les bactéries à

croissance lente n'acidifient pas le milieu de culture et nodulent les légumineuses des régions tropicales, alors que les bactéries à croissance rapide acidifient le milieu de culture et nodulent les légumineuses des régions tempérées. Cependant, plusieurs contre-exemples ont été rapportés. Ainsi, *Lupinus* et *Corallina* qui sont des légumineuses des régions tempérées, sont nodulées par des bactéries à croissance lente (Allen *et al.*, 1981). *Sesbania* et *leucaena* qui sont des légumineuses des régions tropicales, sont nodulées par des bactéries à croissance rapide (de Lajudie *et al.*, 1994). Des bactéries à taux de croissance différents peuvent être également isolées à partir d'une même espèce comme *glycine max* (Scholla et Elkan, 1984), voire même de la même plante comme *Acacia*. En fait, *Acacia* peut être nodulée par des *Rhizobium* (Barnet *et al.*, 1993), des *Bradyrhizobium* (Dupuy *et al.*, 1994) et par des *Sinorhizobium* (de Lajudie *et al.*, 1994).

Les observations discordantes entre la croissance de la bactérie et la gamme d'hôte ont jeté le doute sur la validité de cette classification. Toutefois, sur la base du taux de croissance, Jordan (1982) a pu classer les rhizobia en deux genres, le genre *Rhizobium* pour les souches à croissance rapide et le genre *Bradyrhizobium* pour les souches à croissance lente.

Plusieurs méthodes comparatives comme la sérologie, SDS-PAGE des isoenzymes ou des protéines totales, FAME, le coefficient de Chargaff, l'hybridation ARN / ADN ou ADN / ADN, et l'analyse des plasmides ont été adoptées pour la classification des rhizobiums. Mais ce n'est qu'après l'identification en 1987 par Woese que les ADNr 16S des bactéries sont spécifiques à ces bactéries que la taxonomie des rhizobiums s'est considérablement modifiée. La première séquence partielle de l'ADNr 16S a été publiée par Young *et al.* (1991) pour la souche *Rhizobium* BTAi1.

Graham *et al.* (1991) ont rapporté que la description de toute nouvelle espèce doit se baser sur l'analyse génétique (Séquence de l'ADNr, homologie ADN / ADN) ainsi que sur l'analyse numérique. La combinaison de ces deux analyses a été ensuite reconnue sous le nom de l'approche polyphasique qui est retenue jusqu'à nos jours pour établir la taxonomie des rhizobiums.

4. 2 – Phylogénie des rhizobiums

La phylogénie est l'histoire évolutive qui révèle les rapports existants entre un groupe d'organismes avec un ancêtre situé à un plus haut niveau taxonomique.

La comparaison des données obtenues pour les souches ou les espèces par différentes approches moléculaires permet l'identification de groupes ou de taxons. Les différents taxons obtenus peuvent alors être comparés et utilisés pour le traçage de lignées de filiation reconnues communément sous le nom d'arbre phylogénétique.

Les relations phylogénétiques établies entre les rhizobiums sont à nos jours basées principalement sur la comparaison des séquences de l'ADN ribosomique 16S (Olsen *et al.*, 1994) (figure 4).

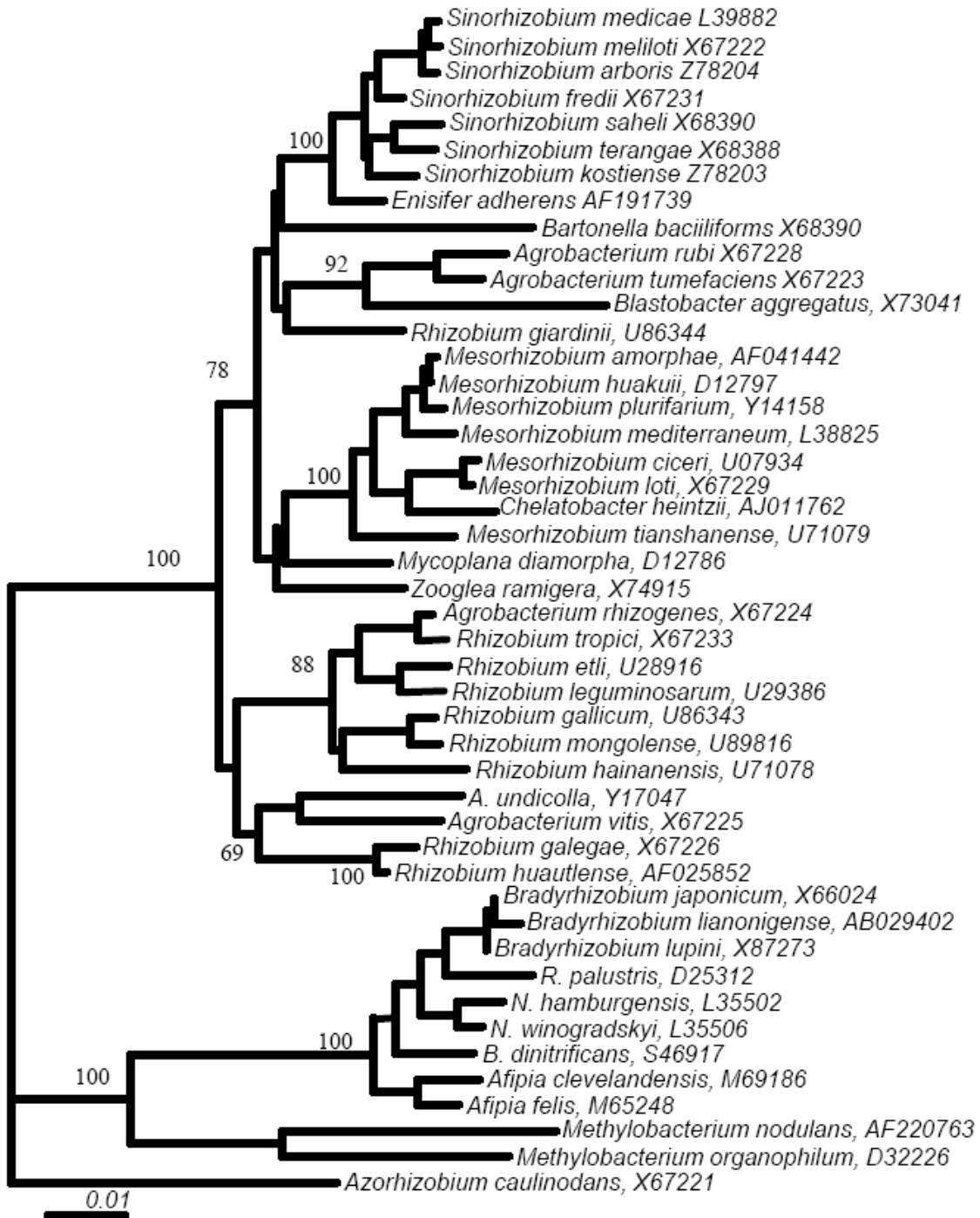


Figure 4. Arbre phylogénétique des rhizobiums et d'espèces apparentées construite par la méthode du neighbor joining à partir de la séquence complète de l'ADNr 16S (Terefework et al., 1998)

La séquence de l'ADNr 16S est une base fiable pour la classification des espèces à des niveaux plus élevés, mais elle est peu informative aux niveaux souches et individus (Willems *et al.*, 2001b). A ces niveaux, l'hybridation de l'ADN génomique s'avère nécessaire.

Les lignées évolutives évaluées sur la base des séquences de l'ADNr 16S des différents genres reconnus des *Rhizobiaceae* ne semblent guère être monophylétiques. Ces lignées regroupent d'autres bactéries (Sawada *et al.*, 2003) telles que *Methylobacterium nodulans* (Sy *et al.*, 2001 ; Knösel, 1984), *Ralstonia taiwanensis* (Chen *et al.*, 2001), *Devosia neptuniae* et *Burkholderia* qui appartiennent à la sous-classe des β - protéobactéries (Moulin *et al.*, 2001).

Il a été rapporté que la phylogénie établie actuellement pour les *Rhizobiaceae* ne peut pas refléter la vraie phylogénie de la famille parce qu'un seul gène (ADNr 16S) ne constitue pas une base suffisante pour représenter le génome entier (van Berkum *et al.*, 2003). En outre, une seule portion des rhizobiums, celles ayant la capacité à former des nodosités, a été jusqu'à lors analysée. Cette portion ne peut pas être représentative de la population totale présente dans le sol (Bromfield *et al.*, 1995 ; Palmer et Young, 2000).

La phylogénie des rhizobiums ne peut pas cependant refléter les traits symbiotiques impliqués dans la spécificité de l'hôte à cause de la difficulté à établir la gamme d'hôte vu le grand nombre d'espèces de légumineuses (Laguerre *et al.*, 2001 ; Debellé *et al.*, 1997) mais aussi à cause du transfert latéral des gènes symbiotiques (Smalla *et al.*, 2000) qui engendre soit l'acquisition soit la perte de la capacité symbiotique (Young et Haukka, 1996 ; Amabile-Cuevas et Chicure, 1992).

Petes et Hill (1988) ont rapporté que l'établissement des cartes génétiques ainsi que la reconnaissance des fréquences de recombinaisons génétiques entre les différents genres ou espèces de rhizobia pourrait approfondir la base pour une systématique plus fiable. Selon Martinez-Romero et Caballero-Mellado (1996), les organismes apparentés doivent avoir en plus de la similitude nucléotidique des séquences de gènes bien définis, une organisation des gènes et une taille chromosomique similaire, en d'autres termes des cartes génétiques très rapprochés.

De nos jours, l'usage de la séquence de l'ADNr 16S reste l'outil principal dans l'étude de la phylogénie microbienne. Cependant, de nouvelles techniques moléculaires sont récemment adoptées. Les plus utilisées sont : la technique FT-IR (Fourier-transform infrared spectroscopy) qui permet d'étudier la diversité des bactéries au niveau intraspécifique

(Oberreuter *et al.*, 2002), la technique du typage par PCR ciblé (target PCR fingerprinting) (Perret et Broughton, 1998) et surtout la technique des puces à ADN communément appelée DNA microarrays. Dans cette dernière technique, la conception des puces permet de détecter simultanément des milliers de séquences voire même recouvrir l'intégralité du génome d'un organisme (Shalon *et al.*, 1996). Par la même technique, Rüberg *et al.* (2003) ont pu analyser la totalité du génome de *Sinorhizobium meliloti*. L'ensemble de ces techniques peuvent révéler plus d'information sur la diversité des rhizobia et peuvent donc fournir plus de données qui seront disponibles pour l'étude de la phylogénie.

4. 3 – Classification actuelle des rhizobiums

Les différentes espèces reconnues des rhizobiums (tableau 1) sont fondues dans les genres décrits ci-dessous.

4. 3. 1 - *Allorhizobium*

Le nom *Allorhizobium* qui signifie autres rhizobia, a été proposé par de Lajudie *et al.* (1998a) comme étant un genre non spécifique. La souche type de ce groupe est *Allorhizobium undicola* qui a été isolée à partir d'une légumineuse tropicale endémique du Sénégal : *Neptunia natans*. La souche montre un linéage distinct dans le cluster formé par *Rhizobium* et *Agrobacterium* dans l'arbre phylogénétique avec un fort rapprochement d'*Agrobacterium vitis* (Young *et al.*, 2001 ; Kuykendall et Dazzo, 2003).

4. 3. 2 - *Azorhizobium*

Azorhizobium caulinodans est la seule espèce reconnue de ce genre. Elle se distingue par une croissance rapide et la présence d'un seul flagelle latéral. De plus, elle nodule non seulement les parties racinaires mais aussi les parties aériennes de *Sesbania rostrata* (Dreyfus *et al.*, 1988). Une seconde espèce *Azorhizobium johannae* a été proposée (Rinaudo *et al.*, 1991). Cette souche est caractérisée par un faible taux d'hybridation ADN / ADN par rapport à la souche type du genre. L'analyse des séquences de l'ADNr 16S a montré que la souche type se trouve entre-mélangée avec des souches du genre *Xanthobacter* et *Aquabacter*. Le regroupement de ces deux derniers genres avec *Azorhizobium* a été examiné sans être cependant proposé en raison de la grande dissimilitude des caractères phénotypiques (Trinick, 1980 ; Kuykendall *et al.*, 2004a).

Tableau 1. Classification actuelle des différentes espèces de rhizobia.

Genres	Espèces	Plantes hôtes	Références
<u>Allorhizobium</u>			
	<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998a
<u>Azorhizobium</u>			
	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988
<u>Bradyrhizobium</u>			
	<i>Br. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>	Jordan, 1982, 1984
	<i>Br. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	Kuykendall <i>et al.</i> , 1992
	<i>Br. liaoningensis</i>	<i>Glycine max</i>	Xu <i>et al.</i> , 1995
	<i>Br. Yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>	Yao <i>et al.</i> , 2002
	<i>Br. betae</i>	<i>Betae vulgaris</i>	Rivas <i>et al.</i> , 2004
	<i>Br. canariense</i>	-	Vinuesa <i>et al.</i> , 2005
<u>Mesorhizobium</u>			
	<i>M. loti</i>	<i>Lotus, Cicer, Anthyllis, Astragalus, etc.</i>	Jarvis <i>et al.</i> , 1982
	<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Chen <i>et al.</i> , 1991
	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1994a
	<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	Chen <i>et al.</i> , 1995
	<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1995
	<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia, Chamaecrista, Leucaena, Prosopis,</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998b
	<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang <i>et al.</i> , 1999a
	<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	Velasquez <i>et al.</i> , 2001
	<i>M. sespentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao <i>et al.</i> , 2004
	<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao <i>et al.</i> , 2004
<u>Rhizobium</u>			
	<i>R. leguminosarum</i>		
	biovar <i>viciae</i>	<i>Pisum, viciae, Lens, Lathyrus</i>	Frank, 1889, Jordan, 1984
	biovar <i>trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Frank, 1889, Jordan, 1984
	biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Frank, 1889, Jordan, 1984
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega, Leucaena</i>	Lindström, 1989
	biovar <i>officinalis</i>		
	biovar <i>orientalis</i>		
	<i>R. tropici</i> type IIA et IIB	<i>Phaseolus, Medicago, Macroptilium, etc.,</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus,</i>	Segovia <i>et al.</i> , 1993
	biovar <i>mimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i>	Wang <i>et al.</i> , 1999b
	<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997
	biovar <i>phaseoli</i>		
	biovar <i>gallicum</i>		
	<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997
	biovar <i>phaseoli</i>		
	biovar <i>giardinii</i>		
	<i>R. hainanensis</i>	<i>Desmodium sinuatum, Centrosema, etc.</i>	Chen <i>et al.</i> , 1997
	<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	Wang <i>et al.</i> , 1998
	<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica, Phaseolus</i>	Van Berkum <i>et al.</i> , 1998
	<i>R. yanglingense</i>	-	Tan <i>et al.</i> , 2001
	<i>R. larrymoorei</i>	<i>Ficus benjamina</i>	Bouzar et Jones, 2001
	<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera spp.</i>	Wei <i>et al.</i> , 2002
	<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum</i>	Squartini <i>et al.</i> , 2002
	<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus, Lespedeza</i>	Wei <i>et al.</i> , 2003

Sinorhizobium

<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>	Dangeard, 1926
<i>S. fredii</i>		
biovar <i>fredii</i>	<i>Glycine, Vigna, Cajanus</i>	Scholla et Elkan. 1984
biovar <i>siensis</i>	<i>Glycine</i>	Chen <i>et al.</i> , 1988
<i>S. saheli</i>	<i>Acacia, Prosopis, Neptunia, Leucaena</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
<i>S. teranga</i>		de Lajudie <i>et al.</i> , 1994
biovar <i>acaciae</i>	<i>Acacia</i>	Lorquin <i>et al.</i> , 1997a
biovar <i>sesbania</i>	<i>Sesbania</i>	Lorquin <i>et al.</i> , 1997b
<i>S. medicae</i>	<i>Medicago truncatula, Melilotus</i>	Rome <i>et al.</i> 1996
<i>S. arboris</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	Nick <i>et al.</i> , 1999
<i>S. kostiense</i>	<i>Acacia, Prosopis</i>	Nick <i>et al.</i> , 1999
<i>S. xingianense</i>	<i>Glycine max</i>	Chen <i>et al.</i> , 1995
<i>S. morelense</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	Wang <i>et al.</i> , 2002.
<i>S. kummerowiae</i>	<i>Kummerowiae stipulaceae</i>	Wei <i>et al.</i> , 2002
<i>S. americanum</i>	<i>Acacia</i>	Toledo <i>et al.</i> , 2003

4. 3. 3 - *Bradyrhizobium*

L'identification de souches à croissance lente remonte à 1932 (Fred *et al.*) mais leur classification en un seul genre *Bradyrhizobium* a été établie par Jordan en 1982. Plusieurs espèces sont à nos jours reconnues, *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982), *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992) et *Bradyrhizobium liaoningense* (Xu *et al.*, 1995). Ces trois espèces nodulent le soja. Elles ont été ainsi classées sur la base des hybridations ADN / ADN et sur d'autres critères génétiques et phénotypiques. La dernière espèce a été décrite pour les souches à croissance très lente.

Par ailleurs d'autres souches nodulant des légumineuses autres que le soja, telles que *Lupinus* (Barrera *et al.*, 1997), *Arachis hypogea* (Urtz et Elkan, 1996), *Astragalus*, *Oxytropis* et *Onobrychis* (Laguerre *et al.*, 1997), *Amphicarpaea* (Sterner et Parker, 1999) et autres sont encore non classées. Aussi sont-elles désignées par *Bradyrhizobium* sp. suivi du genre de la plante hôte entre parenthèses.

Plusieurs auteurs ont rapporté l'existence de souches photosynthétiques appartenant au genre *Bradyrhizobium*. Ces souches ont été isolées à partir des tiges de l'espèce *Aeschynomene indica*. Depuis, plusieurs souches ont été isolées à partir d'autres espèces d'*Aeschynomene* (Ladha *et al.*, 1990 ; Lorquin, 1997b ; Giraud *et al.*, 2000). Toutes ces souches forment un groupe monophylétique au sein de la branche des bradyrhizobia (Young *et al.*, 1991 ; Molouba *et al.*, 1999).

Les bradyrhizobia sont groupés dans une branche bien individualisée dans l'arbre phylogénétique des bactéries symbiotiques (Sawada *et al.*, 2003). Toutefois, d'autres genres de bactéries non symbiotiques présentent des séquences de l'ADNr 16S qui les positionnent dans la même branche, c'est le cas de *Nitrobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Brucella*, *Afipia* et *Blastobacter* (Martinez-Romero et Cabarello-Mellado, 1996). Certains de ces genres présentent des caractéristiques bien particulières telles que la photosynthèse (cas de *Rhodopseudomonas*) et le pouvoir pathogène (cas d'*Afipia*) (Wong *et al.*, 1994).

La caractérisation de différentes souches de *Bradyrhizobium* par la comparaison de plusieurs techniques moléculaires a révélé l'existence de 11 géotypes différents dont trois correspondent aux souches reconnues, alors que les 8 géotypes restants sont très distincts (Willems *et al.*, 2001a, b, c).

Une nouvelle espèce *Br. yuanmingene* a été récemment isolée du genre *Lespedeza* (Yao *et al.*, 2002 ; Euzéby et Findall, 2004). Dans la même année, une souche de *Bradyrhizobium* nodulant une plante sauvage du genre *Phaseolus* a été rapportée (Parker, 2002). Les autres espèces reconnues de ce groupe sont *Bradyrhizobium betae* (Rivas *et al.*, 2004) et *Bradyrhizobium canariense* (Vinuesa *et al.*, 2005).

4. 3. 4 - *Mesorhizobium*

Ce groupe se distingue des autres rhizobiums par une flagellation polaire ou sub- polaire, par des souches à croissance intermédiaire entre celles à croissance rapide et celles à croissance lente, et par la séquence de l'ADNr 16S. Plusieurs espèces ont été proposées:

- *Mesorhizobium loti* (Jarvis *et al.*, 1982) a été isolée d'une large gamme d'hôtes, *Lotus*, *Lupinus*, *Anthyllis*, *Astragalus*, *Caragena*, *Ononis*, *Genista*, *Cicer*, *Leucaena* et *Ornithopus* (Sahgal et Johri, 2003).
- *Mesorhizobium huakuii* (Chen *et al.*, 1991) a été isolée à partir d'*Astragalus* mais elle peut aussi noduler d'autres légumes.
- *Mesorhizobium ciceri* (Nour *et al.*, 1994a) nodule strictement le pois chiche.
- *Mesorhizobium tianshanense* (Chen *et al.*, 1995) décrit un ensemble de souches très rapprochées issues de la province xinjiang en Chine. Une seule partie de l'ADNr 16S a été séquencée et s'est révélée identique à celle de *M. ciceri*. Cependant, l'hybridation ADN : ADN a révélé 60% d'homologie avec *Mesorhizobium huakuii*.
- *Mesorhizobium mediterraneum* (Nour *et al.*, 1995) nodule également le pois chiche, mais présente des caractéristiques différentes par rapport à *M. ciceri*.
- *Mesorhizobium plurifarium* (de Lajudie *et al.*, 1998b) a été isolé d'*Acacia*, *Leucaena*, *Prosopis* et *Chamaecrista*.
- *Mesorhizobium amorphae* (Wang *et al.*, 1999a) a été isolée d'*Amorpha fruticosa*.
- *Mesorhizobium chacoense* (Velásquez *et al.*, 2001) a été isolée de *Prosopis alba*.
- *Mesorhizobium septentrionale* (Gao *et al.*, 2004) a été isolée d'*Astragalus adsurgens*
- *Mesorhizobium temperatum* (Gao *et al.*, 2004) a été isolée également d'*Astragalus adsurgens*.

Les espèces du genre *Mesorhizobium* forment avec d'autres espèces des genres *Aminobacter* et *Pseudoaminobacter* un seul groupe monophylétique (Sawada *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2004).

4. 3. 5 – *Rhizobium*

Rhizobium leguminosarum a été la première espèce reconnue du groupe (Frank, 1889) avec trois biovars (Jordan, 1984) : *Rhizobium leguminosarum* Biovar *viciae* qui nodule les genres *Pisum*, *Viciae*, *Lathyrus* et *Lens* ; *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* qui nodule le genre *Phaseolus* et *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* qui nodule le genre *Trifolium*. Chez cette espèce, il est important de signaler que les gènes de fixation, de nodulation ainsi que ceux de la spécificité de l'hôte sont localisés au niveau du plasmide, par conséquent la désignation biovar reflète des caractéristiques plasmidiques et non chromosomiques.

Rhizobium tropici a été décrite par Martinez-Romero *et al.* (1991) sous deux types : type I et type II. Les souches du type II forme des nodosités sur les racines de *Phaseolus vulgaris*, *Leucaena esculenta* et *Leuceana leucocephala*. Les souches du type I ont été reclassées par Segovia *et al.* (1993) sous le nom de *Rhizobium etli*. Les souches de ce nouveau genre ont été reconnues pour noduler exclusivement l'espèce *Phaseolus vulgaris*. Cependant un nouveau biovar a été isolé à partir de *Mimosa* sp. et a été nommé par conséquent *Rhizobium etli* biovar *mimosae* (Wang *et al.*, 1999b).

Rhizobium galegae biovar *orientalis* et biovar *officinalis* ont été isolées respectivement de *Galega orientalis* et *Galega officinalis* (Lindstrom, 1989). Cette espèce présente un ADNr 16S qui est très différent de ceux des autres rhizobia mais rapproché de celui d'*Agrobacterium vitis* (Terefework *et al.*, 1998, 2001).

Rhizobium gallicum biovar *phaseoli* et biovar *gallicum* et *Rhizobium giardinii* biovar *phaseoli* et biovar *giardinii* ont été proposées par Amarger *et al.* (1997) sur la base de la séquence du gène de la SSU et des caractéristiques phénotypiques pour quelques souches isolées à partir *Phaseolus vulgaris* et qui présentent deux groupes distincts par rapport à *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Ces deux groupes de souches ont été isolées de différentes régions géographiques de France et ont été préalablement caractérisées par la méthode de la RFLP (Géniaux *et al.*, 1993), l'analyse de la séquence partielle de l'ADNr 16S et l'hybridation ADN / ADN (Laguerre *et al.*, 1993).

Enfin, *Rhizobium huautlense* a été isolée de *Sesbania rostrata* (Wang et Martinez-Romero, 2000).

Les quatre dernières espèces pourraient être classées dans un groupe distinct, mais sont toujours groupées avec le genre *Rhizobium* en raison de leur croissance rapide. Toutefois, leur emplacement phylogénétique reste vague (Kuykendall *et al.*, 2004b).

Plusieurs nouvelles espèces appartenant à ce genre ont été identifiées, *R. mongolense* (van Berkum *et al.*, 1998), *R. yanglingense* (Tan *et al.*, 2001), *R. Larrymoorei* (Bouzar et Jones, 2001 ; Young, 2004), *R. indigoferae* (Wei *et al.*, 2002), *R. sullae* (Squartini *et al.*, 2002) et *R. loessense* (Wei *et al.*, 2003).

4. 3. 6 - *Sinorhizobium*

Sinorhizobium meliloti isolée de *Melilotus* et caractérisée initialement par Dangeard (1926) a été la première espèce reconnue de ce groupe sous le nom de *R. meliloti* (Skerman *et al.*, 1980 ; Jordan, 1984).

D'autres recherches ont indiqué l'isolement de souches à croissance rapide à partir des nodosités de *Glycine max* (Keyser *et al.*, 1982) et de différentes autres légumineuses (Trinick, 1980). Ces souches ont été incluses dans le genre *Rhizobium* sous le nom de *R. fredii* (Scholla et Elkan, 1984) puis elles ont été reclassées au sein de genre *Sinorhizobium* en tant que *Sinorhizobium fredii* (Chen *et al.*, 1988).

Des données moléculaires ont indiqué que *S. fredii* et *S. meliloti* sont très similaires (Jarvis *et al.*, 1992). Par une nouvelle révision du genre, de Lajudie *et al.* (1994) ont pu différencier entre quatre espèces :

- *Sinorhizobium meliloti*, proposée initialement par Dangeard (1926) et isolée à partir des espèces *Melilotus*, *Medicago* et *Trigonella*,
- *Sinorhizobium Saheli* et *Sinorhizobium teranga*, isolées respectivement à partir d'*Acacia* et de *Sesbania*,
- *Sinorhizobium fredii*, isolée initialement de *Glycine max*, *Vigna unguiculata* et *Cajanus cajan*, mais aussi d'autres légumineuses. Scholla et Elkan (1984) ont pu distinguer à partir de tests de sérologie et d'hybridation ADN / ADN, deux chémovars : *fredii* et

siensis. Chen *et al.* (1995) ont même proposé l'existence de deux espèces différentes : *Sinorhizobium fredii* et *Sinorhizobium xinjiangensis*,

La souche NGR 234 isolée de *Lablab purpureus* a la particularité de posséder un grand spectre d'hôte. Les séquences de l'ADNr 16S et des gènes *nod* sont très rapprochées à celles de *Sinorhizobium fredii*. Des études immunologiques ont été également en faveur de ce rapprochement (Jarvis *et al.*, 1992). Toutefois, une étude récente a rapporté que les deux souches ne forment en fait qu'une seule et même souche (Saldana et Martinez-Alcantara, 2003).

D'autres nouvelles espèces appartenant à ce genre ont été caractérisées au cours des dix dernières années, *S. medicae* (Rome *et al.*, 1996), *S. Kostense* et *S. arboris* (Nick *et al.*, 1999), *S. Kummerowiae* (Wei *et al.*, 2002), *S. morolense* (Wang *et al.*, 2002) et *S. americanum* (Toledo *et al.*, 2003).

Le genre *Sinorhizobium* forme avec quelques espèces appartenant au genre *Ensifer* un seul groupe monophylétique (Sawada *et al.*, 2003 ; Willems *et al.*, 2003).

4. 3. 7 - Cas particulier du genre *Agrobacterium*

Les espèces du genre *Agrobacterium* ont été classées comme des phytopathogènes capables d'induire des tumeurs sur plusieurs espèces de plantes. Ces phytopathogènes ont été distingués grâce à leurs plasmides. Ainsi, deux biovars ont été reconnus, *Agrobacterium* Biovar 2 (*rhizogenes*) portant le plasmide Ri qui cause des tumeurs au niveau des racines (Riker *et al.*, 1930 cité par Sawada *et al.*, 1993) et *Agrobacterium* Biovar 1 portant le plasmide Ti et qui comporte deux types : Biovar 1 (*tumefaciens*) qui induit des tumeurs au niveau du collet (Smith et Towsnd, 1907) et Biovar 1 (*radiobacter*) pour les souches non pathogènes (Beyerinck et van delden, 1902). Les deux types du biovar 1 ne peuvent être distingués que par leur effet pathogénique (Holmes, 1988), ce qui a permis différentes propositions de reclassement (Sawada et Ieki, 1992). Finalement, le Biovar 1 a été renommé *Agrobacterium tumefaciens* et le Biovar 2 a été renommé *Agrobacterium rhizogenes* (Bouzar, 1994).

Une autre espèce causant des tumeurs sur *Rubus* spp. a été identifiée, *Agrobacterium rubi* (Hildebrand, 1940). *Agrobacterium vitis* est jusqu'à lors la dernière espèce reconnue du groupe (Ophel et Kerr, 1990). Les différentes souches de cette espèce ont été rapportées comme étant

spécifiques aux différentes espèces de *Vitis* spp. Toutefois, des souches de la même espèce ont été également isolées d'*Actinidia* spp. (Sawada et Ieki, 1992).

Plusieurs autres espèces d'*Agrobacterium* ont été isolées. Cependant, leur nomenclature est très controversée (Euzéby et Findall, 2004).

De point de vue taxonomique, les espèces d'*Agrobacterium* sont classées avec celles du genre *Phyllobacterium* (agent causal d'hypertrophies chez les plantes) dans l'arbre phylogénétique des *Rhizobiaceae* (Knösel, 1984 ; Farrand *et al.*, 2003).

Une étude plus récente basée sur l'analyse comparative des séquences de l'ADNr 16S a montré que les genres *Rhizobium*, *Allorhizobium* et *Agrobacterium* forment un seul groupe monophylétique et qu'il serait judicieux de les regrouper dans un seul genre *Rhizobium* (Young *et al.*, 2001, 2003). Dans ce nouveau genre, la souche type du genre *Agrobacterium* sera substituée par *Rhizobium radiobacter* qui regroupe les types pathogènes et non pathogènes. Dans une autre étude plus récente, il a été rapporté que les trois genres forment en effet un seul groupe monophylétique de la sous-classe α - protéobactéries mais chaque genre est individuellement distinct (Sawada *et al.*, 2003).

4. 4 – Taxonomie des souches nodulant le genre *Lupinus*

Les bactéries symbiotiques nodulant le genre *Lupinus* ont été décrits initialement par Schroeter (1886). En fait, ce dernier a groupé ces bactéries dans une même espèce *Phytomyxa lupini*. En 1931, Eckhardt (cité par van berkum et Eardly, 1998) a proposé deux souches types pour les symbiotes du lupin, ATCC 10318 nodulant *L. luteus* et ATCC 10319 nodulant *L. angustifolius*. Skerman (1980) (cité par van berkum et Eardly, 1998) a rapporté que ces bactéries sont reconnues et classées comme étant *Rhizobium lupini*. La classification établie par Jordan (1982) et qui tient compte de la vitesse de croissance a permis de regrouper les souches à croissance lente dans un nouveau genre : *Bradyrhizobium* et par conséquent les bactéries symbiotiques du lupin ont été désignées par *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*).

Les symbiotes du lupin ont été étudiés par plusieurs auteurs (Crow *et al.*, 1981 cité par van berkum et Eardly, 1998 ; Jordan, 1982 ; Scholla *et al.*, 1990 ; Bottomley *et al.*, 1994). Hollis *et al.* (1981) ont montré que le taux d'homologie ADN / ADN entre la souche ATCC 10319 (*L. angustifolius*) et *Bradyrhizobium japonicum* correspondait à 99%. Cette valeur a été par la suite corrigée à 35% par Scholla *et al* (1990) qui ont également démontré que la culture de la

souche ATCC 10319 a été contaminée par *Br. japonicum*. Plusieurs autres méthodes, en l'occurrence FAME (Graham *et al.*, 1995), MLEE et PyMS (Barrera *et al.*, 1997), l'analyse de l'ADNr 16S (Xu *et al.*, 1995 ; Laguerre *et al.*, 1994, 1997) ont montré que les *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) sont très rapprochés de *Bradyrhizobium japonicum*. Ludwig *et al.* (1995) ont montré qu'une souche de lupin est plus rapprochée du *Bradyrhizobium* par la séquence nucléotique aussi bien de la sous-unité ribosomique 16S que de la sous-unité ribosomique 23S. La majorité de ces études ont été basées cependant, sur l'analyse comparative d'un nombre très limité de souches nodulant le lupin.

Récemment, Trujillo *et al.* (2005) ont montré par l'analyse de la séquence de l'ADNr 16S que deux souches à croissance rapide nodulant l'espèce *Lupinus honoratus* appartiennent au genre *Ochrobactrum* qui fait partie de la branche α_2 des Protéobactéries.

Des souches à croissance rapide ont été également identifiées chez le lupin (Jensen, 1967 ; Jordan, 1982 ; Schlinkert-Miller et Pepper, 1988) mais la caractérisation précise de ces souches n'a pas connu de suite.

Vu le grand nombre d'espèces du genre *Lupinus* spp. qui existent, approximativement 300 espèces, ainsi que leur grande diversité écogéographique (Cowling *et al.*, 1998), on pourrait s'attendre à une grande diversité au niveau des symbiotes de ces espèces. L'étude de la biodiversité et l'analyse moléculaire de ces symbiotes devrait être entreprise pour déterminer avec exactitude leur position taxonomique au sein de la grande famille des *Rhizobiaceae*.

1 - INTRODUCTION

Au Maroc, il y a eu durant les dernières années une focalisation importante sur la constitution d'un germoplasme d'espèces fourragères et pastorales autochtones. Parmi ces espèces figurent celles qui appartiennent au genre *Lupinus*. Suite à cette attention, plusieurs études ont été effectuées afin de connaître d'une part l'aire d'adaptation et de distribution des espèces et des populations spontanées et de mieux définir d'autre part l'aire potentiel où ces espèces peuvent être cultivées avec succès (Bounejmate *et al.*, 1993 ; Beale *et al.*, 1991 ; Thami Alami *et al.*, 2004).

Pour réussir l'installation de ces légumineuses et augmenter substantiellement leur rendement, des essais d'inoculation avec des rhizobia spécifiques à haute performance symbiotique peuvent être entre autres entrepris en fonction des différentes régions du pays. Au Maroc, les lupins sont spontanément nodulés par des souches autochtones de rhizobia (Birouk, 1990). Par conséquent, l'amélioration de la symbiose lupin - rhizobium exige que la conservation et la connaissance du microsymbiote soient déterminées en parallèle avec les efforts de conservation de la plante hôte. C'est ainsi que nous nous sommes fixé comme premier objectif dans cette étude la constitution d'une collection de souches de rhizobia nodulant les différentes espèces locales de lupin.

De plus, la diversité des bactéries symbiotiques est un élément très important dans les programmes de sélection de souches à appliquer comme inoculum et dans l'étude de l'interaction ou de la spécificité plante - microorganisme. L'une des techniques moléculaires avancée utilisée pour l'étude de la diversité génétique des rhizobia consiste à amplifier différentes classes de séquences répétitives (REP, ERIC, et BOX) qui existent en multiples copies dans le génome bactérien (PCR-rep) (Versalovic *et al.*, 1991).

Le typage des séquences répétitives REP présente plusieurs avantages par rapport aux autres techniques d'amplification par PCR dont principalement le grand pouvoir discriminatif entre les souches de rhizobia mais également la facilité et la rapidité, la possibilité de l'application sur un grand nombre de bactéries et la possibilité de l'amplification soit à partir d'une colonie en culture pure soit directement à partir d'un broyat nodulaire (Lupski et Weinstock, 1992 ; de Bruijn, 1992 ; Nick et Lindstöm, 1994).

En plus de son utilisation dans l'étude de la diversité génétique, la PCR/REP est également utilisée dans l'étude écologique de microorganismes nouvellement introduits dans un environnement déterminé (de Bruijn *et al.*, 1996).

2 - CONSTITUTION D'UNE COLLECTION DE RHIZOBIA NODULANT LE LUPIN

2. 1 - sites de collecte et analyse des échantillons de sols

Des campagnes de collecte de plantes nodulées appartenant à différentes espèces de lupin ont été menées pendant la période du printemps des années 1999 / 2000 et 2000 / 2001 dans différentes régions du pays (figure 5, tableau 2).

Pour chaque site, nous avons noté la localité, l'altitude et la pluviométrie pays (Annexe 1).

Le nombre total des sites de collecte dans les différentes régions prospectées figure dans le tableau 2. Ces régions sont réparties selon l'échelle bioclimatique d'Hemberger de l'étage aride à hiver froid (Asni) jusqu'à l'étage humide à hiver doux (Rif). Les différents sites varient en altitude de 10 m à 1000 m et en pluviométrie moyenne annuelle de 380 mm à 1000 mm (Annexe 1).

Des échantillons de sols ont été systématiquement prélevés en surface du sol dans tous les sites de collecte. Ces échantillons ont permis de déterminer la texture et le niveau de fertilité de chaque sol. L'analyse du sol représente une étape importante dans la détermination des caractéristiques édaphiques relatives à chaque site de collecte. La texture du sol a été déterminée par analyse granulométrique. Le niveau de fertilité a été déterminé par des analyses chimiques qui ont porté essentiellement sur le pH, la teneur du sol en matière organique ainsi que la teneur en azote, en potassium (K_2O) et en phosphore assimilable (P_2O_5). Les quatre dernières analyses ont été effectuées dans le laboratoire des analyses du sol à la Station Guich, INRA, Rabat.

Les résultats des différentes analyses physico-chimiques des différents échantillons de sols figurent dans le tableau 3.

L'analyse granulométrique nous a révélé que la majorité des sols sont de type sablonneux ou sablo-limoneux.

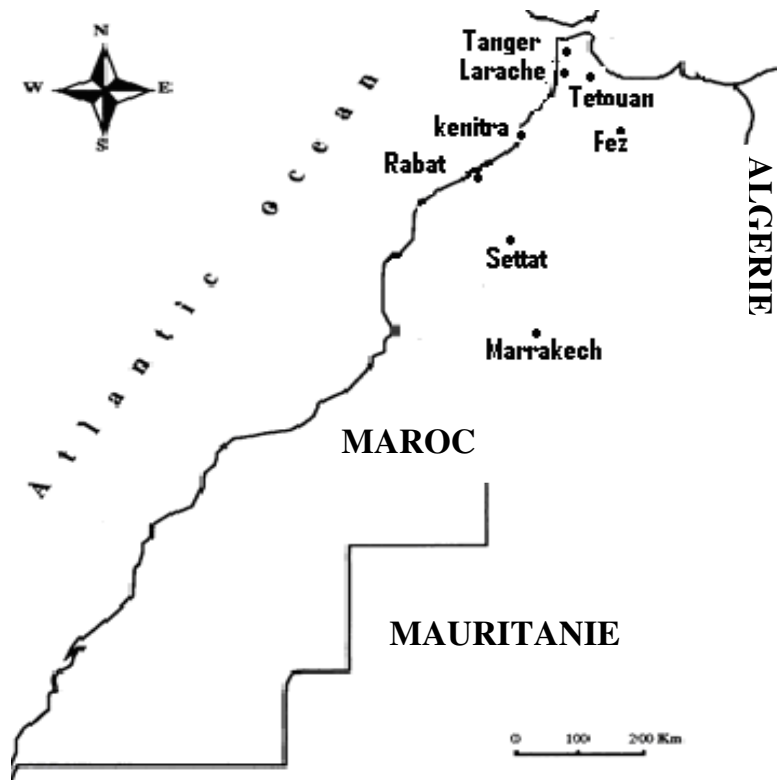


Figure 5. Position géographique des zones de prospection

Tableau 2. Liste des différents sites géographiques de prélèvement (voir Annexe 1)

Régions	Province ou Localité prospectée	Nombre total de sites
Rif	Dardara – Chefchaouen – Tétouan Bab Taza Cherifat	5
Moyen Atlas	région de Fès- région de Meknès	4
Haut Atlas	Province de Marrakech : Asni, Ourika	2
La Côte atlantique	Rabat → Kenitra → Larache	17
Région du Gharb	province de Kenitra et celle de Sidi Yahya	10
Région de Chaouia	Settat	1

Tableau 3. Analyse minérale et granulométrique des sols collectés

Station	Texture du sol	pH (eau)	pH (KCl)	MO (%)	P ₂ O ₅ (ppm)	K ₂ O (ppm)	N (%)
1	Sablonneux	7,88	7,46	0,92	25	81	0,0055
2	Sablonneux en mottes	7,4	7,3	0,78	13	51	0,0055
3	Sablo-limoneux	7,9	7,5	0,8	38	60	0,111
4	Sablo-limoneux	7,5	5,72	1	54	48	0,0047
5	Sablo-limoneux dur	6,66	5,25	0,91	19	51	0,0147
5		7,3	5,73	1	29	102	0,0067
6	Sablo-limoneux	7,2	6,59	1,37	16	66	0,0047
6		7,44	7,28	1,93	50	187	0,0095
7	Sablo-limoneux	7,2	5,22	2,75	3	71	0,0147
8	Sablo-limoneux dur	7,3	5,59	1,83	12	56	0,0078
9	argileux	6,4	5,6	-	-	-	-
10	Limoneux	6,44	5,74	-	-	-	-
11	Sablonneux	7,5	7,35	-	-	-	-
12	Sablo-limoneux	7,91	7,34	1,47	9	90	0,0026
13	Sablo-limoneux sur roche mère calcaire	7,13	6,48	3,12	5	57	0,0007
14	Sablo-limoneux sur roche mère calcaire	8,1	7,24	1,89	19	193	0,0026
15	Argileux limoneux sur roche mère calcaire	7,28	6,79	5,53	84	422	-
16	Argileux	7,46	7,33	1,89	19	193	0,0150
17	Argileux limoneux sur shistes	6,36	4,05	2	5,3	172	0,0086
18	Argileux limoneux sur shistes	7,56	5,37	2,4	81	253	0,0944
19	limoneux	7	6,32	3,4	73	307	0,0127
20	Limoneux sur roche mère calcaire	7	6,19	2	22,8	153	0,0143
21	limoneux -sableux	7,21	6,84	1	9,4	88	0,0110
22	Sablo-limoneux	7,86	7,19	0.60	12	5	0,0050

Le pH du sol a été déterminé selon deux manières : le pH à eau et le pH au KCl. Le pH à eau déterminé à partir de la suspension du sol indique des valeurs variant de 7 à 8,1 c'est à dire neutre à légèrement alcalin. Le pH au KCl indique des valeurs inférieures à celles du pH à eau. En effet, Le KCl ajouté à la suspension du sol permet la libération des protons adsorbés sur les argiles. La libération de ces protons fait diminuer la valeur du pH. La variation entre les deux mesures du pH ne dépassait généralement pas 1 unité sauf pour les stations 17 et 18 où le sol est de type argileux-limoneux et dont les variations mesurées sont de 2 unités.

La majorité des sols analysés présentent des taux moyens en matière organique ($1 < \% < 2$).

Le pH du sol, la nature de la roche mère ainsi que le pourcentage en matière organique (MO) sont les paramètres les plus influents sur la précipitation et la solubilité des éléments nutritifs minéraux.

L'azote est l'élément le plus variable et le plus déficient dans le sol, sa teneur dépend du pourcentage de la matière organique, des amendements d'engrais mais également des espèces bactériennes fixatrices d'azote. Dans notre cas, la quasi-totalité des sols analysés présentent des taux très bas en azote.

Les valeurs obtenues pour le phosphore assimilable sont inférieures à 50 ppm, ceci signifie que les différents sols sont très pauvres en phosphore. Ce dernier est connu pour être facilement adsorbé sur les argiles et la matière organique du sol. Il peut également être facilement précipité sous forme de phosphates de calcium dans les sols neutres ou alcalins.

Les teneurs en potassium sont généralement inférieures à 100 ppm et donc très faibles. Le potassium échangeable est très peu influencé par le pH que par la texture du sol. Il est moins disponible sur les sols à texture grossière. En outre, le potassium peut être considérablement lessivé dans les sols sableux.

La quasi-totalité des sols analysés possèdent donc un pH soit neutre soit acide avec des teneurs très faibles en éléments nutritifs minéraux (K, P, N).

2. 2 – Constitution d'une collection de rhizobia

2. 2. 1- Isolement et purification des rhizobia

Les plantes de six espèces de lupin, *L. luteus*, *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. cosentinii*, *L. pilosus* et *L. atlanticus*, ont été collectées soit en phase végétative soit en début de la phase de floraison. Les nodosités racinaires de petites tailles ont été prélevées et mises dans des tubes contenant du gel de silice déshydraté, alors que les nodosités de grande taille ont été gardées sur les plantes qui ont été ramenées au laboratoire.

Les nodosités racinaires prélevées sur les plantes des différentes espèces de lupin ont été présentes en nombre et en taille variable. Les nodosités des deux espèces cultivées *L. luteus* et *L. albus* ont été faibles en nombre ($n \leq 4$) mais plus grandes en taille de 0,7 à 2,5 cm. Les nodosités prélevées sur les racines des autres espèces ont été plus nombreuses ($1 < n < 14$), leur taille ne dépassait guère les 0,8 cm et présentaient toutes une forme sphérique.

Les nodosités prélevées sur les différentes plantes collectées ont servi à l'isolement direct des bactéries symbiotiques. Les différents échantillons de sol ont été également utilisés pour piéger les bactéries par l'intermédiaire des plantules de *L. luteus* et de *L. albus* mises en culture en pots contenant ces différents sols. L'ensemble des nodosités ont été récoltées afin de pouvoir constituer après l'isolement, une collection de rhizobia autochtones nodulant le lupin.

Les nodosités collectées par isolement direct ou par piégeage ont été rincées à l'eau courante afin d'éliminer le sol, désinfectées par une solution de chlorure mercurique acidifié (0,1% HgCl_2 dans 0,06 N HCl) pendant 5 min, puis rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile.

Les nodosités de taille inférieure à 0,5 cm ont été écrasées dans des ependorfs contenant 500 μl d'une solution de NaCl stérile à 0,85% (w/v). Une partie du broyat obtenu a été striée sur le milieu YEM solide (Vincent, 1970) (Annexe 2) additionné de rouge congo à 2,5%.

Les nodosités de taille supérieure à 0,5 cm ont été coupées aseptiquement sur des boîtes de pétri stériles et la partie rougeâtre à l'intérieur de chaque nodosité a été prélevée à l'aide d'une pince stérilisée puis étalée par striation directement sur des boîtes contenant du YEM solide.

Tableau 4. Nombre des isolats obtenus à partir de chaque espèce de lupin et dans chaque station de collecte

Station	Plantes hôtes	Nombre des isolats
1	<i>L. luteus</i>	16
2	<i>L. angustifolius</i>	7
	<i>L. cosentinii</i>	8
3	<i>L. luteus</i>	7
4	<i>L. angustifolius</i>	7
	<i>L. cosentinii</i>	3
5		
6	<i>L. luteus</i>	9
	+	
7	<i>L. cosentinii</i>	8
8		
9	<i>L. luteus</i>	3
10	<i>L. luteus</i>	2
11	<i>L. luteus</i>	4
12	<i>L. luteus</i>	2
13	<i>L. luteus</i>	1
14	<i>L. angustifolius</i>	1
	<i>L. cosentinii</i>	3
15	<i>L. pilosus</i>	7
16	<i>L. angustifolius</i>	5
17	<i>L. luteus</i>	2
	<i>L. pilosus</i>	5
18	<i>L. angustifolius</i>	5
19	<i>L. angustifolius</i>	2
20	<i>L. angustifolius</i>	3
21	<i>L. angustifolius</i>	3
22	<i>L. cosentinii</i>	2
Piégeage	<i>L. luteus</i> + <i>L. albus</i>	7 + 2

Tableau 5. Nombre des isolats obtenus à partir de chaque espèce de lupin selon les prospections menées par l'INRA de Rabat.

		Plantes hôtes	Nombre des isolats
Localité des sites des campagnes de collecte des plantes de lupin menée par l'INRA de Rabat	Rabat	<i>L. luteus</i>	4
		<i>L. albus</i>	2
		<i>L. angustifolius</i>	2
		<i>L. cosentinii</i>	3
	Gharb	<i>L. luteus</i>	1
		<i>L. albus</i>	4
		<i>L. angustifolius</i>	4
		<i>L. pilosus</i>	1
		<i>L. atlanticus</i>	1
	Settat	<i>L. pilosus</i>	1
	Sehoul	<i>L. luteus</i>	2
	Blad Dandoun	<i>L. albus</i>	1
	Merchouch	<i>L. albus</i>	1
	Entre Azilah et Tanger	<i>L. luteus</i>	2
		<i>L. albus</i>	2
		<i>L. angustifolius</i>	3
<i>L. cosentinii</i>		1	

Les différentes boîtes ont été incubées à 28°C pour l'obtention de colonies isolées. Les colonies obtenues ont été repiquées sur le même milieu suivant quatre à dix repiquages successifs afin de les purifier.

Un nombre de 159 isolats a pu être obtenu via isolement direct à partir des nodosités fraîches des plantes prélevées au champ ainsi que par piégeage. Le nombre d'isolats issus de chaque espèce dans chaque station de collecte figure dans les tableaux 4 et 5. Les isolats obtenus ont fait l'objet du test de Gram (Annexe 3) et ont été identifiés comme étant des bacilles Gram négatifs.

Ces isolats ont formé sur le milieu YEM solide des colonies circulaires de 1 à 3 mm de diamètre d'un aspect gommeux translucide ou crémeux et ont pu être visibles en deux à trois jours d'incubation à 28°C.

2. 2. 2 - Authentification des isolats

La capacité d'induire la formation de nodosités sur la racine de la légumineuse hôte est un critère de base dans la caractérisation des rhizobia.

L'authentification nous permet d'évaluer le pouvoir infectieux de chacun des 159 isolats obtenus vis-à-vis des plantules de lupin. Dans notre cas, les plantules issues des graines des deux espèces cultivées au Maroc, à savoir *L. luteus* et *L. albus*, ont été utilisées (les souches de l'INRA ont été authentifiées sur *L. luteus*).

2. 2. 2. 1 - Germination aseptique des graines

Les graines ont été désinfectées dans une solution d'hypochlorite de calcium à 5% pendant 30 min, rincées plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile puis immergées dans du H₂SO₄ à 95% sous agitation manuelle pour induire la scarification. La durée de la scarification des graines a été variable selon les deux espèces. Pour *L. albus*, la durée a été de 3 min. contre 6 min. pour *L. luteus*. Après plusieurs lavages, les graines ont été mises à imbiber sous des conditions stériles pendant 6 heures à température ambiante. Cette étape remplace la mise au frais à 4°C pour la levée de la dormance de l'embryon. Les graines bien imbibées ont été transférées dans des boîtes de pétri contenant de l'eau gélosée à 0,7% (w/v) puis ont été placées dans un incubateur à l'obscurité et à 25°C pendant 3 à 5 jours. La première espèce a donné 100% de germination et la seconde a donné un pourcentage de 87%.

2. 2. 2. 2 - Culture et inoculation des plantules de lupin

Les graines bien germées et dont la longueur de la radicelle varie de 2,5 à 3 cm de long ont été transférées dans des pots contenant 700 g d'un sol de type sablo - limoneux tamisé avec un tamis de maille 0,9 mm et préalablement lavé puis stérilisé pendant une heure à 121°C en deux cycles séparés par 24 h. Ce sol provient de la région du Guich située à Rabat.

Trois graines ont été semées aseptiquement dans chaque pot, puis les pots ont été placés dans une chambre de culture avec une photopériode lumière/obscurité de 16 h / 8 h et un cycle de température jour/nuit de 25°C / 18°C. Après cinq jours, les plantules ont été inoculées avec 1ml de la suspension bactérienne en phase exponentielle de la croissance de chaque isolat mis en culture dans du YEM liquide. Deux pots ont été utilisés pour chaque souche et pour chaque espèce. Les plantules ont été arrosées deux fois par semaine avec de l'eau distillée stérile pour éviter toute contamination extérieure. Après un mois de culture, les plantes ont été déterrées et inspectées pour la présence ou l'absence de nodosités.

Les tests d'inoculation ont pu aboutir à la formation de nodosités sur les racines des plantes des deux espèces et ce pour chaque isolat. Ceci signifie que les isolats ont été infectifs à la fois vis-à-vis de *L. luteus* et de *L. albus* même s'ils ont été initialement isolés à partir d'autres espèces de lupin.

2. 2. 3 - Stockage et nomenclature des isolats

Suite aux différentes étapes d'analyses précédentes, les isolats sélectionnés ont été maintenus à 4°C dans des tubes contenant du milieu YEM dépourvu de rouge congo à gélose inclinée et ont été également mis en conservation à -25°C dans des épendorfs contenant 1 ml de la préculture fraîche de chaque isolat mélangé à volume égale avec une solution de glycérol à 80%.

Les différents isolats ont été désignés par le code MSMC (Moroccan Symbiotic Microbial Collection) suivi du chiffre 5 utilisé comme référence pour le lupin, ensuite du chiffre 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 respectivement pour *L. luteus*, *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. cosentinii*, *L. pilosus*, et *L. atlanticus* et finalement par le chiffre désignant le numéro de la souche.

Les isolats de provenance INRA ont été désignés par le code INRA L, la désignation de l'espèce ainsi que de la souche sont identiques à celles des souches de la collection MSMC 5.

3 - EVALUATION DE LA DIVERSITE GENETIQUE DES ISOLATS DE LA COLLECTION PAR PCR/REP

Dans la technique PCR/REP, les amorces sont conçues pour s'hybrider d'une façon complémentaire aux extrémités des séquences répétitives inversées de telle manière que la PCR permet l'amplification de toute la séquence localisée entre les sites d'hybridation des amorces. L'amplification génère ainsi différents fragments d'ADN de tailles variables. Par séparation électrophorétique, ces fragments permettent la révélation d'une empreinte génétique spécifique à chaque souche (Versalovic *et al.*, 1991 ; de Bruijn, 1992).

Dans cette étude, on s'est intéressé à évaluer la diversité génétique des 159 isolats nodulant le lupin comme un premier moyen de caractérisation et de sélection.

3. 1 – Matériel et méthodes

3. 1. 1 - Souches bactériennes et milieu de culture

Des colonies obtenues sur le milieu YEM solide en culture pure de chacun des 159 isolats ont été prélevées et cultivées sur le milieu TY (Tryptone – Yeast Extract) (Beringer, 1974) dilué de moitié (Annexe 4). Ce milieu permet de réduire la production des LPS et des EPS synthétisés par les bactéries par rapport au milieu YEM.

3. 1. 2 - Extraction de l'ADN génomique

A partir des bactéries cultivées sur le milieu ½ TY pendant deux jours à 28°C, une à plusieurs colonies bien formées ont été prélevées et suspendues dans 25 µl d'eau bidistillée stérile. L'ADN génomique a été extrait de la suspension bactérienne par la méthode de la lyse alcaline établie par Manniatis *et al.* (1989) modifiée. 25 µl d'un tampon de lyse fraîchement préparé contenant 0,1N NaOH et 0,5 % SDS sont ajoutés à la suspension bactérienne (Annexe 5). Le SDS permet la dénaturation des protéines et la solubilisation des lipides membranaires induisant ainsi la lyse des cellules. Le mélange est agité au vortex puis mis en ébullition à 100°C pendant 15 min. 200 µl d'eau bidistillée stérile sont ajoutés au mélange qui est ensuite soumis à une centrifugation pendant 10 min à 13000g. Dans certains cas, 100 µl de TE 10 :1 (Tris – HCl, pH 8,0 ; EDTA) (Annexe 6) ont été utilisés à la place de l'eau. Après centrifugation, le surnageant constitué par la phase aqueuse claire et qui contient l'ADN en suspension est transféré dans de nouveaux tubes stériles.

Un volume de 10 μ l d'ADN a été sujet à une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% pendant 45 min. à 70V pour l'évaluation de la qualité d'ADN.

3. 1. 3 - Amplification par PCR des séquences répétitives

Les réactions d'amplification ont été réalisées selon une optimisation du protocole décrit initialement par de Bruijn (1992). L'amplification est effectuée dans des microtubes de 100 μ l contenant 30 μ l de volume final de réaction. Le mélange réactionnel comprend le tampon de réaction au 1/10 du volume final et qui contient 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, et 0.1% Triton X-100 ; 1 mM de chaque deoxyribonucléoside triphosphate (dNTP) ; 5 mM MgCl₂ ; 3 μ l de DMSO à 10% ; 1 μ l de BSA à 10 mg/ml ; 30 pmol de chaque amorce ; 2U de la *Taq* polymérase et 2 μ l du lysat d'ADN. Les deux amorces palindromiques utilisées pour amplifier les séquences répétitives REP sont REP 1R et REP 2.

amorces	Séquence 5' → 3'	Référence
REP 1R	5'-IIIICGICGICATCIGGC-3'	Versalovic <i>et al.</i> ,1991
REP 2	5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'	Versalovic <i>et al.</i> ,1991

Après l'addition des échantillons d'ADN, les microtubes sont placés dans un thermocycleur (Amplifon, Thermolyne Co.). Un microtube dont l'ADN est remplacé par de l'eau bidistillée stérile est utilisé en tant que témoin négatif. Les mélanges sont alors soumis au processus d'amplification établi par Grundmann et al (1997) selon le programme suivant :

- Une dénaturation de l'ADN à 94°C en 3 min.
 - Dénaturation de l'ADN à 94°C en 3 min.
 - Hybridation de l'amorce à 40°C en 1 min.
 - Extension des amorces à 65°C en 8 min.
- } 35 cycles
- Extension finale à 65°C en 8 min.

A la fin de l'amplification, un aliquote de 15 μ l de chaque amplifiat est mélangé avec 3 μ l d'un tampon de charge (Annexe 7). Les différents mélanges sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% dans le tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) (Annexe 8) pendant trois heures à 80V. Le 100pb et le 1Kb step ladder (Promega) ont été utilisés comme marqueurs de poids moléculaire lors de chaque migration effectuée. Le gel est coloré dans une solution de bromure d'éthidium à 1mg/ml (Annexe 9) pendant 20 à 25 min, rincé dans de l'eau distillée

stérile pendant 3 min. puis placé sous UV pour être photographié. Un film de type Polaroid B/W ISO 3000/36 a été utilisé pour la prise des photos.

3. 1. 4 - Analyse des données

La taille en paire de base des différentes bandes obtenues a été évaluée par comparaison à celles des marqueurs moléculaires utilisés à l'aide du logiciel PM, Macintosh, Vs 4,0. Une matrice bidimensionnelle reflétant la présence (1) ou l'absence (0) de chaque bande REP pour chaque isolat a été construite. Cette matrice a servi de base pour la construction d'un dendrogramme en utilisant la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group of Mean Averages , Moyennes non Pondérées des Groupes Associés) à l'aide du logiciel STATISTICA Vs 6.0.

3. 2 – Résultats et discussion

3. 2. 1 - Qualité de l'ADN

L'ADN extrait par la méthode de la lyse alcaline s'est révélé d'une bonne qualité (figure 6) En fonction de l'épaisseur et de l'intensité de la bande obtenue pour les différents isolats, on peut noter que l'ADN n'a pas montré de grandes variations quantitatives. Par conséquent, aucune dilution n'a été effectuée pour les réactions d'amplification par PCR.

3. 2. 2 - Diversité génétique révélée par PCR/REP

L'objectif de la présente étude consiste à caractériser les souches et à évaluer la diversité qui existe entre les 159 isolats de la collection. Une méthode simple et assurée ayant le pouvoir de mettre en évidence la variabilité génétique au sein des isolats a été donc indispensable à utiliser.

Les nouvelles méthodes de type PCR permettent d'étudier la diversité des rhizobia sur des bases représentatives soit de l'ensemble du génome bactérien soit d'un gène spécifique. La PCR/REP est largement utilisée pour étudier la variabilité intraspécifique des rhizobia. Par cette méthode, les variations génétiques sont détectées au niveau chromosomique. D'autant plus qu'elle a été utilisée avec succès pour le typage d'isolats de grandes collections et s'est révélée d'un grand pouvoir de résolution (Judd *et al.*, 1993 ; Leung *et al.*, 1994 ; Louws *et al.*, 1996 ; Versalovic *et al.*, 1994 ; Vinuesa *et al.*, 1998). Par conséquent, cette technique a fait l'objet de choix pour cette étude.

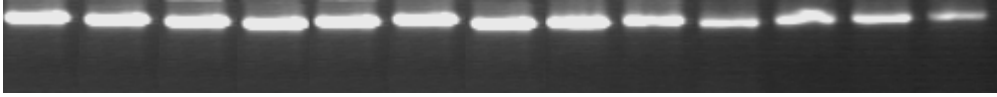


Figure 6. Extraction de l'ADN génomique par la méthode de la lyse alcaline

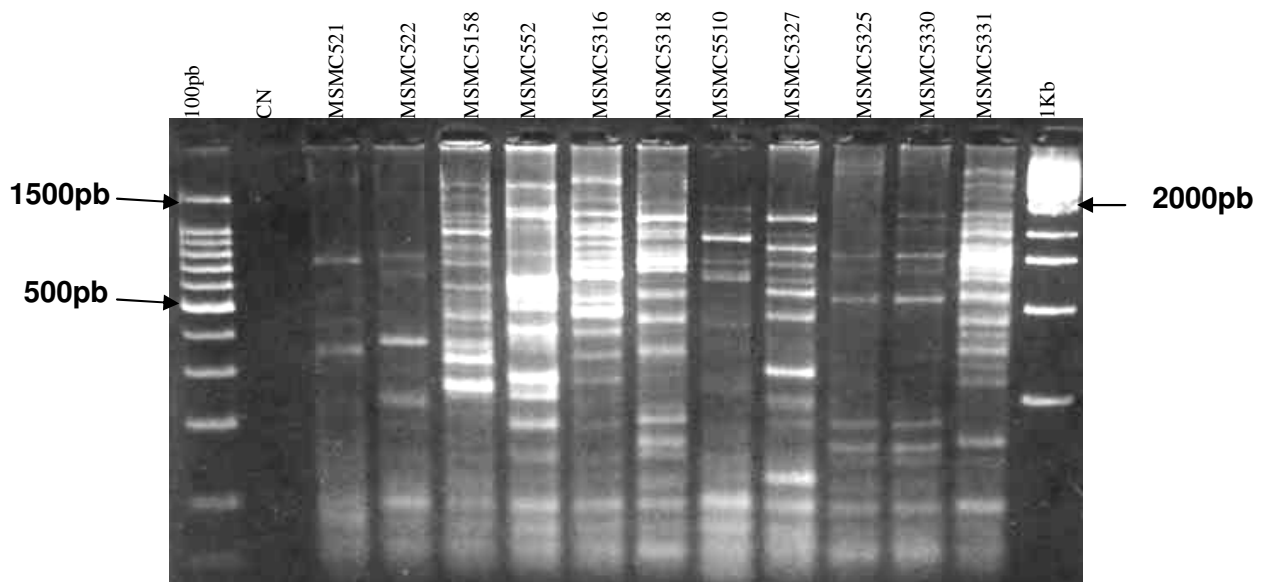


Figure 7. Electrophorèse des amplifiats obtenus par PCR/REP de quelques souches nodulant le lupin

CN: Control négatif, 100pb et 1Kb = marqueurs moléculaires

La séparation électrophorétique des produits de l'amplification a révélée une hétérogénéité considérable entre les isolats, ce qui signifie l'existence d'un grand degré de polymorphisme moléculaire (figure 7).

En fait, la PCR/REP est une méthode très sensible qui permet de détecter de faibles différences entre les souches appartenant au même genre voire à la même espèce (Judd *et al.*, 1993). Les positions relatives des séquences REP dans le génome bactérien sont très conservées chez les souches les plus rapprochées et distinctes entre les différentes espèces ou genres bactériens (Lupski et Weinstock, 1992). Ces séquences seraient sujettes à un mécanisme particulier de l'évolution. Elles subissent des duplications ou des pertes du motif répétitif aboutissant à une variation de leur longueur et par ailleurs au polymorphisme apparent entre les souches. Toutefois, les mécanismes et les événements qui régissent l'évolution spécifique de ces séquences sont encore mal compris (Versalovic *et al.*, 1998).

L'étude des isolats a montré l'abondance des séquences répétitives. En effet, la taille et la distribution des bandes se sont révélées très distinctes et très spécifiques à chaque isolat. La taille des bandes a été comprise entre 90 pb et 3000 pb et leur nombre variait de 1 à 21 bandes par profil. Cependant la majorité des bandes a montré des poids moléculaires compris entre 100 pb et 1000 pb. Les résultats d'autres études ont montré que des souches de *Bradyrhizobium japonicum* présentent plusieurs bandes dont la taille varie entre 100 pb et 5000 pb (Judd *et al.*, 1993) alors que des souches de *Sinorhizobium meliloti* analysées par de Bruijn (1992) présentent peu de bandes avec des poids moléculaires compris entre 700 pb et 4000 pb.

Pour examiner la reproductibilité de la technique, l'amplification de certains isolats a été reconduite dans les mêmes conditions. La révélation des produits de la PCR a généré des fragments dont la taille et le nombre sont identiques à ceux révélés par la première amplification et a permis par conséquent de confirmer que les profils obtenus sont reproductibles. La reproductibilité maintenue des profils REP a été également rapporté par Tylor *et al.* (1997).

Les profils des différentes bandes obtenues sur les gels d'agarose ont été rapportés sur une matrice bidimensionnelle où chaque bande a été indiquée par sa présence ou par son absence. Le dendrogramme formé sur la base de cette matrice par analyse UPGMA est représenté par la figure 8.

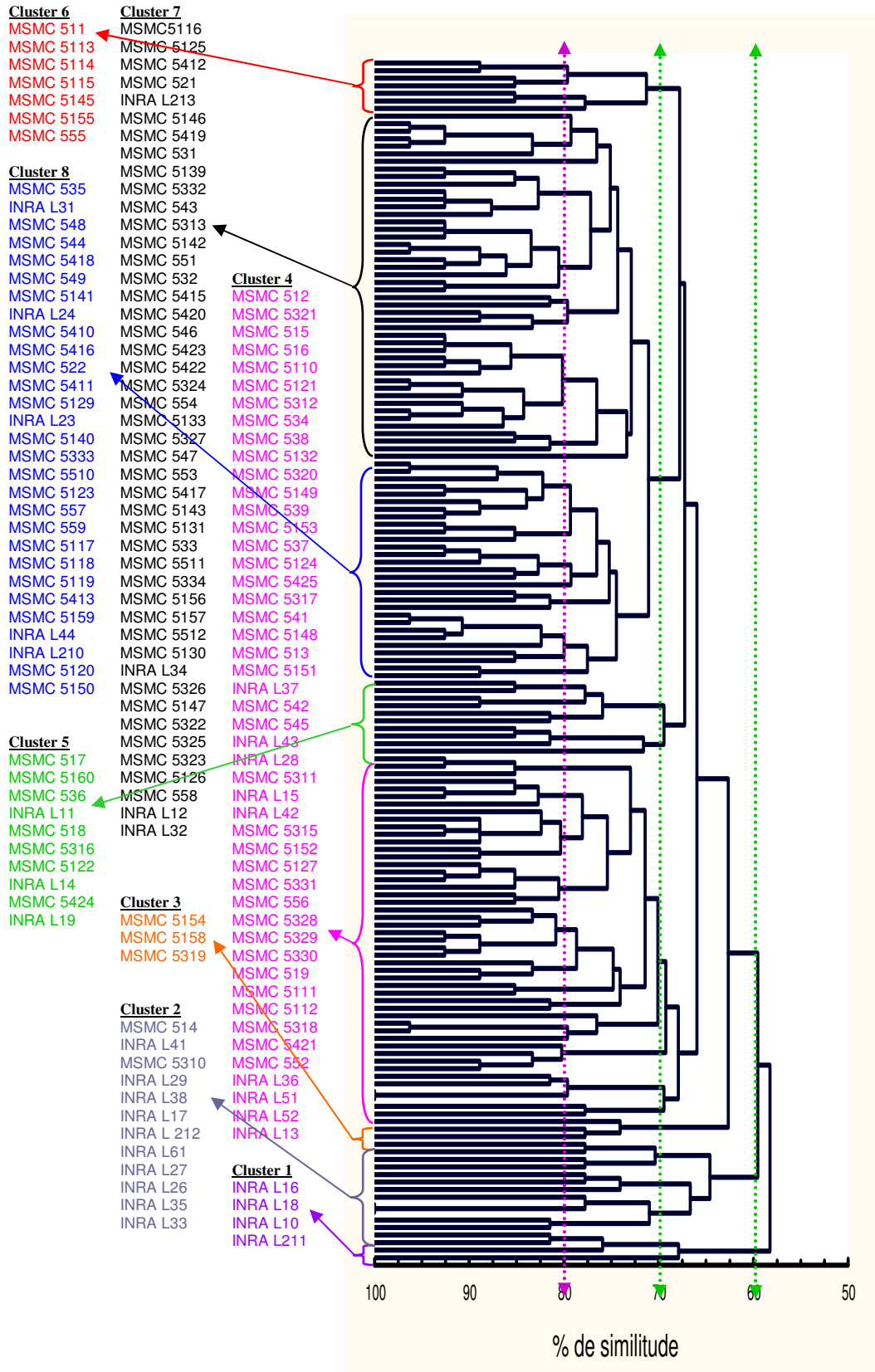


Figure 8. Dendrogramme résultant de l'analyse par PCR/REP des souches nodulant le lupin

Le dendrogramme a pu fournir plus d'informations sur la variabilité spécifique des isolats. A l'exception de INRA L 26 avec INRA L 27 et INRA L 36 avec INRA L 51 qui représentent 100% de similarité, tous les autres isolats constituent des souches distinctes. Par conséquent, le nombre total de souches de la collection est équivalent à 157.

La divergence génétique des souches révélée par la PCR/REP entre les souches de la collection est d'autant plus importante puisqu'on n'a pas pu identifier un polymorphisme moléculaire délimitant les symbiotes appartenant à une espèce de lupin ou à un site de collecte bien déterminé. Autrement dit, dans chaque site de collecte et pour chaque espèce de lupin, les souches isolées semblent être génétiquement distinctes.

En fait, en se situant à un niveau de similarité génétique de 80%, on obtient plus d'une trentaine de petits clusters et plus d'une vingtaine de lignées indépendants, ce qui témoigne l'existence d'un grand degré de divergence génétique entre les souches. Des groupes de souches nettement séparés ne pouvaient être délimités qu'à un niveau plus bas de similarité compris entre 60% et 70%. A ce niveau, on obtient huit grands clusters. Ces clusters sont subdivisés en 2 à 10 petits clusters aboutissant à un nombre total de 29.

A partir de chacun des 29 petits clusters, une à trois souches ont été sélectionnées. Ainsi, cinquante deux souches ont été repérées pour les analyses ultérieures. La sélection des souches a été effectuée en prenant en considération le site et la plante hôte d'origine (tableau 6).

La spécificité des profils obtenus par la présente étude et leur reproductibilité pourrait présenter un intérêt écologique important dans les programmes d'inoculation en permettant le suivi de la souche dans le nouvel environnement où elle serait introduite.

3. 2. 3 - Cas particulier de l'amas nodulaire

La méthode PCR/REP a été appliquée en premier lieu à 14 souches particulières de la collection. Ces souches ont été obtenues à partir d'un même amas nodulaire (figure 9). L'amas présentait une taille assez grande de 2,5 cm et a été récupéré à la partie basale du niveau du collet d'une plante de l'espèce *Lupinus luteus* collectée dans le site M'nasra dans la province de Kenitra.

Tableau 6. Liste des souches sélectionnées à partir des différents clusters délimités par l'analyse PCR/REP

	Souche		Souche	
<i>L. luteus</i>	MSMC 511	<i>L. albus</i>	INRA L 21	
	MSMC 513		INRA L 23	
	MSMC 514		INRA L 29	
	MSMC 515		INRA L 211	
	MSMC 516		INRA L 212	
	MSMC 517			
	MSMC 518			
	MSMC 5110	<i>L. angustifolius</i>	MSMC 532	
	MSMC 5111		MSMC 536	
	MSMC 5112		MSMC 539	
	MSMC 5113		MSMC 5319	
	MSMC 5114		MSMC 5326	
	MSMC 5115		MSMC 5328	
	MSMC 5116		INRA L 32	
	MSMC 5119			
	MSMC 5123	<i>L. cosentini</i>	MSMC 541	
	MSMC 5126		MSMC 5416	
	MSMC 5127		MSMC 5419	
	MSMC 5133		MSMC 547	
	MSMC 5142		MSMC 549	
	MSMC 5143		MSMC 5425	
	MSMC 5150		INRA L 43	
	MSMC 5155		INRA L 44	
	MSMC 5156			
	INRA L 15	<i>L. vilosus</i>	MSMC 554	
	INRA L 16		MSMC 556	
	INRA L 17		INRA L 51	
			INRA L 52	
		<i>L. atlanticus</i>		INRA L 61



Figure 9. Coupe longitudinale de l'amas nodulaire

L'amplification des séquences répétitives des 14 isolats a pu généré des profils distincts avec plusieurs bandes. La grande variabilité mise en évidence prouve que les isolats sont génétiquement très diversifiés (figure 10).

Le dendrogramme issu de la comparaison des différents profils illustre la grande diversité génétique qui existe entre ces souches (figure 11). A 70% de similarité génétique, les souches forment deux clusters A et B ainsi que trois lignées indépendants. En outre, au sein des deux groupes A et B, la relation génétique entre les souches semble présenter une grande hétérogénéité.

Le typage moléculaire par PCR/REP nous a permis de mettre en évidence, et pour la première fois, l'existence de plusieurs souches génétiquement distinctes au sein d'un même amas nodulaire. Or, il est généralement établi que les nodosités abritent un nombre singulier de souches de rhizobia et il est également bien établi que les mécanismes de nodulation sont contrôlés par une reconnaissance mutuelle hautement spécifique entre la bactérie et la plante hôte (Long, 2001 ; Perret *et al.*, 2000 ; Denarié *et al.*, 1996). Cette spécificité a été même rapporté être différentiellement réduite à un sérotype bien déterminé (Somasegaran et Hoben, 1985). En plus de la spécificité, les rhizobia sont caractérisés par leur pouvoir compétitif (Laguerre *et al.*, 2003). La compétition peut concerner non seulement les éléments nutritifs ou l'espace vital (rhizosphère) mais aussi les sites d'infection au niveau des racines de la légumineuse.

Autre renseignement qui résulte de cette analyse est l'évidence de la multiple infection nodulaire. En d'autres termes, la capacité de différentes souches de rhizobium à infecter en grand nombre le même endroit de la racine d'une même plante hôte et à coexister en harmonie dans la même nodosité.

Toutefois, il est difficile d'expliquer comment toutes ces souches peuvent coexister dans la même structure nodulaire et de définir les mécanismes d'infection impliqués dans la formation d'un tel type de nodosités.

Il a été rapporté que la dominance d'un génotype particulier dans les nodosités peut résulter d'une haute abondance dans le sol plutôt qu'à une grande compétitivité de nodulation (Hartman *et al.*, 1998). Les mêmes auteurs ont signalé que les causes de l'abondance d'un microorganisme dans le sol peuvent être très variables, en l'occurrence la synthèse ou la détoxification d'antibiotiques, la grande sensibilité aux stimuli émis par la plante et la

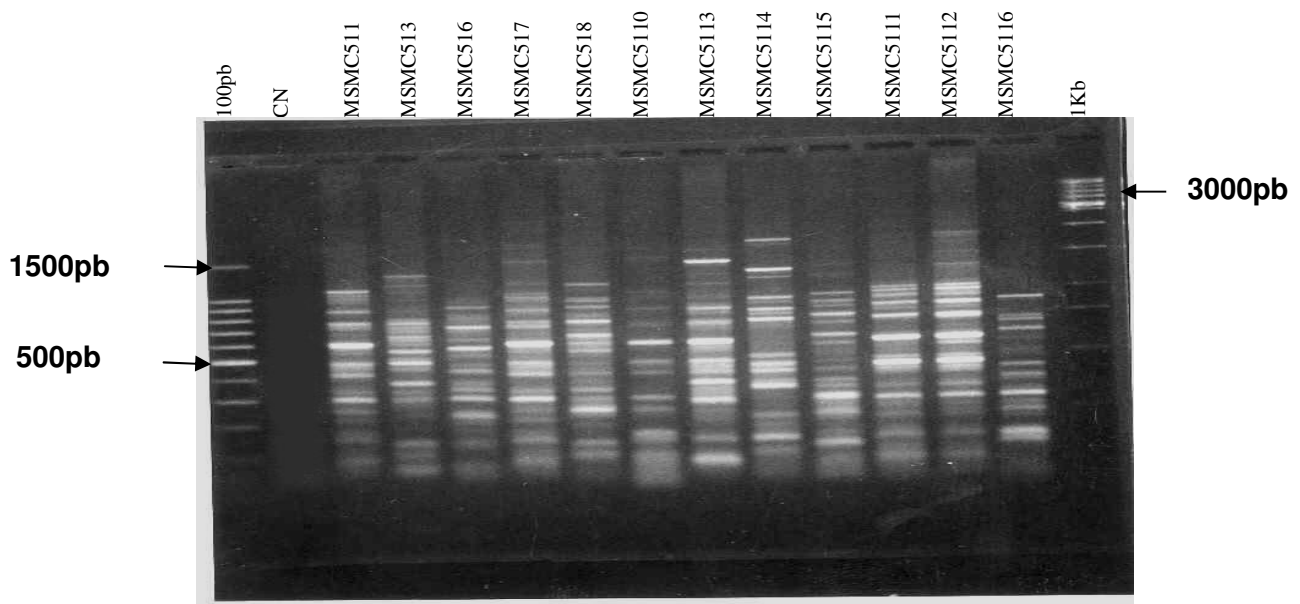


Figure 10. Electrophorèse des amplifiats obtenus par PCR/REP des souches de l'amas nodulaire

CN: Control négatif, 100pb et 1Kb = marqueurs moléculaires

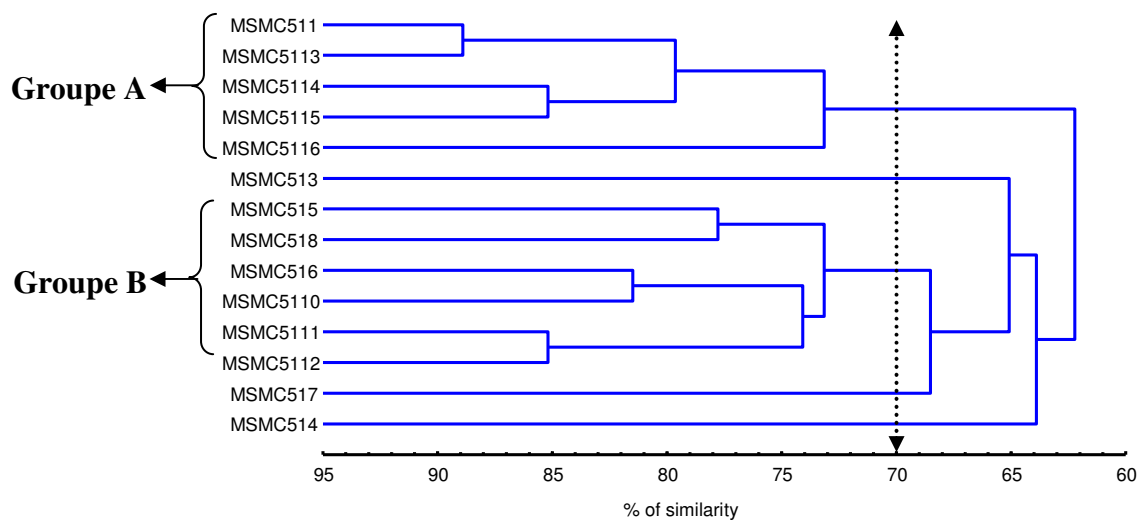


Figure 11. Dendrogramme résultant de l'analyse par PCR/REP des 14 souches de l'amas nodulaire.

croissance rapide des souches pour l'envahissement de la rhizosphère. Certains auteurs ont attribué la nodulation aux facteurs sélectifs régis par l'hôte dans la rhizosphère (Moawad *et al.*, 1984) tandis que d'autres ont indiqué que la compétitivité pour la nodulation est réglée par les gènes rhizobiaux (Brewin *et al.*, 1983 ; Laguerre *et al.*, 2003).

Concernant les mécanismes d'infection, Hirsch *et al.* (2001) ont signalé que les modes d'infection connus chez les rhizobia et qui aboutissent à la formation de nodosités de type soit déterminé soit indéterminé existent tous les deux chez le lupin. Récemment, un autre mode d'infection bien particulier a été rapporté chez *lupinus albus* par Gonzalez-sama *et al.* (2004). Selon ces auteurs, le rhizobia pénètre la racine à travers la jonction située à la base du poil absorbant et la cellule épidermique adjacente. La bactérie envahit directement la zone corticale sous épidermique. Les cellules infectées se divisent successivement pour former le noyau central de la nouvelle nodosité. Ce nouveau mode d'infection épidermique direct aboutit à la formation de nodosité de type indéterminée. Cependant, aucune indication d'une possible multiple infection n'a été signalée.

L'existence d'une paire de souches dans la même nodosité a été signalée chez une autre légumineuse qui est le soja, ceci a été toutefois rapporté non pas sous des conditions naturelles mais suite à une inoculation mixte par ces souches (Linderman *et al.*, 1974). Un même résultat a été obtenu par Johnson et Beringer (1975) dans le cas du pois suite à une inoculation par une paire de souches efficaces de *Rhizobium leguminosarum*. Deux souches appartenant même à deux espèces différentes, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* et *Bradyrhizobium* ont été identifiées dans la même nodosité d'une non légumineuse *Parasponia andersonii* (Trinick *et al.*, 1989). Tous ces travaux indiquent par conséquent qu'une même nodosité peut héberger différentes souches qui peuvent appartenir à une même espèce ou à des espèces différentes.

Les résultats de cette analyse permettent de soumettre quelques hypothèses théoriques pour expliquer une telle multiple infection : (i) un haut niveau de compatibilité de l'hôte qui pourrait entrer en symbiose avec plusieurs souches bactériennes afin de couvrir ses besoins en éléments nutritifs azotés, (ii) les souches pourraient présenter des facteurs de reconnaissance et de nodulation similaires vis-à-vis de l'hôte et par conséquent une capacité compétitive identique et (iii) un mode d'infection assez particulier.

1 - INTRODUCTION

La caractérisation phénotypique des différentes souches nodulant le lupin nous permettra d'une part de mettre en évidence l'étendue des variations phénotypiques qui existent entre les souches et d'autre part d'exploiter ces variations pour la sélection de candidats pouvant maintenir une capacité supérieure de fixation d'azote sous les variations des facteurs du milieu. En effet, les facteurs environnementaux affectent tous les aspects de la fixation symbiotique d'azote. Parmi les facteurs les plus importants figurent le pH, la salinité et la température.

Dans le sol, le pH affecte non seulement le développement des bactéries mais aussi la solubilité des différents cations métalliques qui influencent indirectement le développement bactérien.

Dans les régions arides ou semi-arides, les températures extrêmes affectent la survie des rhizobia. Elles agissent également sur leur mobilité et sur leur potentiel infectieux en agissant sur le taux de l'humidité relative du sol (Bordeleau & Prévost, 1994).

La salinité constitue de nos jours une menace sérieuse à envisager. Elle agit négativement sur la persistance et sur le développement des rhizobia (Zahran *et al.*, 1994 ; Graham, 1998).

Pour le bon fonctionnement de la symbiose rhizobia - lupin, une bonne synergie entre les deux partenaires symbiotiques et les facteurs édapho- climatiques du milieu est indispensable. Il est donc primordial d'identifier en premier lieu les rhizobia autochtones nouvellement isolés puis sélectionner ceux qui peuvent survivre et maintenir une haute performance symbiotique sous les différentes contraintes de l'environnement.

Dans cette optique, l'étude porte sur la détermination des caractéristiques phénotypiques des souches. L'ensemble de ces caractères pourra constituer une base pour l'établissement de stratégies d'inoculations dans différentes régions du pays mais aussi une base d'étude de la diversité phénotypique qui existe entre ces souches autochtones.

2 – MATERIEL ET METHODES

L'étude de la diversité phénotypique a été menée pour la caractérisation de 52 souches nodulant le lupin et qui ont été sélectionnées sur la base de la diversité génétique évaluée par la PCR/REP. La tolérance au pH, à la salinité et à la température a été évaluée pour l'ensemble des souches de la collection vu que ces trois paramètres constituent les plus importants facteurs du stress abiotique. La tolérance à ces trois facteurs a été doublement exploitée : d'une part pour la sélection des candidats les plus tolérants pour des tests d'inoculation de lupin qui seront menés par l'INRA de Rabat sur des sols de type calco-alcalins et d'autre part dans le cadre de la caractérisation classique établie pour les rhizobia nouvellement isolés.

2.1 – Evaluation des paramètres symbiotiques

L. luteus représente l'espèce de lupin la plus cultivée au Maroc. De ce fait, les critères symbiotiques des différentes souches ont été évalués en association avec cette espèce.

Les graines ont été stérilisées avec du HgCl₂ à 0,1% (w/v) acidifié (HCl à 0,06N), scarifiées avec du H₂SO₄ à 95% et mises à germer sur de l'eau gélosée à 0,7% (w/v) pendant trois jours à l'obscurité. Les graines bien germées ont été transférées aseptiquement dans des pots remplis de sable stérile à raison de trois graines par pot. Les pots ont été ensuite placés dans une chambre de culture sous les mêmes conditions décrites précédemment pour le test de l'authentification des isolats. Chaque plantule a été inoculée par 1 ml d'une suspension bactérienne fraîchement préparée (10⁸ bactéries/ml). Trois pots ont été utilisés pour chaque souche. Après inoculation, le sable a été recouvert de gravier stérile pour empêcher l'évaporation. Les plantes ont été arrosées 3 fois par semaine alternativement avec de la solution nutritive dépourvue d'azote (Broughton et Dillworth, 1971) (Annexe 10) et de l'eau distillée stérile. Des plantes non inoculées ont été utilisées comme témoin non azoté (T0). Le témoin azoté (TN) a été représenté par des plantes non inoculées mais recevant du KNO₃ à 0,5% (w/v) additionné dans chaque arrosage par la solution nutritive. Huit semaines après inoculation, les plantes ont été déterrées. Les nodosités formées sur les racines de chaque plante ont été dénombrées et le poids sec de la partie végétative a été mesuré après séchage à 70°C pendant 48 heures. Le nombre moyen de nodosités formées sur chaque plante et par chaque souche a été utilisé pour l'évaluation de l'infectivité. Le poids sec moyen des plantes issues de 3 pots inoculés par la même souche a été utilisé pour l'évaluation de l'efficacité

relative qui est exprimée sous forme du pourcentage de gain en matière sèche des parties aériennes des plantes inoculées (PSPi) par rapport aux plantes témoins non inoculées mais qui ont reçu du KNO₃ (PSTn) :

$$ER = \text{PSPi} / \text{PSTn} \times 100$$

2. 2 – Temps de génération sur YEM liquide

Le temps de génération des souches a été évalué doublement dans des fioles contenant 100 ml de YEM liquide. Les fioles ont étéensemencées par les précultures fraîchement préparées dans le même milieu de chacune des souches. L'ensemencement a été réalisé de manière à obtenir une DO initiale dans les fioles de l'ordre de 0,05. Les fioles ont été ensuite placées sous agitation rotative de 200 rpm à 28°C. La lecture de la DO a été réalisée à 600 nm à des intervalles de temps successifs de 45 min. Les différentes valeurs de DO ont été portées sur une échelle semi-logarithmique en fonction du temps. Le temps de génération a été calculé à partir de la phase exponentielle de la courbe de croissance.

Le pH du milieu contenu dans chaque fiole a été mesuré à la fin de la phase exponentielle de croissance de chaque souche afin de déterminer sa capacité à acidifier ou à alcaliniser le milieu.

2. 3 – Test du bleu de bromothymol (BTB)

La capacité des souches à alcaliniser ou à acidifier le milieu YEM a été évaluée par l'addition de l'indicateur coloré bromophénol bleu à une concentration de 0,0025% (w/v) (Annexe 11). Les boîtes inoculées ont été mises en incubation à 28°C pendant 24 heures. Les réactions ont été identifiées par le changement de la coloration du milieu. Une coloration jaune indique une réaction acide et une coloration bleu foncé indique une réaction basique.

2. 4 – Utilisation des substrats carbonés

L'assimilation de différents substrats carbonés a été testée en utilisant les galeries API (API 50CH, BioMérieux, France) selon la procédure décrite par Kersters *et al.* (1984). Les précultures ont été préparées comme suit : des colonies bien formées obtenues après 24 heures d'incubation sur du YEM solide à 28°C ont été prélevées et dispersées dans 1 ml d'eau distillée stérile. Le mélange a été suspendu dans un milieu dépourvu de toute source de carbone, maintenu à 45°C et contenant en g/l : 0,46 de K₂HPO₄; 0,13 de KH₂PO₄; 0,2 de MgSO₄; 0,1 de NaCl; 2 de Yeast Nitrogen base (Difco); 2 de (NH₄)₂SO₄ et 7,5 d'agar

(Difco). Les précultures fraîchement préparées ont été utilisées pour remplir les puits des galeries. Les microplaques ont été ensuite placées horizontalement à 28°C pendant 7 jours. L'utilisation de la source de carbone par la souche se traduit par un trouble bien apparent par rapport au témoin.

2. 5 – Hydrolyse de l'urée

Pour chaque souche, 10 µl de la préculture fraîchement préparée dans le milieu YEM ont été utilisés pour ensemercer des boîtes contenant le même milieu solide additionné de 2% d'urée et 0,012% de rouge de phénol (Jarvis *et al.*, 1977). Les solutions de ces deux produits ont été stérilisées par filtration. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche. Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 24 heures. Les résultats ont été évalués par le changement de la coloration du milieu. Une coloration rouge indigo indique l'hydrolyse de l'urée alors qu'une coloration jaunâtre indique une réaction négative.

2. 6 – Réduction du nitrate

Pour ce test, les souches ont été cultivées pendant 5 jours à 28°C dans du YEM liquide modifié dépourvu du tampon phosphate mais contenant 0,003% Na₂SO₄ et une source d'azote sous forme de KNO₃ à 0,1%. Le pH du milieu a été ajusté à 7 avec du NaOH 5N. Quatre répétitions ont été réalisées pour chaque souche. La réduction du nitrate a été mise en évidence par l'addition de 5 à 7 gouttes d'acide sulphanilique à 8 g/l préparé dans de l'acide acétique 5N puis quelques gouttes de l'α-naphthylamine à 5 g/l également préparé dans de l'acide acétique 5N. Une réaction positive se traduit par une coloration rose ou rouge du milieu.

2. 7 – Résistance intrinsèque aux antibiotiques

Les tests ont été réalisés sur des boîtes de pétri contenant du milieu YEM solide. Les boîtes ont été subdivisées en 20 secteurs. Chaque secteur a été ensemercé avec 10 µl d'une préculture fraîchement préparée ayant une DO de l'ordre de 10⁸ bactéries/ml. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque traitement et pour chaque souche. Pour chaque test, des boîtes témoins ont été préparées. Ces témoins ont été réalisés sous des conditions standard avec 0,1% (w/v) NaCl, pH 7,0 et à 28°C. Les résultats de chaque test ont été évalués après une semaine d'incubation. Par comparaison avec les boîtes témoins, les souches ont été notées sensibles (pas de croissance) ou résistantes.

Le milieu a été additionné de différentes quantités d'antibiotiques (Sigma Products Co.) selon la méthode décrite par Somasegaran et Hoben (1985). Les solutions d'antibiotiques ont été stérilisées par filtration (Annexe 12) puis additionnées au milieu YEM préalablement autoclavé et maintenu à une température de 55°C. Les antibiotiques ont été testés en µg/ml à des concentrations variant de 10 à 100 pour la spectinomycine, la tétracycline, la streptomycine, la kanamycine et l'acide nalidixique, de 10 à 150 pour le chloramphénicol et de 15 à 200 pour l'érythromycine et l'ampicilline.

2. 8 – Résistance intrinsèque aux métaux lourds

Ce test a été conduit pour évaluer la capacité des souches à résister à six différents types de métaux lourds tous sous forme de chlorures. Le test a été réalisé comme dans le cas précédent. Les solutions de différents métaux ont été stérilisées par filtration (Millipore 0,22 µm, Sigma) puis additionnées au milieu YEM gélosé pour aboutir à des concentrations en µg/ml variant de 200 à 400 pour $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 et $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, de 50 à 100 pour CoCl_2 et de 5 à 50 pour $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et HgCl_2 .

2. 9 – Tolérance à la salinité

La tolérance à la salinité a été évaluée pour le NaCl. Le sel a été ajouté au milieu avant autoclavage à des concentrations variant de 170 mM à 1700 mM. Les boîtes ont été ensemencées comme dans les tests précédents et ont été ensuite mises en incubation à 28°C.

2. 10 – Tolérance au pH

Les souches ont été évaluées pour leur tolérance au pH sur du YEM solide à 0,1% NaCl après une semaine d'incubation à 28°C et selon la procédure décrite pour les tests précédents. Le pH du milieu a été ajusté avec le tampon Homopipes à 25 mM pour les valeurs comprises entre 3 et 5, le tampon MES à 20 mM pour les valeurs comprises entre 5 et 7 et par le tampon phosphate additionné de NaOH 5N pour les valeurs comprises entre 7 et 9,5.

Pour les pH 8,5 ; 9 et 9,5, les tests ont été reconduits sur le milieu YEM liquide pour la confirmation des résultats obtenus sur boîtes.



Figure 12. Photo indiquant des plantes de *Lupinus luteus* inoculées comparées au control négatif et au control fertilisé par du KNO_3

2. 11 – Tolérance à la température

Ce test a été réalisé comme précédemment sur du YEM solide à 0,1% NaCl, à pH 7 et selon la procédure décrite précédemment. La capacité des souches à tolérer différentes températures a été déterminée après une semaine d'incubation à 4, 10, 15, 20, 30, 35, 38 et 42°C.

2. 12 – Analyse des données

Les résultats de l'ensemble des tests phénotypiques ont été indiqués par 1 pour tout résultat positif et par 0 pour tout résultat négatif. Les données symbiotiques ont été traitées en classes. Pour le test de l'infectivité, les nombres moyen de nodosités (n) obtenus par plante ont été subdivisés en trois classes : classe 1 pour $n < 30$, classe 2 pour $30 < n < 50$ et classe 3 pour $n > 50$. Les différents pourcentages obtenus de l'efficacité relative des souches ont été également subdivisés en trois classes : classe 1 pour les pourcentages inférieurs à 60 %, classe 2 pour les pourcentages compris entre 60 % et 70% et classe 3 pour les pourcentages supérieurs à 70 %. Ainsi, 105 caractères phénotypiques ont été rapportés sur une même matrice. La comparaison entre les souches prises deux à deux a été réalisée par la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Methode with Arithmetic Average). Sur la base de cette méthode, un phénogramme a été construit à l'aide du logiciel STATISTICA (V.6).

3 – RESULTATS ET DISCUSSION

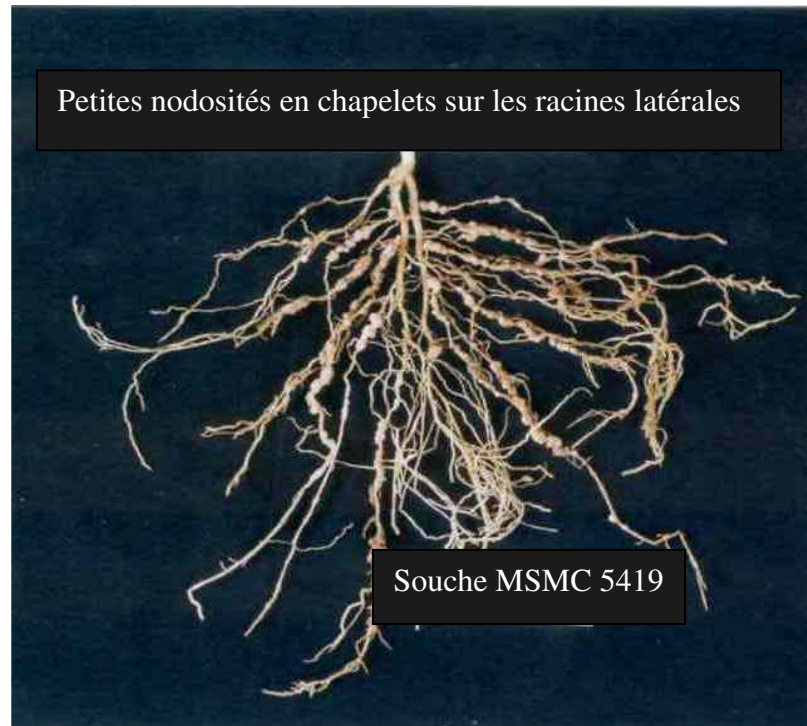
3. 1 – Caractérisation symbiotique

Cette caractérisation a été effectuée afin d'évaluer la diversité des souches de lupin par leur potentiel infectieux et fixateur et afin de repérer les souches les plus efficaces.

La capacité symbiotique d'une souche de rhizobium est évaluée par deux paramètres : son infectivité et son efficacité. L'infectivité de chaque souche est appréciée par le nombre de nodosités formées sur la racine de chaque plante. L'efficacité est estimée par la détermination du pourcentage de gain en matière sèche de la partie aérienne des plantes inoculées par rapport au témoin azoté (figure 12).

L'expérience a été menée en pots pour permettre le bon développement du système racinaire. Les plantes ont été déterrées au même stade végétatif afin que les performances symbiotiques puissent être comparables.

A



B

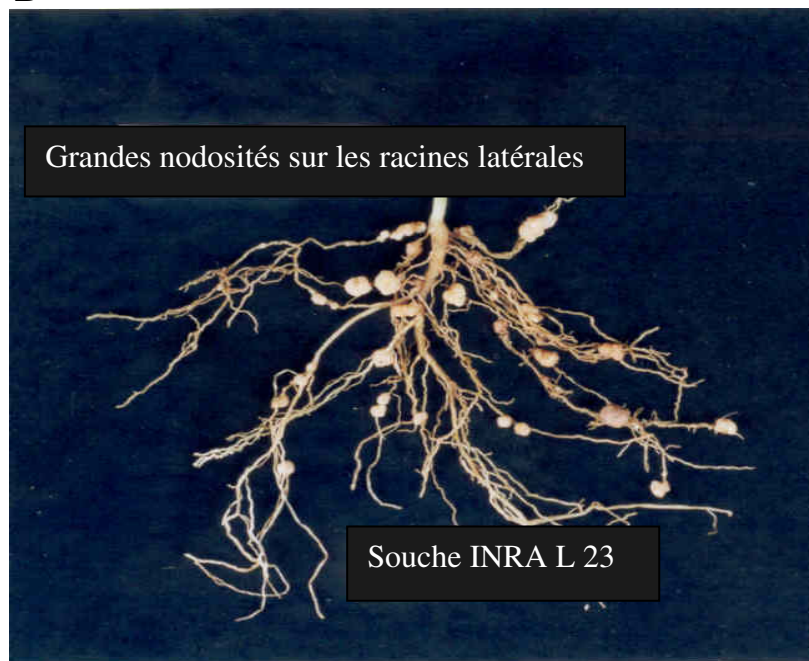


Figure 13. Forme des nodosités obtenues sur *Lupinus luteus* inoculé par la souche MSMC 5419 (A) et la souche INRA L 23 (B).

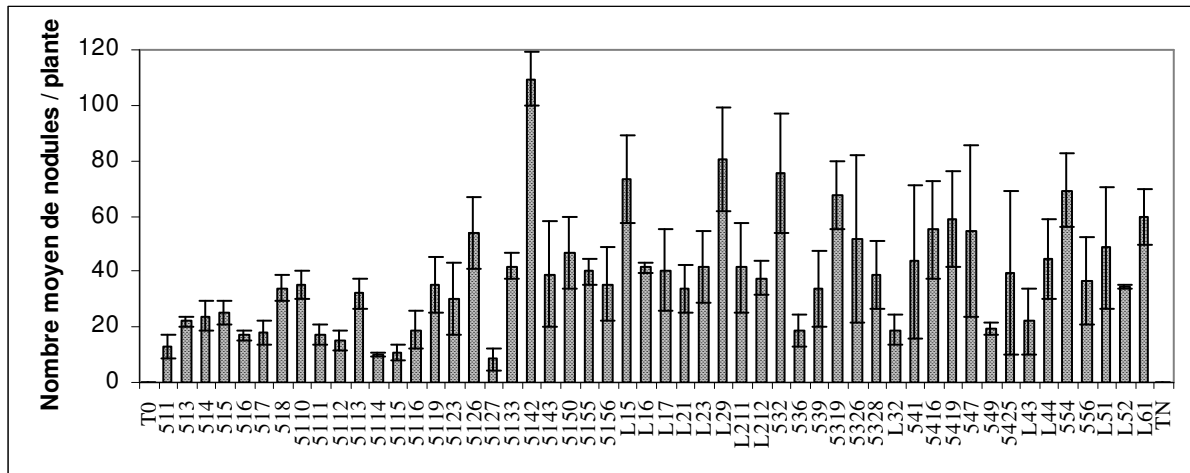


Figure 14. Infectivité des souches nodulant le lupin évaluée sur *L. luteus*

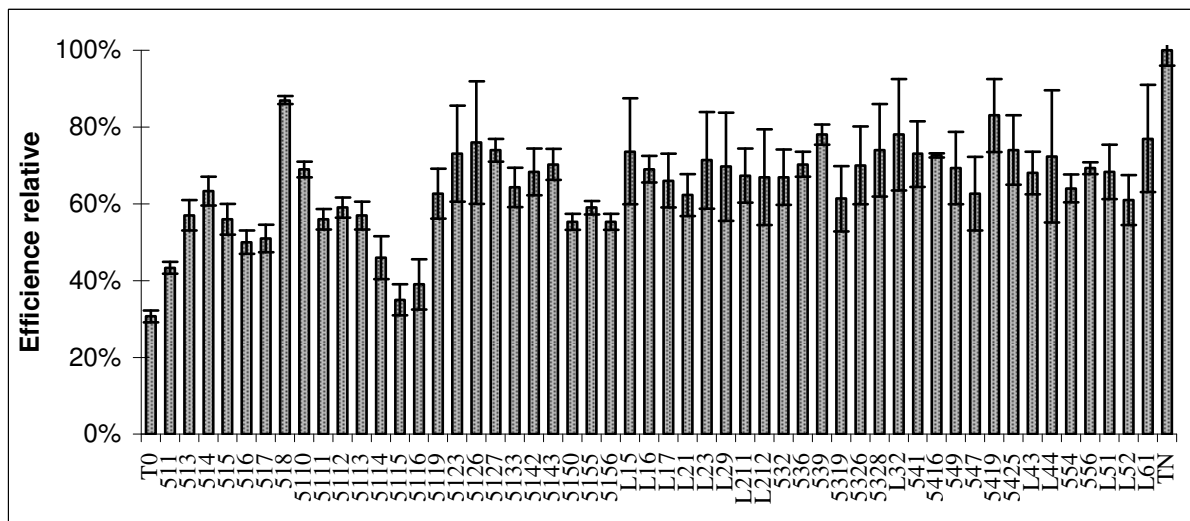


Figure 15. Efficacité relative des souches nodulant le lupin évaluée huit semaines après l'inoculation des plantes.

(T0 = témoin non azoté, TN = témoin fertilisé au KNO_3)

Les résultats obtenus montrent que *L. luteus* a pu être nodulé par toutes les souches testées même si elles ont été isolées à partir d'autres plantes hôtes. Cette plasticité de nodulation chez le lupin a été également rapportée par Jensen et Hansen (1968).

La localisation des nodosités sur le système racinaire de la plante a montré également une grande variabilité. Les nodosités de 7 mm ou plus ont été localisées en grande majorité au dessous du collet alors que les différentes nodosités de moindre taille ont été plus dense sur les racines latérales (figure 13). La forme des nodosités s'est révélée également très diversifiée tout en reflétant les deux formes des nodosités connues : déterminée ou indéterminées (au dessous du collet) et indéterminée (sur les racines latérales). En effet, il a été rapporté que les deux formes peuvent exister chez le lupin (Hirsch, 1992, Hirsch *et al.*, 2001).

Une large variabilité de la capacité infective des souches a été mise en évidence (figure 14). En effet, même si l'inoculation des plantes par les différentes souches rapportait un nombre moyen de bactéries de l'ordre de 10^8 bact/ml, le nombre moyen des nodosités formées par plante varie de 8 à 109. La souche la plus infective est la MSMC 5142 avec 108 nodosités formées par plante. La souche MSMC 5127, la moins infective, a pu induire la formation de 8 nodosités.

La réponse des plantes à l'inoculation montre différentes efficacités relatives (figure 15). L'augmentation du poids de la matière sèche des plantes inoculées n'a dépassé en aucun cas celui des plantes fertilisées par l'azote minéral.

Les efficacités relatives obtenues varient de 35% à 87%. Les plus grandes valeurs ont été obtenues avec les souches MSMC 518 et MSMC 5419 avec 87% et 83% d'efficacité relative (ER) respectivement. En général, les souches se sont révélées très efficaces. 74% des souches présentent une efficacité relative supérieure à 60%.

Il est important de signaler que toutes les souches qui n'ont pas été isolées de l'espèce *L. luteus* montrent une efficacité supérieure à 60%. Alors que les souches isolées de cette espèce présentent des pourcentages variant de 35% à 87%.

Quant aux souches issues de l'amas nodulaire, nous remarquons qu'en dépit de leur présence dans la même structure nodulaire, ces souches présentent des niveaux très variables du potentiel infectieux et il en est de même pour l'efficacité relative. La souche la moins

efficace (MSMC 5115) ainsi que la souche la plus efficace (MSMC 518) appartiennent toutes les deux à ce groupe. Les souches de l'amas nodulaire semblent donc fonctionner en complémentarité au sein de la nodosité. En outre, l'efficacité relative de ces souches paraît être proportionnelle à leur capacité infective (à l'exception de la souche MSMC 5113) alors que pour les autres souches de lupin, aucune corrélation entre les deux paramètres symbiotiques n'a été enregistrée.

L'étude de l'infectivité et de l'efficacité symbiotique a conduit à l'identification des souches qui présentent le meilleur pouvoir fixateur d'azote : MSMC 518, MSMC 5125, MSMC 5126, MSMC 539 et INRA L 61.

Plusieurs auteurs ont étudié les paramètres symbiotiques de différentes souches nodulant le lupin pour la sélection de couples rhizobia - lupin à haute performance symbiotique (Howieson *et al.*, 1988 ; Legocki *et al.*, 1997 ; Kurlovick *et al.*, 1997 ; Hoeflich *et al.*, 1994 ; Roughley *et al.*, 1993 ; Cheremisov, 1991).

La sélection de couples symbiotiques performants de différentes espèces ou de variétés de lupin et de microsymbiotes complémentaires peut augmenter le rendement de la symbiose. En effet, Kozhemyakov *et al.* (2000) ont évalué la capacité de la fixation biologique d'azote chez 1050 accessions de lupin représentant 4 espèces d'origine méditerranéenne et 16 espèces d'origine américaine. Les plantes des différentes accessions ont été sujettes à une inoculation par différentes souches de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). Les résultats ont montré que la fixation symbiotique d'azote varie d'une accession à une autre et que les souches ont été plus performantes avec les accessions des plantes sauvages qu'avec les accessions des plantes cultivées. Dans notre étude, nous avons remarqué que les souches isolées des espèces sauvages de lupin récoltées au Maroc se sont révélées plus efficaces que celles isolées de l'espèce cultivée *L. luteus*.

Récemment, Younis *et al.* (2002) ont montré que l'inoculation de l'espèce *Lupinus varius* par les deux souches TAL 1303 et TAL 1407 de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) a permis d'obtenir un bon niveau de nodulation et de fixation d'azote sous des conditions de salinité et de stress hydrique très accentués en Egypte.

Dans la présente étude, on s'est intéressé à évaluer l'efficacité chez le lupin jaune qui est la première espèce de lupin au niveau de la culture au Maroc. Toutefois et en raison de la grande diversité inter- et intraspécifique qui existe entre les différentes espèces de lupin (Kurlovich,

Tableau 7. Temps de génération des souches de lupin et pH final du milieu de culture

plante hôte	Souche	Temps de génération	pH final	plante hôte	Souche	Temps de génération	pH final	
<i>L. luteus</i>	MSMC 511	3h	6,92	<i>L. angustifolius</i>	MSMC 532	1h 45min	6,4	
	MSMC 513	1h30	7,1		MSMC 536	1h 40min	5,1	
	MSMC 514	1h 15min	5,82		MSMC 539	1h 15min	6,1	
	MSMC 515	1h 15min	5,21		MSMC 5319	1h 5min	6,5	
	MSMC 516	2h 30min	6,96		MSMC 5326	1h 35min	5,1	
	MSMC 517	1h 15min	6,34		MSMC 5328	1h 35min	6,7	
	MSMC 518	1h 15min	6,2		INRA L32	1h 45min	7	
	MSMC 5110	45min	4,86		<i>L. Coseninii</i>	MSMC 541	1h 25min	5,2
	MSMC 5111	45min	4,68			MSMC 547	1h 25min	5,4
	MSMC 5112	45min	4,62			MSMC 549	1h 25min	5,1
	MSMC 5113	1h 45min	6,76	MSMC 5416		1h 20min	5,02	
	MSMC 5114	1h 45min	6,49	MSMC 5419		1h 30min	7,5	
	MSMC 5115	1h 15min	7,35	MSMC 5425		1h 25min	6,2	
	MSMC 5116	1h 15min	7,22	INRA L43		2h 15min	6,8	
	MSMC 5119	1h 10min	6,5	INRA L44		1h 15min	5,2	
	MSMC 5123	1h 30min	5,5	<i>L. pilosus</i>		MSMC 554	2h 15min	6,18
	MSMC 5126	1h 55min	5,4			MSMC 556	3h 30min	5,2
	MSMC 5127	1h 25min	6,8		INRA L51	1h 15min	5,3	
	MSMC 5133	1h 40min	6,8		INRA L52	1h 15min	5,3	
	MSMC 5142	1h 5min	6,2		<i>L. atlanticus</i>	INRA L61	1h 55min	5,28
MSMC 5143	1h 25min	5,1						
MSMC 5150	2h	5,4						
MSMC 5155	1h 35min	5,4						
MSMC 5156	2h 10min	5,87						
INRA L15	2h 5min	6,09						
INRA L16	1h	4,96						
INRA L17	1h 5min	5,5						
<i>L. albus</i>	INRA L21	2h 5min	7					
	INRA L23	1h 50min	7,1					
	INRA L29	4h 45min	6,9					
	INRA L211	1h 50min	5,3					
	INRA L212	1h	4,6					

1998), il serait nécessaire d'évaluer les paramètres symbiotiques des souches bactériennes avec chaque espèce pour sélectionner les candidats les plus performants et assurer par conséquent un bon rendement.

3. 2 – Croissance sur le milieu YEM

L'évaluation du temps de génération dans le milieu YEM des 52 souches de lupin est récapitulée dans le tableau 7. Une grande variation de la vitesse de croissance a été observée entre les différentes souches étudiées. La durée minimale du temps de génération (45 min.) a été enregistrée pour les souches MSMC 5110, MSMC 5111 et MSMC 5112 alors que les deux souches MSMC 556 et INRA L 29 ont montré un temps de génération supérieur à 3h.

La figure 16 montre que la majorité des souches possède un temps de génération entre 1 h et 3 h. 10% des souches ont montré un temps de génération inférieur ou égale à une heure et 4% de souches ont montré un temps de génération variant de 3h à 5 h.

D'après le temps d'apparition des colonies sur le milieu YEM solide (de 1 à 3 jours) et d'après leurs caractéristiques morphologiques, les souches se sont montrées plus en accord avec la description décrite par Jordan (1982) pour les souches à croissance rapide des rhizobia. Cette constatation a été donc confirmée par le temps de génération rapide des souches.

Aucune corrélation entre la vitesse de croissance et la plante hôte ou le site d'origine n'a été identifiée. Toutefois, une grande diversité du temps de génération a été notée chez les souches de la même plante hôte et du même amas nodulaire. En effet, différents temps de génération ont été particulièrement identifiés chez les souches de l'amas nodulaire (de 45 min à 3 h).

Le pH du milieu mesuré au début de la croissance avait une valeur 7. Le pH du milieu à la fin de la phase exponentielle de la croissance a été également mesuré (tableau 7). Certaines souches ont pu acidifier le milieu de culture alors que d'autres n'ont entraîné aucune modification du pH. Il a été rapporté que les souches à croissance rapide acidifient le milieu et l'inverse pour les bradyrhizobia (Vincent, 1970 ; Jordan, 1982). Ahmad et Smith (1985) ont montré que sous les conditions du laboratoire, la capacité des souches à produire une réaction acide ou basique dans le milieu dépend du type et de la concentration du substrat qui leur est fourni. Cependant, et en prenant en considération que le mannitol utilisé dans le milieu YEM

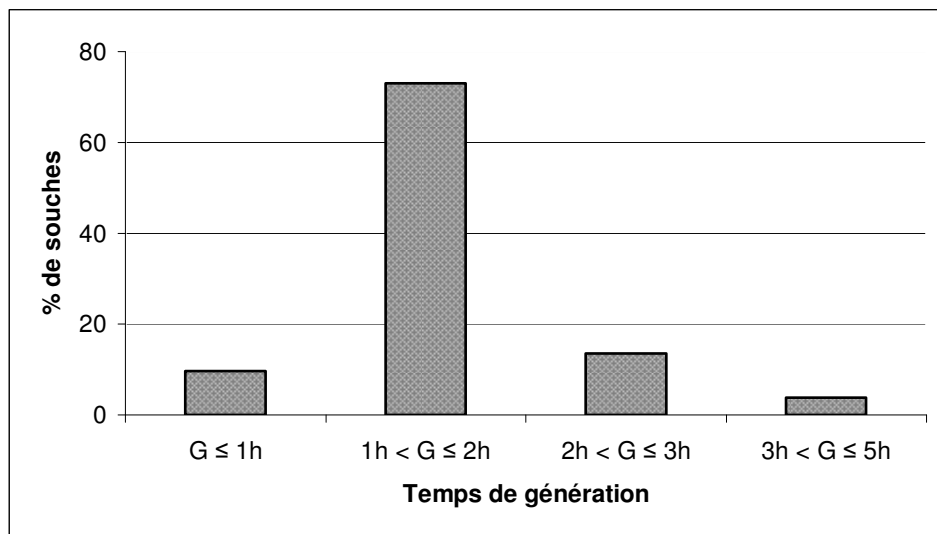


Figure 16. Croissance des souches nodulant le lupin évaluée dans le milieu YEM

est la source de carbone la plus communément utilisée dans les différents tests de caractérisation

des rhizobia, on peut noter que nos résultats sont en accord avec ceux de Jordan (1982). En outre, les souches de lupin extrêmement rapides (MSMC 5110, MSMC 5111, MSMC 5112, INRA L 16 et INRA L 212) ont été repérées comme les souches les plus acidifiantes du milieu ($4.6 \leq \text{pH} \leq 4.96$).

Il résulte de l'étude de la croissance bactérienne que les rhizobia de lupin à croissance rapide peuvent noduler les différentes espèces de lupin existantes au Maroc et ceci dans différents sites et régions du pays. Des résultats plus ou moins similaires ont été rapportés par Pudelko et Madrzak (1996). Ces derniers ont pu mettre en évidence l'existence de souches à croissance rapide nodulant *Lupinus* spp. en Pologne. D'autres souches à croissance rapide ont été également rapportées chez d'autres espèces de lupin par Schlinkert-Miller et Pepper (1988).

3. 3 – Test du bleu de bromothymol (BTB)

Les résultats de ce test sont indiqués dans le tableau 8. En fait, le bleu de bromothymol est un indicateur coloré qui permet de mettre en évidence une réaction acide ou basique dans une gamme de pH qui s'étend de 6 à 7,6. Une réaction acide se traduit par le changement de la coloration du bleu vers le jaune. Par contre une réaction alcaline se traduit par le renforcement de la coloration bleue.

Les souches à croissance rapide sont considérées généralement comme des bactéries acidifiantes. Par conséquent, elles devraient changer la coloration du BTB vers le jaune contrairement aux souches à croissance lente qui sont considérées comme des bactéries qui alcalinisent le milieu de culture (Jordan, 1984).

Dans notre cas, toutes les souches sont à croissance rapide. Toutefois, 66% des souches ont produit des réactions acides sur le YEM solide + BTB alors que les 33% restantes ont produit soit une légère alcalinisation soit aucune modification du pH du milieu. En outre, les résultats de ce test sont en parfait accord avec ceux obtenus par la mesure du pH à la fin de la croissance des souches.

Xu *et al.* (1995) ont rapporté que 80% des souches testées de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium* ont pu donner des réactions positives avec le YEM + BTB, alors que les souches de *Bradyrhizobium* ont toutes donné des réactions négatives.

Tableau 8. Réaction des souches nodulant le lupin sur le milieu YEM+BTB

Plante hôte	Souches	BTB	Plante hôte	Souches	BTB
<i>L. luteus</i>	MSMC 511	0	<i>L. angustifolius</i>	MSMC 532	0
	MSMC 513	0		MSMC 536	0
	MSMC 514	0		MSMC 539	0
	MSMC 515	1		MSMC 5319	1
	MSMC 516	0		MSMC 5326	0
	MSMC 517	1		MSMC 5328	0
	MSMC 518	1		INRA L32	1
	MSMC 5110	1			
	MSMC 5111	1			
	MSMC 5112	1			
	MSMC 5113	0			
	MSMC 5114	0	<i>L. Coseninii</i>	MSMC 541	1
	MSMC 5115	0		MSMC 547	1
	MSMC 5116	0		MSMC 549	0
	MSMC 5119	1		MSMC 5416	1
	MSMC 5123	1		MSMC 5419	1
	MSMC 5126	1		MSMC 5425	1
	MSMC 5127	0		INRA L43	1
	MSMC 5133	0		INRA L44	0
	MSMC 5142	1			
	MSMC 5143	1			
	MSMC 5150	0	<i>L. pilosus</i>	MSMC 554	1
	MSMC 5155	0		MSMC 556	1
MSMC 5156	0	INRA L51		1	
INRA L15	1	INRA L52		0	
INRA L16	1				
INRA L17	1				
<i>L. albus</i>	MSMC 521	1	<i>L. atlanticus</i>	INRA L61	1
	INRA L211	1			
	INRA L212	0			
	INRA L21	1			
	INRA L23	1			
	INRA L29	1			

1 représente une réaction acide ; 0 représente une réaction neutre ou légèrement alcaline

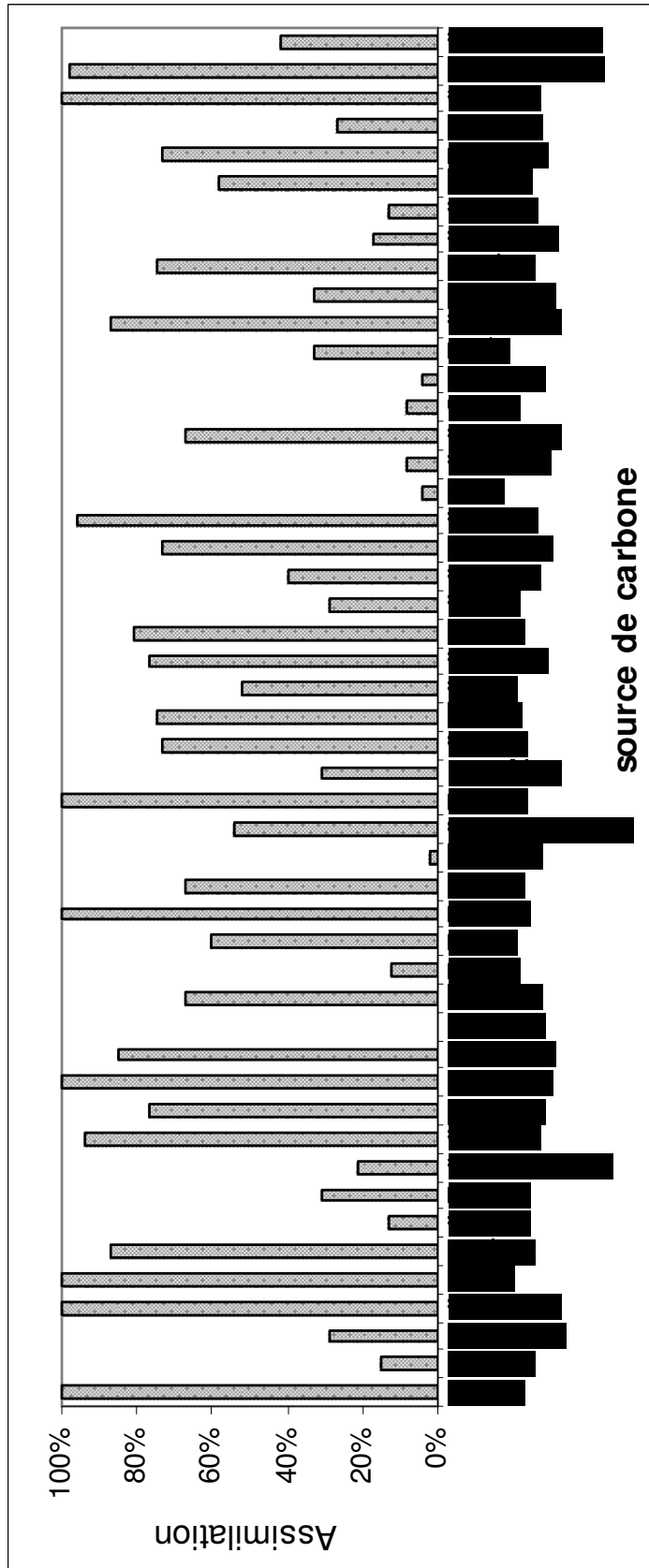


Figure 17. Assimilation de différents substrats carbonés par les souches nodulant le lupin

Tableau 9. Pourcentage d'assimilation de différents types de carbohydrates par les souches nodulant le lupin

Monosaccharides	<u>Hexoses</u>		Disaccharides	Saccharose	73%
	Glucose	78%		Cellobiose	78%
	Fructose	100%		Maltose	82%
	Galactose	95%		Melibiose	40%
	Mannose	85%	Trisaccharides	Raffinose	68%
	L-Sorbose	0%		Melizitose	8%
	<u>Pentoses</u>		Polysaccharides	<u>Hexosans</u>	
	Xylose	87%		Amidon	8%
	Rhamnose	68%		Inuline	4%
	L-Arabinose	100%	Glycogène	4%	
	<u>Polyols</u>		<u>Glucosides</u>		
	Glycérol	100%	Amygdaline	32%	
	Mannitol	100%	Esculine	75%	
	Inositol	60%			
	Sorbitol	68%			

Toutefois, des souches de *Bradyrhizobium* à réaction acide ont été rapportées par Moreira *et al.* (1993). De même, des souches à croissance rapide alcalinisant le milieu ont été mises en évidence (Hernandez et Focht, 1984).

3. 4 – Utilisation des substrats carbonés

Les galeries API ont été utilisées afin d'évaluer l'aptitude des souches à assimiler chacun des 49 substrats comme seule source de carbone (figure 17 et Annexe 13). Selon le type du substrat, l'assimilation peut également être répartie comme l'indique le tableau 9.

Les résultats montrent que les souches assimilent préférentiellement les mono- et les disaccharides mais on peut noter également que les souches peuvent se développer sur différentes sources de carbones.

Aucune souche n'a pu utiliser le L-sorbose, par contre 100% de souches ont pu assimiler le glycérol et le mannitol : substrats communément utilisés pour la culture et le stockage des rhizobia. Un même pourcentage a été aussi obtenu avec le gluconate, le N-acetyl-glucosamine et l'arabinose. L'étude menée par Chakrabati *et al.* (1981) a montré que parmi tous les bradyrhizobia qu'ils ont testé, seuls les souches de lupin ont été capables d'assimiler l'arabinose.

Certaines souches de lupin étudiées ont pu également assimiler les polysaccharides complexes de type hexosans (tableau 9). Cependant, l'incapacité de différentes souches de rhizobia à assimiler ces substrats a été rapportée par Rome *et al.* (1996) pour des souches de *Sinorhizobium* nodulant *Medicago* et par Nour *et al.* (1994a) pour des souches de *Mesorhizobium* nodulant *Cicer arietinum*. Maâtallah (2002) a pu caractériser quelques souches nodulant *Cicer arietinum* pouvant toutefois assimiler l'amidon.

Les données de l'utilisation des différents substrats carbonés par les différentes souches étudiées ont été également utilisées pour le traçage d'un arbre d'assimilation (figure 18). L'arbre montre trois grands groupes de souches et trois lignées indépendants qui sont délimités à un pourcentage de similarité équivalent à 75%. Chaque groupe est formé par des souches qui présentent des profils similaires d'assimilation de substrats (Annexe 13). Les lignées indépendants sont formés par les souches INRA L 53, MSMC 5419 et INRA L15. Ces trois souches se distinguent essentiellement par leur aptitude à utiliser le D-tagatose et /ou l'inuline et l'amidon.

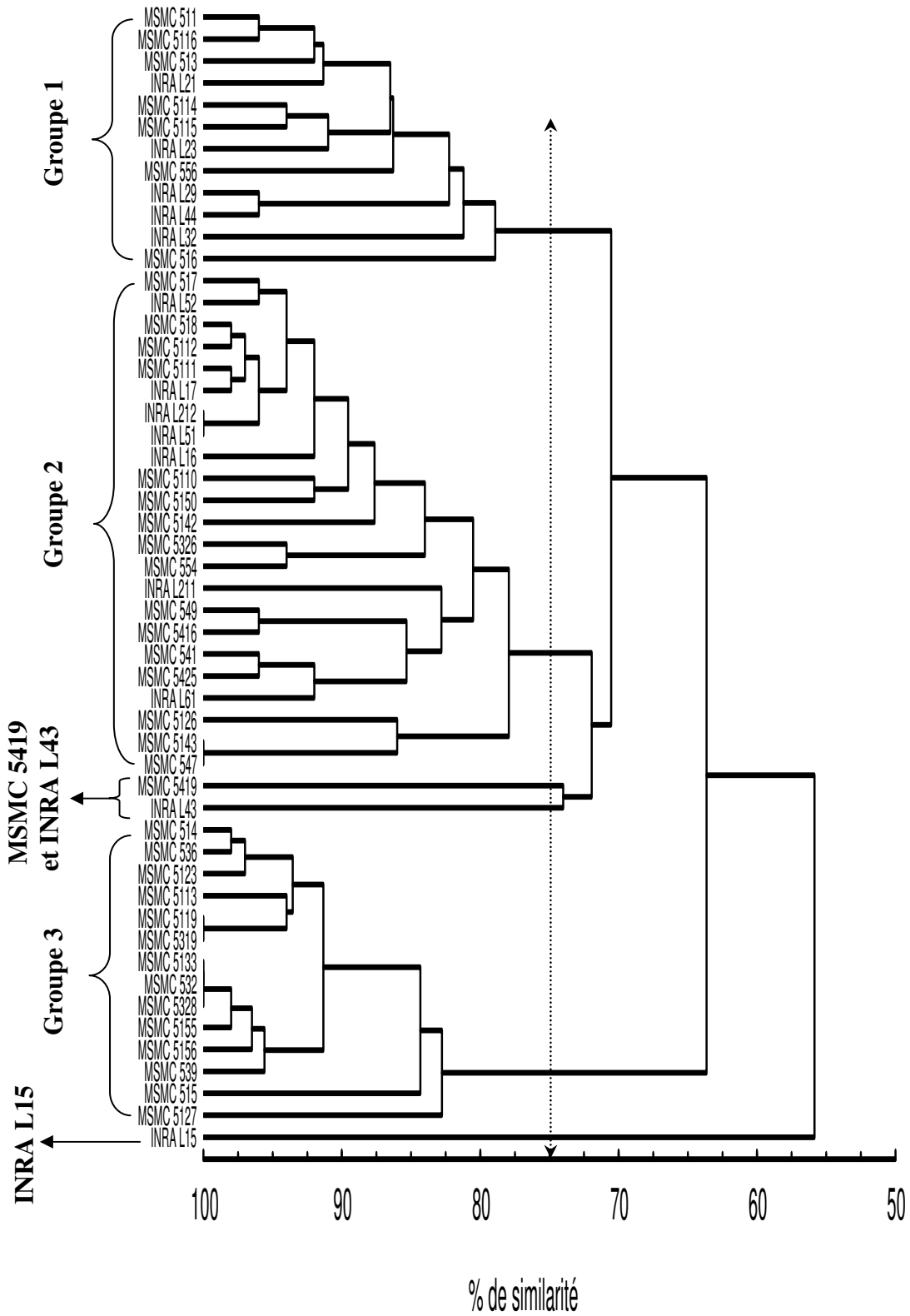


Figure 18. Dendrogramme indiquant les affinités d'assimilation entre les souches nodulant le lupin

Plusieurs études ont rapporté la variabilité de la nutrition carbonée chez les rhizobia (Graham, 1964 ; Zhang *et al.*, 1991 ; Stowers et Eaglesham, 1984). Ces mêmes auteurs ont confirmé l'existence de la variabilité de l'utilisation des substrats carbonés entre les rhizobia et les bradyrhizobia. Les souches à croissance rapide possèdent une préférence pour les hexoses, les pentoses, les disaccharides ainsi que les acides organiques (Stowers, 1985 ; van Rossum *et al.*, 1995). Un même résultat a été rapporté par Lindström et Lehtomaki (1988) pour des souches de *Rhizobium galegae*. Les souches à croissance lente présentent une utilisation rare pour les monosaccharides et une utilisation variable pour les disaccharides (Jordan, 1984). Des résultats similaires ont été rapportés par Xu *et al.* (1995) pour *Bradyrhizobium liaoningense* et *Bradyrhizobium japonicum*.

L'utilisation des sucres et des acides organiques par les rhizobia représente un aspect intéressant et essentiel pour la culture au laboratoire. Cependant dans le sol, la croissance des rhizobia dépend principalement de composés aromatiques. L'utilisation de ces derniers comme seule source de carbone a été rapportée aussi bien chez les souches à croissance rapide que chez les souches à croissance lente. Les bradyrhizobia montrent toutefois une large utilisation de ces composés (Parke et Ornston, 1984).

Selon Stowers (1985), il existe trois voies principales du catabolisme des substrats carbonés entre les rhizobia à croissance rapide de type *Rhizobium* et *Sinorhizobium* et les souches à croissance lente de type *Bradyrhizobium* :

- ▶ la voie d'Entner-Doudoroff, qui est également la voie principale du métabolisme des hexoses.
- ▶ la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas, qui est variable d'une souche de rhizobium à une autre. Cette voie repose sur l'activité de l'enzyme phosphofructokinase.
- ▶ la voie du Pentose Phosphate, observée uniquement chez les souches à croissance rapide. Elle dépend principalement de l'enzyme 6-phosphogluconate (6-PG) déshydrogénase NADP dépendante.

Les souches étudiées ont présenté 100% d'assimilation du gluconate ce qui prouve que la 6-PG déshydrogénase est présente chez toutes les souches. En outre, l'existence de cet enzyme a été rapportée uniquement chez les rhizobia à croissance rapide. Le résultat obtenu nous permet donc de confirmer sur une base métabolique le taux de croissance rapide des souches.

Il résulte de cette étude que les souches testées de lupin présentent une assimilation de sources de carbone nettement similaire à celle des souches à croissance rapide.

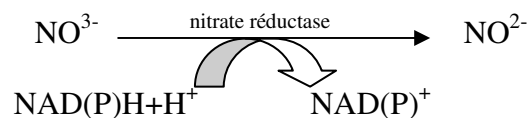
3. 5 – Hydrolyse de l' urée et réduction du nitrate

La mise en évidence de la capacité des rhizobia à hydrolyser l'urée a été initialement décrite par Jarvis *et al.* (1977) en utilisant le rouge de phénol comme un indicateur de pH. L'augmentation du pH du milieu par les souches suite à une réaction hydrolytique de l'urée se traduit par un changement de la coloration du milieu vers le rouge foncé ou le rouge indigo.

Les résultats obtenus pour les 52 souches testées sont rapportés dans le tableau 10. En général, 63% des souches ont pu hydrolyser l'urée. Des réponses variables ont été mises en évidence entre les souches isolées de la même région et à partir de la même espèce de lupin et en particulier entre les souches de l'amas nodulaire.

Dans le sol, l'azote est présent principalement sous forme d'ions ammonium (NH_4^+) et sous formes d'oxydes d'azote, les ions nitrates (NO_3^-) ou nitrites (NO_2^-).

Les nitrates sont la source préférentielle d'azote pour la plupart des microorganismes et de leur plantes hôtes. Le nitrate est réduit en nitrite par le nitrate réductase qui catalyse la réaction suivante :



Les nitrites formés sont réduits à leur tour en ammonium.

La capacité des souches de lupin testées à réduire le nitrate est représentée dans le tableau 10. En fait, 52% des souches ont pu réduire le nitrate contre 37% des souches, les 12% restantes auraient pu réduire le nitrate au-delà du stade nitrite d'où un résultat non déterminé.

La variabilité de l'aptitude à réduire le nitrate a été également rapportée chez différents rhizobia (Mc Neil, 1982 ; Zahran, 1991). Munns (1968) ont rapporté que la présence du nitrate dans le sol affecte la capacité de l'adsorption des rhizobia aux racines des plantes et inhibe leur capacité infective. Des travaux récents ont montré que la sensibilité au nitrate peut varier entre les différentes souches de *Bradyrhizobium* (Gibson et Harper, 1985) alors que

d'autres travaux ont montré que le nitrate affecte la compétition des souches de *Bradyrhizobium japonicum* pour infecter le soja (Martensson *et al.*, 1989).

L'aptitude à hydrolyser l'urée et à réduire le nitrate est une caractéristique écologiquement importante dont il faut tenir compte pour la sélection d'une souche particulière. En fait, un excès de nitrate dans le sol peut exercer un effet inhibiteur sur l'adsorption des rhizobia sur la surface des racines (Sherwood *et al.*, 1984) ainsi que sur leur capacité infective et effective (Davidson et Robson, 1986 ; Arreseigor *et al.*, 1997).

3. 6 – Résistance intrinsèque aux antibiotiques

Les marges de résistance des souches aux différents antibiotiques testés sont représentées dans le tableau 11. Les résultats indiquent que les souches montrent des réponses variables aux différents antibiotiques testés. Cette variabilité est notamment bien marquée chez les souches de l'amas nodulaire. De fortes résistances allant jusqu'à 200µg/ml ont été notées avec l'ampicilline et l'érythromycine alors que les plus faibles résistances de 10µg/ml ont été notés avec la tétracycline, la kanamycine, et la streptomycine.

La figure 19 indique que les souches de lupin ont montré une résistance bien marquée à l'érythromycine, plus de 80% ont présenté une bonne croissance à la concentration de 200 µg/ml. L'ampicilline qui est un inhibiteur de la synthèse de la paroi cellulaire (Annexe 10) n'a présenté qu'un moindre effet sur l'inhibition de la croissance des souches, environ 70% ont pu se développer à la concentration de 200 µg/ml.

Les souches se sont montrées plus résistantes au chloramphénicol, à l'acide nalidixique et à la spectinomycine. A la concentration de 50 µg/ml, des pourcentages de résistance de 94%, 79% et 63% ont été respectivement notés pour les trois antibiotiques.

Les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines et de membrane plasmique (Annexe 10) tels que la kanamycine, la tétracycline et la streptomycine se sont révélés les plus néfastes sur la croissance des souches. En effet, moins de 50% des souches ont pu croître avec la tétracycline et la streptomycine à la concentration de 50 µg/ml. L'inhibition a été plus marquée avec la kanamycine, à 25 µg/ml, seul 15% des souches ont pu se développer.

Graham *et al.* (1991) ont rapporté que l'effet inhibiteur d'un antibiotique dépend de sa nature et de sa concentration dans le milieu et que le degré d'inhibition est variable d'une espèce à une autre et d'une souche à l'autre.

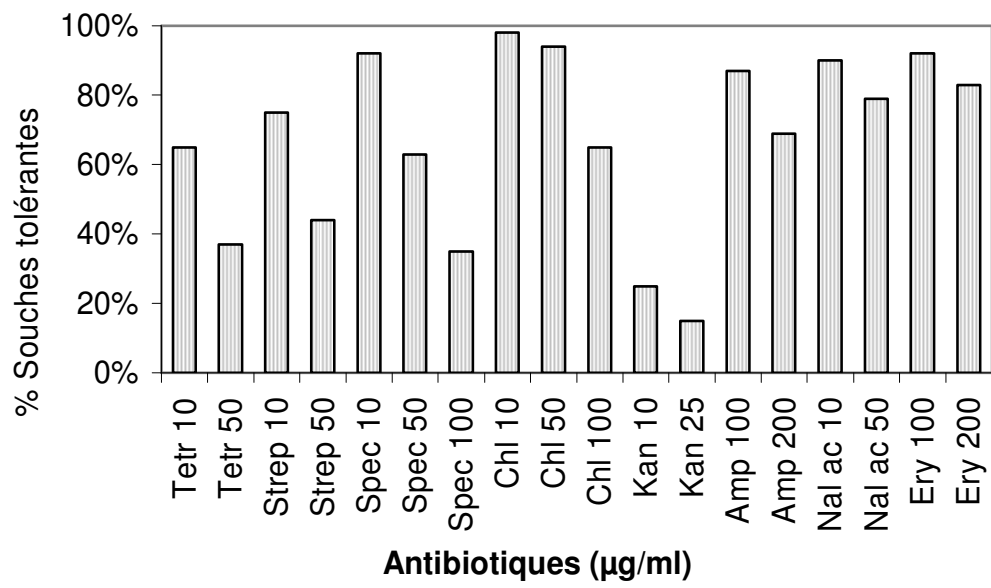


Figure 19. Effet des antibiotiques sur la croissance des souches nodulant le lupin

Tableau 11. Résistance intrinsèque des souches nodulant le lupin à différents types d'antibiotiques.

Plante hôte	Souches	Antibiotiques (µg/ml)							
		Tetr.	Strep.	Spec.	Chl.	Kan.	Amp.	Nal.	Ery.
<i>L. luteus</i>	MSMC 511	< 10	50	100	100	< 10	200	50	200
	MSMC 513	< 10	50	100	100	< 10	200	50	200
	MSMC 514	50	50	10	100	< 10	200	50	200
	MSMC 515	< 10	< 10	50	50	< 10	100	< 10	200
	MSMC 516	10	50	100	100	< 10	100	50	200
	MSMC 517	< 10	< 10	50	50	< 10	100	< 10	200
	MSMC 518	< 10	< 10	50	100	< 10	100	< 10	200
	MSMC 5110	50	50	50	100	< 10	200	50	200
	MSMC 5111	< 10	< 10	50	50	< 10	200	10	200
	MSMC 5112	< 10	< 10	50	50	< 10	100	10	200
	MSMC 5113	10	50	50	100	< 10	200	50	200
	MSMC 5114	< 10	10	100	100	< 10	200	50	200
	MSMC 5115	10	50	100	100	< 10	200	50	200
	MSMC 5116	50	50	50	50	25	100	50	200
	MSMC 5119	50	50	10	100	< 10	100	50	100
	MSMC 5123	10	10	10	100	< 10	200	50	200
	MSMC 5126	50	10	100	100	10	200	50	200
	MSMC 5127	< 10	< 10	10	50	< 10	200	10	200
	MSMC 5133	10	10	100	100	< 10	200	50	200
	MSMC 5142	< 10	< 10	< 10	10	< 10	15	10	100
	MSMC 5143	50	10	50	100	< 10	200	50	200
	MSMC 5150	10	50	50	100	< 10	200	50	200
	MSMC 5155	10	10	50	100	< 10	200	50	200
MSMC 5156	10	10	100	50	10	200	50	200	
INRA L15	50	< 10	10	50	< 10	200	10	200	
INRA L16	50	50	100	50	25	200	50	200	
INRA L17	50	10	100	100	< 10	200	50	200	

	Souches	Antibiotiques (µg/ml)							
		Tetr.	Strep.	Spec.	Chl.	Kan.	Amp.	Nal.	Ery.
<i>L. albus</i>	INRA L21	< 10	50	100	100	25	200	50	200
	INRA L211	10	50	50	100	< 10	15	50	200
	INRA L212	10	10	50	100	< 10	15	50	100
	INRA L23	50	< 10	< 10	50	< 10	15	50	ND
	INRA L29	10	< 10	< 10	50	< 10	15	50	200
<i>L. angustifolius</i>	MSMC 532	50	50	< 10	100	< 10	200	10	< 25
	MSMC 536	50	10	10	100	< 10	200	50	200
	MSMC 539	< 10	50	10	100	< 10	200	50	20
	MSMC 5319	< 10	50	10	100	< 10	200	50	25
	MSMC 5326	50	50	100	100	25	200	50	200
	MSMC 5328	< 10	10	10	< 10	10	200	50	25
	INRA L32	< 10	50	100	100	25	200	50	200
<i>L. cosentini</i>	MSMC 541	10	50	10	100	< 10	200	50	200
	MSMC 547	50	10	10	50	< 10	100	< 10	200
	MSMC 549	< 10	10	50	100	< 10	200	50	200
	MSMC 5416	< 10	< 10	10	50	< 10	< 15	50	100
	MSMC 5419	10	10	10	100	< 10	200	< 10	200
	MSMC 5425	50	50	100	100	25	200	50	200
	INRA L43	50	50	100	100	25	200	50	200
	INRA L44	10	< 10	10	50	25	100	50	200
<i>L. pilosus</i>	MSMC 554	50	50	100	100	< 10	200	50	200
	MSMC 556	< 10	< 10	50	10	< 10	< 15	50	200
	INRA L51	10	10	10	50	< 10	200	50	200
	INRA L52	50	50	100	100	10	200	50	200
<i>L. atlanticus</i>	INRA L61	50	10	100	100	10	200	50	200

Tetr. = tétracycline, Strep. = spectinomycine, Spec. = streptomycine, Kan. = kanamycine
Chl. = chloramphénicol, Amp. = ampicilline, Nal. = acide nalidixique, et Ery. = l'érythromycine.

Parallèlement à nos résultats, les trois derniers antibiotiques précités se sont révélés les plus inhibiteurs de la croissance de quelques souches à croissance rapide de lupin (Schlinkert et Pepper, 1988). La Kanamycine s'est révélée également l'antibiotique le plus inhibiteur de la croissance de certaines souches de *Bradyrhizobium* nodulant le lupin en Pologne (Madzrak *et al.*, 1995) et de quelques souches nodulant différentes espèces d'*Acacia* au Maroc (Zerhari *et al.*, 2000).

La sensibilité de différentes souches de lupin à la streptomycine a été également rapportée (Gabor, 1965). La même sensibilité a été rapportée pour des souches à croissance rapide d'*Acacia* (Mohammed *et al.*, 2000).

Jordan (1984) a montré que les souches à croissance rapide sont plus sensibles à la tétracycline et à la streptomycine alors que les bradyrhizobia sont plus résistants aux antibiotiques. Le même résultat a été rapporté par Elkan (1992) et Mpeperekki *et al.* (1997). Cependant, des souches de *Rhizobium* hautement tolérantes aux antibiotiques ont été isolées de différents sols de Malaisie (Roughley *et al.*, 1992). Parallèlement, Odee *et al.* (1997) ont montré que les bradyrhizobia sont plus sensibles que les souches à croissance rapide vis-à-vis de différents antibiotiques testés à la même concentration de 40 µg/ml.

L'évaluation de la résistance des souches de lupin aux différents antibiotiques testés a montré que les profils sont généralement similaires à ceux des souches à croissance rapide concernant la kanamycine, la tétracycline et la streptomycine. Toutefois, les souches montrent une grande tolérance à l'érythromycine et à l'ampicilline.

La sélection de souches présentant une résistance multiple aux différents antibiotiques est très intéressante du fait que cette résistance peut être utilisée comme un important marqueur pour l'identification des souches et l'étude de leur diversité (Josey *et al.*, 1979 ; Shishido et Pepper, 1990 ; Sawada *et al.*, 1990).

3. 7 – Résistance intrinsèque aux métaux lourds

L'effet de six différents métaux lourds sur le développement des souches de lupin a été évalué (tableau 12). La plus forte résistance a été enregistrée pour les chlorures d'aluminium, de magnésium et de zinc. Les concentrations varient entre 200 à 400 µg/ml. A l'opposé, une plus faible résistance a été enregistrée pour le chlorure de cadmium et le chlorure de mercure testés de 5 à 30µg/ml et à 40µg/ml respectivement. Ces deux métaux s'avèrent donc les plus

Tableau 12. Résistance intrinsèque des souches nodulant le lupin aux métaux lourds

Plante hôte	Souches	Métaux lourds ($\mu\text{g/ml}$)					
		Al	Mn	Zn	Cd	Hg	Co
<i>L. luteus</i>	MSMC 511	400	400	400	30	40	100
	MSMC 513	400	400	400	30	5	100
	MSMC 514	300	400	200	5	40	< 100
	MSMC 515	400	400	400	30	40	100
	MSMC 516	400	400	400	30	40	100
	MSMC 517	400	400	400	30	40	100
	MSMC 518	400	400	400	30	40	100
	MSMC 5110	400	400	400	30	40	< 100
	MSMC 5111	400	400	400	30	40	100
	MSMC 5112	400	400	200	5	40	100
	MSMC 5113	300	400	400	30	40	< 100
	MSMC 5114	200	400	400	20	40	< 100
	MSMC 5115	400	400	400	5	40	< 100
	MSMC 5116	400	400	< 200	30	40	100
	MSMC 5119	400	200	< 200	< 5	40	< 100
	MSMC 5123	200	400	< 200	5	40	< 100
	MSMC 5126	400	400	400	30	40	< 100
	MSMC 5127	400	400	200	5	40	< 100
	MSMC 5133	400	400	300	5	40	< 100
	MSMC 5142	400	200	400	5	40	< 100
	MSMC 5143	400	400	400	30	40	< 100
	MSMC 5150	200	200	< 200	5	40	100
	MSMC 5155	300	200	300	30	5	< 100
	MSMC 5156	400	400	< 200	30	5	< 100
	INRA L15	400	200	400	30	5	< 100
	INRA L16	400	200	400	30	5	< 100
	INRA L17	400	400	400	30	5	100

Plante hôte	Souches	Métaux lourds (µg/ml)					
		Al	Mn	Zn	Cd	Hg	Co
<i>L. albus</i>	INRA L21	400	400	400	30	5	100
	INRA L211	400	400	400	30	5	< 100
	INRA L212	400	400	400	30	5	100
	INRA L23	400	400	400	30	5	100
	INRA L29	400	400	400	30	5	< 100
<i>L. angustifolius</i>	MSMC 532	200	400	< 200	5	40	< 100
	MSMC 536	200	400	200	30	40	< 100
	MSMC 539	400	400	< 200	5	40	< 100
	MSMC 5319	300	400	300	5	40	100
	MSMC 5326	400	400	200	30	40	< 100
	MSMC 5328	300	400	< 200	30	20	< 100
	INRA L32	400	400	400	30	5	100
<i>L. cosentinii</i>	MSMC 541	400	400	400	30	40	< 100
	MSMC 547	400	400	400	30	40	< 100
	MSMC 549	400	400	< 200	20	40	< 100
	MSMC 5416	400	400	< 200	5	40	100
	MSMC 5419	400	400	200	20	40	< 100
	MSMC 5425	400	400	400	30	40	< 100
	INRA L43	400	400	400	30	5	100
	INRA L44	400	200	400	30	5	100
<i>L. pilosus</i>	MSMC 554	400	400	400	30	40	< 100
	MSMC 556	400	400	400	5	40	< 100
	INRA L51	400	200	400	30	20	100
	INRA L52	400	400	400	30	20	100
<i>L. atlanticus</i>	INRA L61	400	400	400	30	20	100

Al = aluminium, Mn = manganèse, Zn = zinc, Cd = cadmium, Hg = mercure et Co = cobalt.

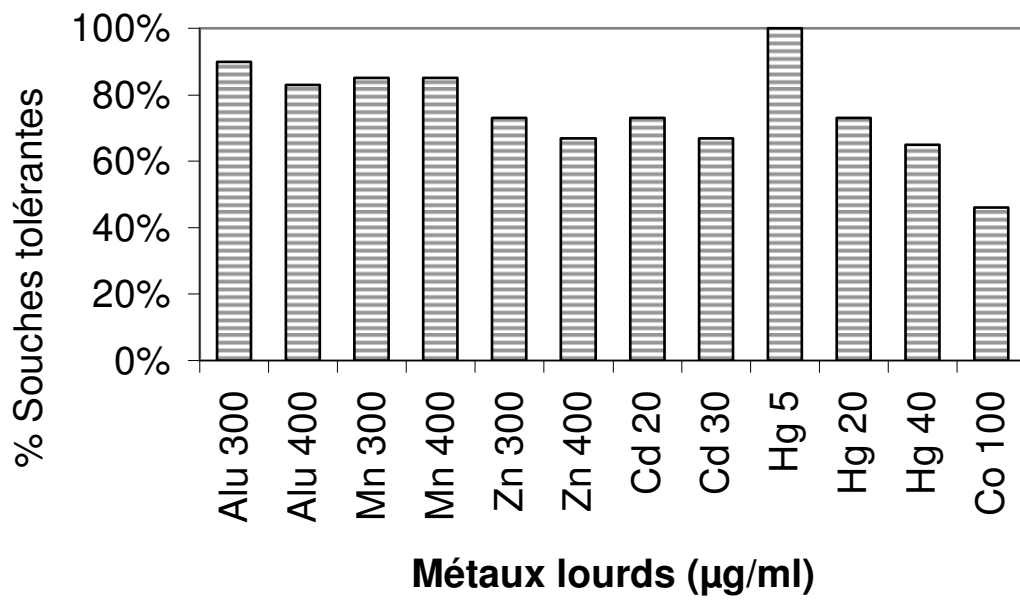


Figure 20. Effet des métaux lourds sur la croissance des souches nodulant le lupin

inhibiteurs pour le développement des souches. Toutefois, les souches de l'amas nodulaire sont majoritairement résistantes à ces deux formes de métaux. Toutefois, les niveaux de résistance aux différents métaux testés étaient généralement similaires entre les différentes souches.

La figure 20 indique que plus de 80% des souches montrent une grande résistance à l'aluminium et au manganèse à la concentration de 400 µg/ml. A la même concentration en zinc, plus de 60% des souches se sont révélées également résistantes. Contrairement à nos résultats, Zerhari *et al.* (2000) a montré que les souches d'acacia à croissance rapide étaient plus sensibles à l'aluminium.

Il a été rapporté que l'aluminium agit au niveau de l'ADN des souches de *Rhizobium* (Johnson et Wood, 1990). L'exposition de ces bactéries aux fortes concentrations en aluminium affecte également leur mobilité dans le sol et leur capacité infective (Octive *et al.*, 1994).

L'exposition à un excès de manganèse affecte la composition de la membrane externe chez les rhizobia. En fait, Appana (1988) a montré que les fortes concentrations en manganèse peuvent altérer la composition ainsi que le rôle des exopolysaccharides chez des souches de *Sinorhizobium meliloti*.

Wilson et Reissauer (1970) ont rapporté que le manganèse et le zinc affectent négativement la croissance des rhizobia. Un excès de zinc exerce un effet inhibiteur non seulement sur la croissance des rhizobia mais aussi sur leur efficacité à travers la perte des plasmides symbiotiques (Casella *et al.*, 1988 ; Giller *et al.*, 1998).

La résistance des souches de lupin aux différentes concentrations testées en cadmium et en mercure paraît être semblable. Ces deux métaux ont été testés à de faibles concentrations et les résultats confirment qu'ils sont les plus inhibiteurs de la croissance. La taille des colonies formées a été également et visiblement très réduite par rapport à celle des témoins.

Actuellement, le cadmium est reconnu comme étant néfaste aussi bien pour les microorganismes symbiotiques que pour l'établissement de la symbiose (Tiller *et al.*, 1994 ; Purchase *et al.*, 1997 ; Gusmao-lima *et al.*, 2005).

Le cobalt testé à 100 µg/ml a pu entraîner l'inhibition de la croissance de plus de 50% des souches. Il a été rapporté que les fortes concentrations en cobalt agissent négativement sur la

croissance des souches de *Bradyrhizobium japonicum* (Lowe *et al.*, 1960). Ce métal exerce un effet négatif sur la survie des rhizobia de lupin, sur l'initiation nodulaire ainsi que sur la colonisation de la rhizosphère par ces bactéries (Riley et Dilworth, 1985).

Les métaux lourds présents dans le sol peuvent entraîner un dysfonctionnement du métabolisme cellulaire des rhizobia (Gusmao-lima *et al.*, 2005). Le nombre et la survie de ces bactéries dans les sols contaminés peuvent être sévèrement affectés (Reddy *et al.*, 1983 ; Obbard *et al.*, 1994).

Angle *et al.* (1993) ainsi que Tong et Sadowsky (1994) ont rapporté que les souches de *Bradyrhizobium* sont plus résistantes aux métaux lourds puisqu'ils ont la capacité d'alcaliniser le milieu et rendre ainsi les métaux moins disponibles dans leur environnement. Cependant, une grande variabilité de résistance à différents métaux lourds a été observée entre les souches appartenant à la même espèce *Bradyrhizobium japonicum* (Kinkle *et al.*, 1987).

La nature du sol et son pH peuvent influencer la précipitation ou la solubilité des minéraux. Sous forme ionique, un métal devient plus mobile et donc plus toxique. L'effet combiné du pH et des métaux lourds sur une population de *Rhizobium leguminosarum* et sur son potentiel fixateur d'azote s'est révélé plus néfaste sous les conditions d'acidité (Ibekwe *et al.*, 1997).

Certaines associations rhizobium – légumineuse sont capables de se maintenir sur des sols à haut contenu en métaux lourds. En effet, l'inoculation des graines de trèfle cultivées sous stress métallique par des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* efficaces et résistantes aux métaux lourds a pu augmenter le taux de la fixation d'azote (Giller *et al.*, 1989). L'inoculation de Glycine max par des rhizobia hautement résistants a été rapportée être bénéfique (Dev *et al.*, 1998).

La sélection de souches résistantes aux métaux lourds présente un grand intérêt pratique. Plusieurs recherches se penchent actuellement sur l'utilisation de la symbiose entre des rhizobia et des légumineuses résistantes comme un moyen efficace de "bio-remédiation" contre la contamination des sols par les métaux lourds. En outre, l'utilisation du rhizobium comme un agent de prévention dans les sols contaminés a été récemment rapportée par Abbas et Kamel (2004).

3. 8 – Tolérance à la salinité

Les souches étudiées se sont avérées très tolérantes à des concentrations élevées en NaCl (Tableaux 13 et Annexe 14). La limite de tolérance des souches au sel s'étend de 170 mM avec la souche INRA L52 jusqu'à 1700 mM avec 9% de souches en l'occurrence la MSMC 5124, INRA L 213, INRA L 34, MSMC 5411 et autres. Particulièrement, les souches de l'amas nodulaire présentent différentes marges de tolérance qui se situent entre 680 mM et 1530 mM.

La figure 21 montre que la tolérance à la salinité diminue progressivement en fonction de l'augmentation de la concentration en sel. Toutefois 80 % des souches peuvent tolérer une concentration de 850 mM NaCl et presque 60% tolèrent plus de 1M NaCl. Des souches hautement tolérantes (9% des souches) pouvant croître à 1700 mM NaCl ont été également identifiées.

Raza *et al.* (2001) ont isolé des souches de lupin pouvant tolérer jusqu'à 1190 mM NaCl. Parallèlement à nos résultats, Zahran *et al.* (1994) ont rapporté des niveaux de tolérance chez des souches de lupin isolées d'Egypte pouvant aller jusqu'à 1700 mM NaCl. Les rhizobia d'arbres légumineux sont supposés être plus tolérants à la salinité. Des souches nodulant *Acacia*, *Prosopis* et *Leucaena* se sont révélées tolérantes à 500 mM et à 850 mM NaCl (Lal et Khanna, 1995 ; Zerhari *et al.*, 2000). Toutefois, un développement à une concentration saline de 850 mM et même plus a été rapporté pour différentes souches nodulant des plantes annuelles cultivées ou fourragères au Maroc. Maâtallah *et al.* (2002) ont pu identifier des souches nodulant le pois chiche qui tolèrent 850 mM NaCl. Des rhizobia nodulant le funegreck sont capables de croître à une concentration en NaCl aussi élevée que 2380 mM (14%) (Abdelmoumen *et al.*, 1999).

Les limites de tolérance à la salinité entre les rhizobia peuvent varier considérablement d'une espèce à une autre (Elsheikh et Wood, 1989 ; Rai, 1983) et même entre les souches de la même espèce (Kassem *et al.*, 1985).

Graham et Parker (1964) ont montré que les souches à croissance rapide sont plus tolérantes à la salinité que les bradyrhizobia. Des résultats similaires ont été également rapportés par plusieurs auteurs (Jordan, 1984 ; Stowers et Elkan, 1984 ; Elsheikh et Wood, 1989 ; Odee *et al.*, 1997). Toutefois, des souches à croissance lente nodulant le genre *Vigna* pouvant tolérer des concentrations élevées en NaCl de l'ordre de 4 % à 5,5 % ont été caractérisées par

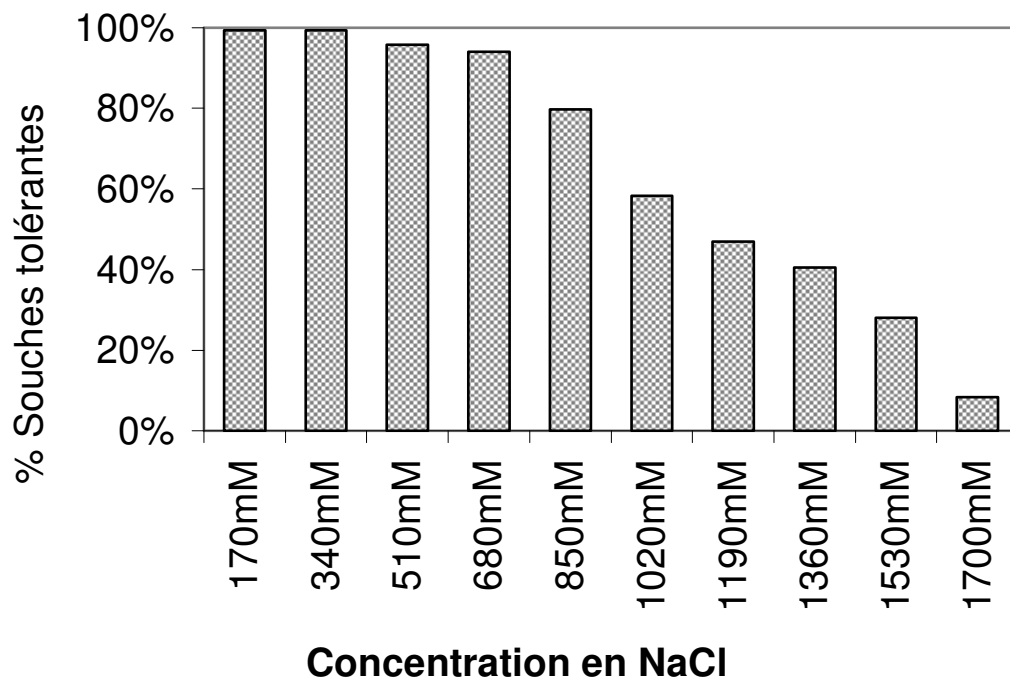


Figure 21. Tolérance des souches nodulant le lupin à différentes concentrations en NaCl

Tableau 13. Marge de tolérance des rhizobia nodulant le lupin au NaCl, au pH et à la température.

Plante hôte	Souches	NaCl (mM)	pH (unités)	T (°C)
<i>L. luteus</i>	MSMC 511	850	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 512	1360	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 513	850	4,5 - 9,5	4 – 42
	MSMC 514	1020	4,5 - 9,5	4 – 42
	MSMC 515	1360	3 - 9,5	4 – 42
	MSMC 516	850	4,5 - 9,5	4 – 42
	MSMC 517	1530	4,5 - 9,5	4 – 42
	MSMC 518	1530	4,5 - 9,5	4 – 42
	MSMC 519	1530	4,5 - 9,5	4 – 42
	MSMC 5110	850	4 - 9,5	4 – 42
	MSMC 5111	1530	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5112	1530	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5113	1020	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5114	680	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5115	850	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5116	680	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5117	850	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5118	1020	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5119	1020	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5120	680	5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5121	680	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5122	850	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5123	1020	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5124	1700	3,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5125	850	3,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5126	850	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5127	1530	3,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5128	1360	3,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5129	850	3,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5130	1530	3,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5131	1700	3,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5132	850	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5133	850	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5134	1530	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5135	1530	4,5 – 9,5	15 – 42
	MSMC 5136	850	5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5137	1360	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5138	1530	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5139	1530	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5140	1530	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5141	1530	3,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5142	1530	3 – 9,5	4 – 42

	Souches	NaCl (mM)	pH (unités)	T (°C)
<i>L. luteus</i>	MSMC 5143	1530	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5144	1530	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5145	1360	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5146	1360	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5147	1360	3,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5148	1530	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5149	850	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5150	850	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5151	1360	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5152	510	3,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5153	1360	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5154	680	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5155	850	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5156	850	4 – 9,5	4 – 35
	MSMC 5157	1360	3,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5158	680	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5159	1020	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5160	1190	3 – 9,5	4 – 42
	INRA L11	1700	4 – 9,5	4 – 42
	INRA L12	850	4 – 9,5	10 – 42
INRA L13	1700	3,5 – 9,5	4 – 42	
INRA L14	1700	3,5 – 9,5	4 – 35	
INRA L15	1700	4 – 9,5	4 – 42	
INRA L16	1530	4 – 9,5	4 – 42	
INRA L17	1360	4 – 9,5	4 – 42	
INRA L18	1360	4 – 9,5	4 – 42	
INRA L19	1700	3,5 – 9,5	4 – 42	
<i>L. albus</i>	MSMC 521	1190	3,5 - 9,5	4 – 42
	MSMC 522	1020	4 – 9,5	4 – 42
	INRA L21	1530	4 – 9,5	4 – 42
	INRA L210	1530	3,5 – 9,5	4 – 42
	INRA L211	1360	4 – 9,5	4 – 42
	INRA L212	1190	4 – 9,5	4 – 42
	INRA L213	1700	3,5 – 9,5	4 – 42
	INRA L23	1530	5,5 – 9,5	4 – 42
	INRA L24	680	4 – 9,5	10 – 42
	INRA L26	850	4 – 9,5	4 – 42
	INRA L27	680	5 – 9,5	4 – 42
	INRA L28	680	4 – 9,5	4 – 42
	INRA L29	680	3,5 – 9,5	10 - 42

	Souches	NaCl (mM)	pH (unités)	T (°C)
<i>L. angustifolius</i>	MSMC 531	510	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 532	340	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 533	850	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 534	850	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 535	850	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 536	680	4 – 9,5	10 – 42
	MSMC 537	850	3,5 – 9,5	4 – 35
	MSMC 538	1020	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 539	1190	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5310	680	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5311	680	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5312	850	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5313	850	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5314	850	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5315	1020	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5316	1190	3,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5317	340	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5318	1020	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5319	680	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5320	1530	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5321	850	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5322	850	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5323	850	4 – 9,5	10 – 42
	MSMC 5324	1020	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5325	1020	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5326	680	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5327	1020	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5328	340	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5329	850	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5330	680	4,5 – 9,5	10 – 42
	MSMC 5331	1020	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5332	1360	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5333	1020	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5334	1360	4 – 9,5	4 – 42
	INRA L31	850	3,5 – 9,5	4 – 42
	INRA L32	1530	4 – 9,5	4 – 42
	INRA L33	680	4 – 9,5	4 – 35
	INRA L34	1700	3,5 – 9,5	4 – 42
INRA L35	1360	4 – 9,5	4 – 35	
INRA L36	1700	4 – 9,5	4 – 35	
INRA L37	680	4 – 9,5	4 – 42	
INRA L38	680	4 – 9,5	4 – 42	

	Souches	NaCl (mM)	pH (unités)	T (°C)
<i>L. cosentini</i>	MSMC 541	1360	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 542	1360	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 543	1190	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 544	1190	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 545	1360	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 546	1360	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 547	1190	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 548	680	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 549	1530	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5410	1530	3,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5411	1700	3,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5412	1700	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5413	850	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5414	1530	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5415	1700	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5416	1530	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5417	1530	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5418	680	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5419	850	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5420	850	5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5421	510	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5422	680	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5423	1190	3,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5424	1700	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5425	1360	3 – 9,5	4 – 42
	INRA L41	680	4 – 9,5	4 – 42
	INRA L42	680	4 – 9,5	4 – 42
	INRA L43	850	3,5 – 9,5	10 – 42
INRA L44	340	3,5 – 9,5	4 – 42	
<i>L. pilosus</i>	MSMC 551	1190	3,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 552	340	4 – 9,5	4 – 42
	MSMC 553	1530	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 554	850	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 555	1530	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 556	510	4,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 557	1530	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 558	1020	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 559	1020	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5510	1530	3,5 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5511	1020	3 – 9,5	4 – 42
	MSMC 5512	1020	3 – 9,5	4 – 42
	INRA L51	1530	4 – 9,5	4 – 42
<i>L. atlanticus</i>	INRA L52	170	5 – 9,5	10 – 42
	INRA L61	1190	5 – 9,5	4 – 42

Mpeperekı *et al.* (1997). Des études ont montré cependant que la tolérance au sel n'est pas corrélée avec le taux de croissance (Zerhari *et al.*, 2000) mais à d'autres mécanismes physiologiques et biochimiques (Botsford et Lewis, 1990 ; Brhada *et al.*, 1997 ; Gouffi *et al.*, 1999).

Nous avons noté que les souches MSMC 5317 et INRA L 52 qui proviennent des régions non irriguées ont été inhibées par les basses concentrations testées de 170 mM et 340 mM NaCl alors que les souches qui proviennent de sites des régions irriguées telles que les souches isolées de *L. luteus* dans la région du Gharb sont toutes tolérantes au sel. Le Gharb est classé comme étant une région menacée par une salinisation croissante du sol. La tolérance au sel qui caractérise les souches étudiées pourrait être en rapport avec le taux de salinité du site d'isolement. Un résultat similaire a été rapporté par Maâtallah *et al.* (2002) pour des souches de *Mesorhizobium* nodulant le pois chiche au Maroc et par Mohammed *et al.* (2000) pour des souches nodulant *Acacia* en Libye.

Mpeperekı *et al.* (1997) ont rapporté que l'existence de souches tolérantes à la salinité dans les sites salins peut être une indication d'une adaptation au stress osmotique qui est dû à l'augmentation de la concentration d'ions et à la variation de l'humidité du sol durant les périodes sèches.

Dans cette étude, nous avons noté que la majorité des souches présentent une bonne tolérance à la salinité. Cependant, dans les environnements salins, la symbiose rhizobia - lupin dépend non seulement du microorganisme mais également de la plante hôte. Il a été rapporté que l'espèce *L. angustifolius* peut se développer à un niveau de salinité de sol très élevé (Bordeleau et Prévost, 1994). Cependant, Cette espèce est très riche en alcaloïdes et se trouve au Maroc essentiellement à l'état sauvage.

La sélection de couples symbiotiques tolérants à la salinité reste l'élément essentiel pour l'amélioration de la symbiose sous des conditions de stress salin.

3. 9 – Tolérance au pH

Les résultats de la tolérance aux pH acides *et* alcalins de l'ensemble des souches de la collection sont présentés dans le tableau 13. Les pH alcalins sont plus tolérés que les pH acides. Les souches, y compris ceux de l'amas nodulaire, ont pu toutes tolérer la grande valeur de pH testée qui est de 9,5. La tolérance à l'acidité s'est révélée par contre très variable

avec des marges comprises entre 3 et 5. Toutefois, la souche INRA L 23 ne peut se développer qu'à partir du pH 5,5.

La figure 22 représente le pourcentage de souches tolérantes aux différents pH testés. Aux pH neutres *et alcalins*, toutes les souches présentent un développement optimal. 100% des souches testées sont même capables de pousser au pH 9,5. Les tests du pH conduits sur le milieu YEM liquide ont pu confirmer les résultats obtenus sur le YEM solide.

Aux pH acides, une sensibilité variable des souches de lupin a été notée. La figure 22 montre une diminution de la tolérance en partant de la neutralité vers l'acidité. Toutefois, 99% des souches peuvent croître au pH 5, 80% des souches peuvent croître au pH 4, la moitié des souches peut tolérer un pH de 3,5 et 33% ont pu croître au pH 3.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Raza *et al.* (2001) qui ont rapporté une tolérance allant du pH 4 au pH 10 pour quelques souches isolées des deux espèces *L. luteus* et *L. angustifolius*. Cordero et Blair (1978) ont rapporté que la limite inférieure de la tolérance au pH pour *Rhizobium lupini* est d'environ 4,2 à 3,2.

Selon Graham (1964) et Jordan (1984), les rhizobia peuvent tolérer des pH allant de 4,5 à 9. Yadav et Vyas (1971) ont même montré qu'une vingtaine de souches isolées de huit espèces différentes de légumineuses ont pu tolérer des pH élevés de l'ordre de 10 sous des conditions non salines.

D'après nos résultats, les souches étudiées ont généralement un taux de croissance rapide et sont globalement tolérantes à l'alcalinité et majoritairement tolérantes à l'acidité.

Zablotowicz et Focht (1981) ont rapporté que les souches à croissance lente qui nodulent *Vigna unguiculata* ont été plus sensibles aux pH alcalins que celles à croissance rapide. D'autres études ont montré que les rhizobia à croissance rapide sont généralement plus sensibles à l'acidité que les bradyrhizobia (Jordan, 1984 ; van Rossum *et al.*, 1994). Cependant, des souches de la même espèce peuvent montrer une large variation de tolérance au pH (Glenn et Dilworth, 1994). En effet, des souches tolérantes à des valeurs très basses de pH ont été retrouvées chez des espèces à croissance rapide telles que *Mesorhizobium loti* et *Rhizobium tropici* (Cooper, 1982 ; Cooper *et al.*, 1985 ; Graham, 1992 ; Graham *et al.*, 1994 ; Gao *et al.*, 1994). Toutefois, certains auteurs ont montré qu'il n'y a pas de corrélation entre la

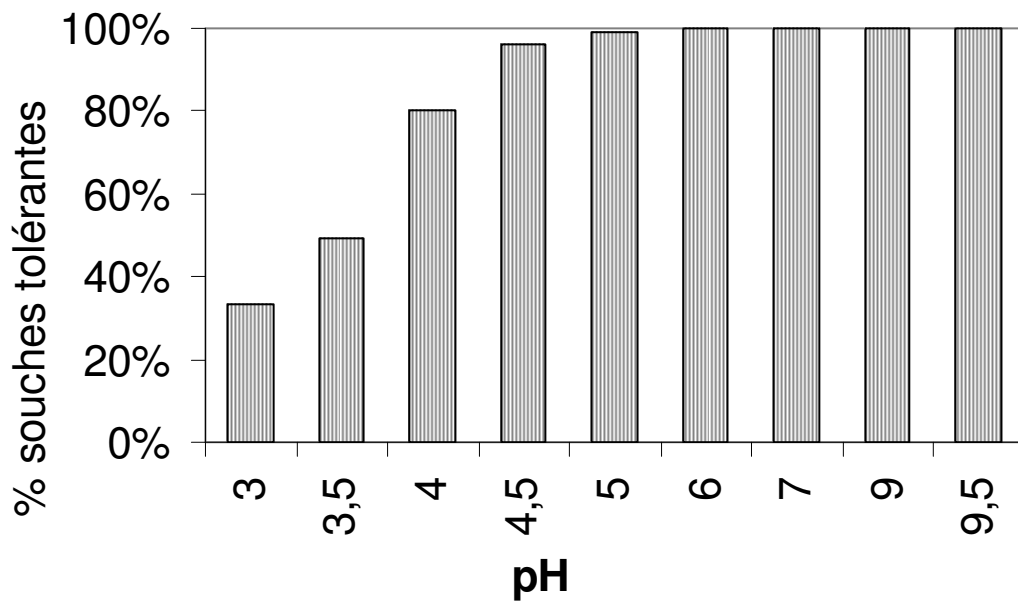


Figure 22. Tolérance aux pH des souches nodulant le lupin

tolérance d'une souche au pH acide du milieu et le taux de sa croissance (Mohamed *et al.*, 2000). De plus, Correa et Barneix (1997) ont montré que la tolérance au pH acide de quelques souches à croissance rapide appartenant à l'espèce *Mesorhizobium loti* ne peut pas être corrélée à leur aptitude à acidifier le milieu. Ces auteurs ont suggéré que la tolérance apparente ne peut pas être due à l'excrétion de composés qui alcalinisent le milieu mais plutôt à la présence d'autres facteurs qui protègent la cellule bactérienne de l'action de la forte concentration extracellulaire en protons.

Il a été rapporté que la tolérance des souches à l'acidité peut être due au pH acide du milieu d'isolement de ces souches. Dans notre cas, les valeurs du pH au KCl mesurées pour les différents sites d'isolement des souches étudiées sont majoritairement acides ou neutres. Graham (1998) a rapporté que les souches isolées des sols acides ne sont pas toutes tolérantes à l'acidité mais celles-ci peuvent se développer dans des microniches à pH favorable. Cependant, l'isolement et la sélection de souches efficaces tolérantes à l'acidité à partir de sols acides a été largement rapporté (Nour *et al.*, 1994b ; Del Papa *et al.*, 1999). En Australie de l'ouest, l'usage d'une souche indigène de *Sinorhizobium meliloti* tolérante au pH acide pour l'inoculation de *Medicago polymorpha*, légumineuse également adaptée aux conditions acides, a pu aboutir à l'augmentation des terrains de pâturage sur sols acides (Howieson *et al.*, 1988). Gardner *et al.* (1983) (cité par Bordeleau et Prévost, 1994) ont rapporté que différentes espèces du genre *Lupinus* montrent une bonne adaptation au pH acide. En outre, une grande réduction de la nodulation et de la fixation d'azote chez les lupins cultivées a été observée sur des sols à pH supérieur à 6,5 (ITCF *et al.*, 1988). Dans de tel cas, la sélection de couples tolérants à l'alcalinité s'avère l'élément nécessaire pour une symbiose efficace. Dans notre étude, la majorité des souches présente une tolérance de 100% au pH variant entre 4,5 et 9. Par conséquent, la sélection de souches tolérantes à un pH acide ou alcalin est très large.

3. 10 – Tolérance à la température

Les résultats indiquant les marges de tolérance à la température des souches de lupin sont représentées dans le tableau 13. La totalité des souches de l'amas nodulaire et la plupart des autres souches tolèrent des températures variant de 4 à 42°C. La souche 5135 ne présente aucun développement à des températures inférieures à 15°C et 5% de souches sont inhibées par les températures inférieures à 10°C (INRA L12, INRA L24, INRA L 29, MSMC 536 et autres). Certaines souches ne peuvent pas tolérer des températures supérieures à 35°C, c'est le cas de 4% de souches telles que la MSMC 5156, INRA L 14, MSMC 537, etc. Il résulte de ce

test que la majorité des souches présentent une bonne thermotolérance tant aux basses qu'aux hautes températures.

La figure 23 montre que toutes les souches présentent une bonne croissance entre 10°C et 35°C. En outre, 95 % des souches ont pu croître à 4°C et 38°C et peuvent même supporter une température de 42°C.

Les souches thermotolérantes peuvent ne pas croître à une température élevée déterminée mais peuvent plutôt survivre à un rythme très ralenti. Ceci a été mis en évidence par le suivi de la croissance de la souche MSMC 5110 aux températures de 28°C et 42°C. A 28°C, le temps de génération a été évalué à 45min. alors qu'à 42°C la DO ne dépassait guère la valeur de 0,64 même après 15 jours d'incubation.

Graham (1992) a rapporté que les rhizobia sont des bactéries mésophiles qui peuvent se développer à des températures se situant entre 10°C et 37°C et que la température optimale de croissance de la plupart des souches est 28°C. Toutefois, il existe des souches qui tolèrent des températures extrêmes comme celles qui nodulent certaines légumineuses dans les régions arctiques (Lipsanen et Lindström, 1989) ou bien celles isolées dans l'environnement chaud et sec de la savane du sahel en Afrique et qui peuvent tolérer des températures au-delà de 40°C (Eaglesham et Ayanaba, 1984 ; Karanja et Wood, 1988).

Des souches de *Rhizobium leguminosarum* isolées de plantes de lentille dans la vallée du Nil peuvent tolérer jusqu'à 35°C et 40°C (Moawad et Beck, 1991). Plusieurs études ont rapporté que les rhizobia d'arbres légumineux ont l'aptitude de tolérer une température de 40°C (de Lajudie *et al.*, 1994 ; Zahran *et al.*, 1994 ; Missbah El Idrissi, 1996).

Il a été rapporté que les bradyrhizobia sont plus thermotolérants que les souches à croissance rapide (Robert *et al.*, 1982 ; Munevar et Wollum, 1981). Une tolérance à 48,7°C a été rapportée pour quelques souches de *Bradyrhizobium japonicum* (Munevar et Wollum, 1981). Néanmoins, Karanja et Wood (1988) ont montré que quelques souches de *Rhizobium phaseoli* peuvent tolérer des températures de 45°C à 47°C. Ces mêmes auteurs ont rapporté que même si ces souches peuvent bien tolérer les hautes températures, elles perdent en revanche leur capacité infective.

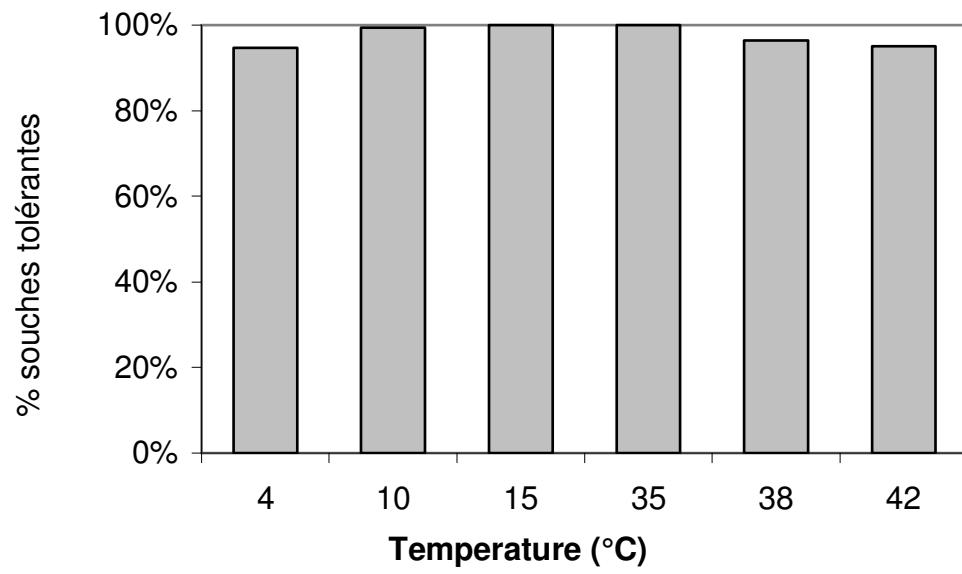


Figure 23. Tolérance des souches nodulant le lupin à différentes températures

Il a été rapporté que les basses températures sont parmi les principaux facteurs limitant la fixation d'azote par les rhizobia dans les régions très humides ou froides (Zhang et Smith, 1996). L'action similaire des hautes températures a été également rapporté (Kishinevsky *et al.*, 1992 ; Hungria et Franco, 1993).

L'exposition aux hautes températures peut mener à la perte du plasmide symbiotique et par conséquent la perte de la capacité infective de la bactérie. Les températures élevées peuvent mener à la réduction du nombre de cellules au dessous du niveau demandé pour une bonne nodulation. Somasegaran *et al.* (1984) ont pu montrer un déclin graduel de la persistance d'une population de souches de *Rhizobium* incubée à 37°C pendant huit semaines.

Il est évident que les rhizobia peuvent conserver une bonne performance quand elles sont utilisées dans un environnement à conditions climatiques similaires à leur site d'origine. Cependant, plusieurs auteurs ont signalé qu'il n'existe aucune corrélation entre la température du site d'isolement et la tolérance des souches au stress thermique (Zahran *et al.*, 1994 ; Mohammed *et al.*, 2000). De même, dans la présente étude, on a noté que les souches isolées dans les régions chaudes et arides (Marrakech) tolèrent la température de 4°C et que les souches isolées dans les régions plus humides (Rif) peuvent supporter les températures élevées de 40°C et 42°C.

D'après les résultats des trois tests précédents, une grande plasticité de tolérance au pH, à la salinité et à la température a été notée pour l'ensemble des souches nodulant les différentes espèces de lupin malgré leur provenance de régions très différentes et très éloignées. Par conséquent, la sélection de souches hautement tolérantes est très large. Ainsi, des candidats ont été sélectionnés pour les tests d'inoculations qui ont été menés par l'INRA de Rabat tout en prenant en considération le site et la plante hôte d'origine (Tableau 14).

Tableau 14. Souches sélectionnées pour les inoculations

Région	Plante hôte	Souches
Mnasra	<i>L. luteus</i>	MSMC 5116
Ceinture verte, Rabat	<i>L. luteus</i>	MSMC 5134
Guich, Rabat	<i>L. albus</i>	MSMC 522
Gharb	<i>L. angustifolius</i>	MSMC 537
Gharb	<i>L. cosentinii</i>	MSMC 545

3. 11 – Analyse numérique

L'analyse numérique englobe la comparaison des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques entre les souches prises deux à deux. Cette méthode d'analyse a été utilisée comme une première méthode de caractérisation et de regroupement de différentes souches non encore identifiées (Zhang *et al.*, 1991).

Il a été rapporté que l'analyse numérique ne peut être valable que sur une base comparative d'au moins 50 caractères relatifs aux souches (Sneath, 1984). Cette marge n'était pas toujours respectée. C'est le cas dans l'étude qui a été menée par Schlinkert-Miller et Pepper (1988) pour la description de quelques symbiotes à croissance rapide de lupin.

Il est également recommandé que la caractérisation phénotypique soit effectuée sous des conditions standardisées afin que la comparaison avec les souches de référence ou même entre les souches de différents laboratoires soit applicable (Martinez-Romero *et al.*, 1991).

La présente analyse menée pour l'étude des souches de lupin s'est basée sur 105 caractères phénotypiques. Ceux-ci ont été testés selon des méthodes décrites comme références fiables pour la caractérisation des rhizobia. Les caractères les plus discriminants de cette analyse ont été groupés et représentés dans le tableau 15. Toutefois, les résultats de l'ensemble des caractères phénotypiques ont été traités par UPGMA. Le dendrogramme qui dérive de cette analyse est représenté par la figure 24. A 75% de niveau de similarité, les souches se trouvent réparties en quatre clusters bien délimités avec deux lignées indépendantes représentées par les deux souches MSMC 5419 et INRA L15. En fait, l'analyse par UPGMA nous a permis de mettre en évidence des groupes phénotypiques qui renferment une large diversité aussi bien entre les clusters déterminés qu'à l'intérieur de chaque cluster. En effet, les souches de chaque cluster présentent une grande variabilité au niveau de l'assimilation des carbohydrates ainsi qu'au niveau des profils de résistance aux différents antibiotiques et métaux lourds testés. Toutefois, l'ensemble des souches des quatre différents clusters présente une large gamme de tolérance au pH et à la température. En outre, les souches appartenant à une même plante hôte et au même site géographique peuvent être groupées dans différents clusters, c'est le cas des souches de l'amas nodulaire qui se trouvent réparties entre les clusters 1, 2 et 4.

Les deux souches MSMC 5419 et INRA L15 se caractérisent par leur capacité à assimiler les sucres complexes tels que le D- tagatose, l'inuline, l'amidon et l'esculine. En outre, la souche MSMC 5419 présente d'importants traits phénotypiques. Elle peut tolérer une concentration

Tableau 15. Résultats des tests phénotypiques différenciant entre les souches nodulant le lupin des différents clusters formés par l'analyse UPGMA

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	MSMC 5419	INRA L15
Nombre de souches	13	9	16	12	1	1
Plantes hôtes	Les 6 espèces	<i>L. luteus</i> <i>L. cosentinii</i>	Les 6 espèces	<i>L. luteus</i> <i>L.</i> <i>angustifolius</i>	<i>L.</i> <i>cosentinii</i>	<i>L.</i> <i>luteus</i>
Caractéristiques phénotypiques						
<u>Infectivité</u> (nombre de nodosités par plante)						
n < 30	8	6	0	3	0	0
30 < n < 50	4	1	12	7	0	0
n > 50	1	2	4	2	1	1
<u>Efficience relative</u>						
% < 60	6	4	1	3	0	0
60 < % < 70	4	1	11	6	0	0
% > 70	3	4	4	3	1	1
<u>Temps de génération</u>						
G < 2h	7	9	14	11	1	0
G > 2h	6	0	2	1	0	1
<u>Test du BTB</u>	6	7	12	3	1	1
<u>Assimilation des substrats carbonés</u>						
Glucose	12	8	9	9	0	1
Fructose	13	9	16	12	1	1
L - Arabinose	13	9	16	12	1	1
Glycérol	13	9	16	12	1	1
Mannitol	13	9	16	12	1	1
Saccharose	12	7	16	0	1	0
Raffinose	13	4	16	0	1	1
Amidon	0	1	1	0	1	1
Esculine	13	5	12	5	1	1
<u>Hydrolyse de l'urée</u>	13	3	6	10	1	0
<u>Réduction du nitrate</u>	6 - 6ND	3 - 3ND	8 - 7ND	10 - 1ND	1	ND

Résistance aux antibiotiques (µg/ml)

Tétracycline 50	3	0	12	4	0	1
Streptomycine 50	8	0	11	6	0	0
Spectinomycine 50	10	6	13	4	0	0
Chloramphénicol 100	8	1	14	11	1	0
Kanamycine 25	5	0	4	0	0	0
Acide nalidixique 50	12	2	14	11	0	0
Ampicilline 200	7	3	14	11	1	1
Erythromycine 200	12	7	15	7	1	1

Résistance aux métaux lourds (µg/ml)

Aluminium 400	13	9	14	3	1	1
Manganèse 400	12	9	14	10	1	0
Zinc 400	11	6	13	2	0	1
Cadmium 30	10	4	14	5	0	1
Mercure 40	6	9	9	8	1	0
Cobalt 100	9	7	5	1	0	0

Tolérance au NaCl (mM)

170	13	9	16	12	1	1
340	13	9	15	12	1	1
510	12	9	15	10	1	1
680	11	9	15	10	1	1
850	8	9	14	9	1	1
1020	8	9	10	6	0	1
1190	8	9	10	1	0	1
1360	8	9	8	0	0	1
1530	8	8	3	0	0	1
1700	0	0	0	0	0	1

Tolérance au pH

3	1	5	7	3	0	0
3,5	4	6	7	3	0	0
4	9	7	14	8	1	1
4,5	12	9	15	12	1	1
5,5 à 9,5	13	9	16	12	1	1

Tolérance à la température (°C)

4	12	9	15	12	1	1
10 à 42	13	9	16	12	1	1

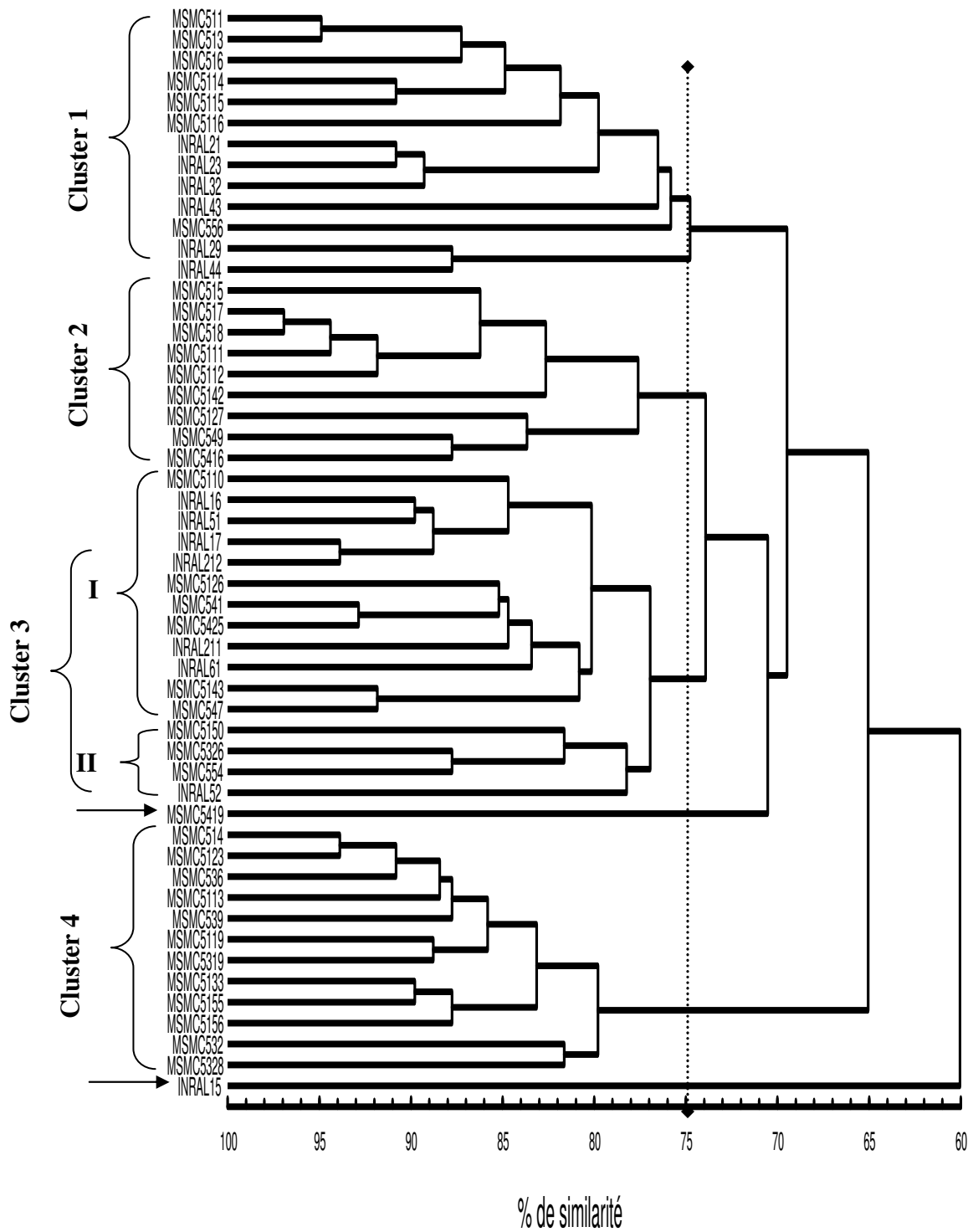


Figure 24. Phénogramme indiquant les similarités phénotypiques entre les souches nodulant le lupin issues de différentes régions du Maroc sur la base de l'analyse numérique.

de 850 mM NaCl et son efficacité relative de fixation d'azote est très élevée de l'ordre de 83%. Elle peut également réduire le nitrate et hydrolyser l'urée. La souche INRA L 15 présente également quelques traits distinctifs. Elle peut tolérer 1700 mM NaCl et montre un potentiel de fixation d'azote de l'ordre de 74%. Cependant, les tests biochimiques se sont révélés négatifs.

Le cluster 1 est formé par des souches qui appartiennent à différentes espèces de lupin (Tableau 15). Toutes les souches de l'espèce *L. luteus* sont issues de l'amas nodulaire. La majorité des souches de ce cluster peut tolérer une concentration en sel allant jusqu'à 1530 mM NaCl. Ce cluster renferme des souches majoritairement moins infectives. Concernant l'efficacité relative, les souches de *L. luteus* sont les moins efficaces et présentent un pourcentage qui varie entre 39% et 57% alors que l'efficacité relative des autres souches varie de 62% à 78%. La moitié des souches présente un temps de génération supérieur à 2h. Pour les tests biochimiques, toutes les souches présentent une activité positive de l'uréase. Tandis que pour la nitrate réductase, seules les souches de *L. luteus* montrent un résultat positif. Particulièrement, les souches de cette espèce se sont révélées toutes résistantes à la plus forte concentration du chlorure mercurique testée qui est de 40 µg/ml. Pour les autres minéraux, les souches se sont révélées généralement résistantes.

Le cluster 2 est formé par des souches qui appartiennent aux espèces *L. luteus* et *L. cosentinii*. Ces souches se distinguent spécialement par leur grande tolérance à de fortes concentrations en sel allant jusqu'à 1530 mM NaCl. Les souches sont majoritairement moins infectives. Celles de *L. luteus* présentent une efficacité relative qui varie entre 51% et 59% sauf pour la MSMC 518 qui représente la souche la plus efficace (ER = 87%) alors que les souches de *L. cosentinii* présentent une efficacité relative qui varie de 62% à 74%. Toutes les souches ont un temps de génération inférieur à 2h. Le tiers seulement de souches présente des réactions biochimiques positives. Une grande sensibilité aux antibiotiques a été notée. Les fortes concentrations testées en tétracycline, en spectinomycine et en kanamycine ont pu entraîner une inhibition totale des souches. A l'opposé, pour les métaux lourds, une résistance totale a été notée pour les fortes concentrations en aluminium, en manganèse et en mercure.

Le cluster 3 représente le cluster le plus hétérogène avec des souches appartenant au six différentes espèces de lupin. Ce cluster est subdivisé à 77% de niveau de similarité en deux subclusters I et II. Les souches du subcluster I sont capables de tolérer 1190 mM à 1700 mM NaCl. L'efficacité relative des souches varie de 66% à 77%. Cependant, les tests

biochimiques se sont révélés majoritairement négatifs. Les souches du subcluster II peuvent tolérer 680 mM à 850 mM NaCl, présentent des pourcentages d'efficacité relative de 55% à 70% et des réactions positives pour la réduction du nitrate et l'hydrolyse de l'urée. Particulièrement, ces souches sont toutes résistantes à la tétracycline testée à 50 µg/ml et à la spectinomycine à 100 µg/ml. Concernant les métaux lourds, la sensibilité a été notée essentiellement pour le cobalt.

Le cluster 4 est formé par des souches appartenant aux espèces *L. luteus* et *L. angustifolius*. Ces souches peuvent tolérer des concentrations en sel variant de 680 mM à 1020 mM NaCl (à l'exception des deux souches MSMC 532 et MSMC 5328), présentent des capacités infectives variables et possèdent des efficacités relatives majoritairement élevées. Les pourcentages enregistrés varient de 55% à 78%. Ces souches présentent généralement des réactions positives pour les tests biochimiques et un temps de génération inférieur à 2h. La résistance aux différents antibiotiques et aux minéraux testés montre des profils très variables avec toutefois une sensibilité générale pour la kanamycine. Les fortes concentrations en aluminium, en zinc et en cobalt se sont révélées très inhibiteurs pour les souches de ce cluster.

Dans cette analyse, nous avons remarqué que les similarités phénotypiques entre les souches de lupin et qui sont basées sur l'analyse numérique établie par UPGMA sont très concordantes avec les similarités basées sur les affinités de l'assimilation des 49 substrats carbonés testés. En fait, selon Vandamme *et al.* (1996), l'analyse numérique et l'analyse de l'assimilation des carbohydrates par le biais des galeries API présentent une résolution taxonomique similaire. En effet, la figure 23 (analyse numérique (clusters)) et la figure 18 (assimilation des substrats carbonés (groupes)) montrent des groupements quasi-identiques. Le cluster 1 renferme toutes les souches du groupe 1 plus la souches INRA L43 qui formait un lignage indépendant, les clusters 2 et 3 renferment toutes les souches du groupe 2, le cluster 4 est identique au groupe 3 et les deux souches MSMC 5419 et INRA L15 qui sont indépendamment classées dans la première analyse forment également des lignages bien délimités dans la seconde.

La biodiversité des souches de lupin déterminée par l'analyse numérique confirme également la grande diversité déterminée par l'analyse PCR/REP. En effet, les souches issues de différents sites et de différentes plantes hôtes peuvent être groupées dans un même cluster, le cluster 3 en est l'exemple.

Cette diversité phénotypique nous permet toutefois de sélectionner avec précision les bons candidats pour tout essai d'inoculation de lupin selon les exigences recommandées et selon les différentes conditions pédo – climatiques envisagées (stress salin, températures extrêmes, excès de nitrate, etc.). Ainsi,

- En faveur de l'augmentation du rendement de lupin cultivé sur des sols sans problèmes majeurs, on propose les souches MSMC 5126, MSMC 5425 et MSMC 518. Ces trois souches sont très tolérantes à la salinité, au pH, à la température et possèdent une nitrate réductase active. Elles sont également très résistantes vis-à-vis des métaux lourds et des antibiotiques et surtout très efficaces avec des efficacités relatives qui varient de 74% à 87%.
- Pour les sols contaminés par les métaux lourds, on propose les souches MSMC 541, MSMC 547 et MSMC 5126, qui sont non seulement très résistantes aux métaux lourds mais aussi à différents antibiotiques. En outre, elles présentent des pourcentages d'efficacité relative allant de 73% à 76%.
- Pour les sols à problèmes de salinité et d'alcalinité, on recommande les souches INRA L 61 et MSMC 554 en raison de la grande plasticité de tolérance et de résistance qu'elles présentent pour l'ensemble des tests phénotypiques.

1 – INTRODUCTION

Différentes approches phylogénétiques permettant de classer les bactéries fixatrices d'azote ont succédé aux moyens d'étude traditionnels. Récemment, la PCR est intensément utilisée pour l'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S (Woese, 1987, Graham *et al.*, 1991).

L'ADNr 16S possède une taille de 1452 bases nucléotidiques (sauf pour la souche *Rhizobium tropici* type II CFN 299 dont le gène est caractérisé par une insertion d'un fragment d'ADN de 72 paires de bases (Willems et Collins, 1993). Cette courte taille permet une amplification rapide du gène par PCR à l'aide d'amorces spécifiques.

L'analyse par PCR/RFLP de l'ADNr 16S chez les rhizobia a été initialement décrite par Vanechoutte *et al.* (1992). Cette technique connue également par le terme ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) présente une grande importance comme approche phylogénétique puisqu'elle permet de regrouper les souches bactériennes à un niveau de résolution taxonomique qui s'étend de l'espèce au genre (Heyndrickx *et al.*, 1996). L'action des enzymes de restriction sur le gène de l'ADNr 16S amplifié engendre la genèse de fragments de différentes tailles. Le polymorphisme de restriction peut être ensuite révélé par électrophorèse sur un gel d'agarose.

Plusieurs études ont été menées pour l'analyse de ce gène chez de nombreuses souches et espèces bactériennes fixatrices d'azote afin d'établir la relation phylogénétique qui existe entre ces bactéries et les différents genres de rhizobium connus (van Berkum et Fuhrman, 2000 ; Sawada *et al.*, 1993 ; Willems et Collins, 1993 ; Yanagi et Yamasato, 1993).

Dans ce chapitre, nous nous sommes fixé pour objectif l'étude de la diversité génétique qui existe entre les 52 souches représentatives des grands groupes délimités par l'analyse PCR/REP de toutes les souches de la collection nodulant les différentes espèces de lupin dans différentes régions du Maroc, la détermination du positionnement taxonomique de ces souches et l'évaluation du niveau de rapprochement ou de divergence entre ces souches et les souches de référence appartenant aux différents genres des rhizobia.

Tableau 16 : Liste des souches de référence utilisées

Espèce	Souche
<i>Bradyrhizobium sp. (Arachis)</i>	ISRA 616
<i>Bradyrhizobium sp. (Arachis)</i>	ISRA 601
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	USDA 110
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	ORS 2800
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	BTA-1
<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	ORS 1032
<i>Mesorhizobium loti</i>	NZP 2213
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	ORS1752
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	ORS 2640
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	ORS 2739
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	ORS 2738
<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i>	ORS 663
<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>	ORS 639
<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>trifolii</i>	ORS 662
<i>Rhizobium giardinii</i>	STM 854
<i>Rhizobium gallicum</i>	STM 853
<i>Rhizobium etli</i>	ORS 645
<i>Rhizobium galegae</i>	STM 1834
<i>Rhizobium mongolensis</i>	STM 246
<i>Rhizobium huautlense</i>	STM 247
<i>Sinorhizobium fredii</i>	USDA 205
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	ORS 665
<i>Sinorhizobium arboris</i>	ORS 1755
<i>Sinorhizobium saheli</i>	ORS 100
<i>Sinorhizobium terangaie</i>	ORS 1007
<i>Sinorhizobium medicae</i>	ORS 504
<i>Sinorhizobium kostiense</i>	ORS 97
<i>Agrobacterium tumefaciense</i>	ORS 1351
<i>Agrobacterium rhizogene</i>	ORS 1352
<i>Agrobacterium rubi</i>	ORS 1353
<i>Agrobacterium vitis</i>	ORS 2643
<i>Allorhizobium undicola</i>	ORS 992

2 – MATERIEL ET METHODES

2.1 - Souches bactériennes et milieu de culture

Les souches utilisées dans cette étude représentent les 52 souches sélectionnées à partir de l'analyse par PCR/REP et qui ont été caractérisées phénotypiquement dans le chapitre précédant ainsi que 32 souches types représentant les genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium* et *Agrobacterium* (tableau 16).

L'ensemble des souches obtenues en culture pure sur le milieu YEM a été repiqué sur le milieu ½TY solide pendant 48 h.

Les différentes souches de référence ainsi que certaines souches nodulant le lupin productrices de quantités importantes d'exopolysaccharides ont été ensuite mises en culture dans le milieu ½TY liquide pendant 2 jours.

2.2 - Méthodes d'extraction de l'ADN

L'ADN de la majorité des 52 souches de lupin cultivées sur le milieu ½TY solide a été obtenue par la méthode de la lyse alcaline comme a été décrit dans le chapitre II.

L'ADN des souches de référence et des autres souches nodulant le lupin cultivées dans le milieu ½TY liquide a été obtenu par la méthode d'extraction au phénol chloroforme.

La méthode adoptée est celle décrite par Wilson (1989) avec quelques modifications. Ainsi, pour la lyse bactérienne : 1,5 ml de la culture de chaque souche a été transféré dans un ependorf et soumis à une centrifugation pendant 7 min. à 13000g. Le culot obtenu a été additionné de 435 µl de tampon TE (10 mM Tris-HCl – 1 mM EDTA, pH 8), 50 µl de SDS à 10% et 15 µl d'une solution de NaCl 5M. Le mélange a été incubé à une température de 70°C pendant 30 min. puis placé à 4°C pendant 2 min.

Afin d'éliminer les protéines, 2 µl de la Protéinase K (10 mg/ml) ont été additionnés au mélange qui a été ensuite placé au bain- marie à 37°C durant 30 min.

Du phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 :24 :1) a été ajouté à volume égal (500 µl) au mélange. Le phénol a été additionné dans cette étape dans le but de dénaturer les protéines restant dans le milieu réactionnel. L'utilisation du chloroforme avec ce dernier lui permet une bonne dénaturation des protéines. Pour une bonne séparation des deux phases aqueuse et

organique, la présence de l'alcool isoamylique s'avère indispensable. Après agitation, le tout a été centrifugé pendant 15 min. à 13000g. La phase aqueuse (surnageant) a été récupérée dans un nouveau ependorf stérile puis un volume égal de chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) a été ajouté dans le tube. Après une autre centrifugation pendant 15 min. à 13000g, la phase aqueuse a été encore récupérée dans un nouveau ependorf stérile.

La précipitation des acides nucléiques a été effectuée par l'ajout du 1/10 V d'acétate de sodium 3 M, pH 4,8 (environ 50 µl) ainsi que 2 V d'éthanol absolu à -20°C. Les ependorfs ont été placés à -80°C pendant une heure puis on été mis en centrifugation pendant 20 min. à 13000g. Le surnageant a été écarté et le culot obtenu a été lavé avec de l'éthanol froid à 70%, centrifugé pendant 7 min. à 13000g puis séché sous vide pendant 30 min. Le culot séché a été suspendu dans 50 µl TE (10 :1, pH 7,8).

Pour éliminer toute contamination par les acides ribonucléiques, 1 µl d'ARNase a été additionné au mélange qui a été ensuite incubé dans un thermoblock à 37°C pendant une heure. Après cette étape, les différents ependorfs ont été placés à 4°C jusqu'au lendemain pour permettre la dissolution totale de l'ADN.

La quantité d'ADN a été déterminée par dosage spectrophotométrique à 260 nm. La pureté de l'ADN a été évaluée par le rapport DO 260/280 (pour une bonne qualité d'ADN, le rapport doit être compris entre 1,8 et 2). Sachant que : 1 unité DO correspond à 50 µg/ml d'ADN, la concentration de l'ADN en suspension a été déterminée selon la formule suivante :

$$\text{La quantité de l'ADN } (\mu\text{g/ml}) = \text{DO}_{260} \times \text{Inverse du facteur de dilution} \times 50$$

L'ADN de chaque souche a été ensuite dilué dans du TE à une concentration finale de 50 ng/µl pour l'utilisation dans les réactions d'amplification.

La qualité des ADN obtenus par les deux méthodes d'extraction utilisées a été révélée par électrophorèse horizontale. Ainsi, 8 µl de chaque échantillon d'ADN déposé sur un gel d'agarose à 0,8% préparé dans le tampon TBE a été soumis à une migration sous une impulsion électrique de 80V.

2. 3 - Amplification par PCR de l'ADNr 16S

La présente PCR consiste à multiplier la séquence du gène de l'ADNr 16S à l'aide d'amorces spécifiques encadrant la séquence de ce gène (tableau 16).

Tableau 17. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNr 16S

Amorce	Séquence 5' → 3'	Référence
41f	5'-GCTCAAGATTGAACGCTGGCG-3'	Herrera-Cervera <i>et al</i> (1999)
1488r	5'-CGGTTACCTTGTTCTGACTTCACC-3'	

Une quantité de 4 µl de l'ADN chromosomique des différentes souches a été ajoutée à un mélange réactionnel de 66 µl par microtube contenant le tampon de réaction à une concentration finale 1X, 200 µM de chaque dNTP, 1,4 mM de MgCl₂, les deux amorces 41f et 1488r à une concentration de 20 pmole/µl et 4 unités de *Taq* Polymérase (Promega).

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un thermocycleur de type Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems). Les mélanges ont subi un préchauffage de 2 min. à 94°C, puis 10 cycles réalisés comme suit : une étape de dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 40 secondes, une étape d'hybridation des deux amorces à 60°C pendant 60 secondes et une étape d'extension à 72°C pendant 120 secondes. Puis encore 25 cycles avec les mêmes conditions de dénaturation et d'extension que précédemment mais l'étape de l'hybridation a été effectuée à 50°C pendant 60 secondes. Les deux séries de cycles sont suivies d'une étape d'élongation finale des amorces à 72°C pendant 3 min. puis les microtubes ont été placés à 4°C jusqu'à utilisation.

Des échantillons de 10 µl des différents amplifiats d'ADNr 16S générés par PCR ont été révélés dans un gel d'agarose de 1,5% à 80V pendant 90 min.

2. 4 - Digestion des produits de l'amplification par les enzymes de restriction

Un échantillon de 10 µl des différents produits d'amplification de l'ADNr 16S a été utilisé pour la PCR/RFLP. Les amplifiats de 9 souches prises au hasard à partir des souches sélectionnées représentant les 9 clusters délimités par l'analyse PCR/REP ont été digérés avec huit différents enzymes de restriction : *Msp I* et *Hinf I* (Promega Co, USA) ainsi que *Hha I* (ou *Cfo I*), *Taq I*, *Sau 3AI*, *Alu I*, *Rsa I* et *Dde I* (Biolabs, NE, USA) pour la sélection des enzymes les plus discriminantes. La digestion a été réalisée dans un volume final de 30 µl. Ces enzymes ont été utilisées à une concentration de 5 à 8 U/réaction dans un volume final de 30 µl contenant le tampon de réaction 10X au 1/10^{ème} du volume final et conformément aux recommandations du fournisseur du BSA à 10 µg/µl au 1/100^{ème} du volume final.

Les résultats nous ont permis de retenir quatre enzymes, les plus discriminantes : *Msp I*, *Hinf I*, *Hha I* et *Taq I*.

Pour activer l'action des quatre enzymes, les mélanges ont été incubés dans un thermoblock (Bioblock Scientific) pendant une heure à 65°C pour la *TaqI* et à 37°C pour les trois autres enzymes.

15 µl des produits de la digestion de toutes les souches étudiées par chaque enzyme ont été ensuite révélés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,8% à 70V pendant 4 heures.

Pour chaque gel, 5 µl du marqueur de poids moléculaire connu, le 100pb (Promega) ont été mis en migration parallèlement avec les échantillons à analyser.

Le dépôt des échantillons dans les puits a été facilité par l'addition de 3 µl du tampon de charge. Ce tampon permet de suivre aisément la migration des échantillons dans le gel.

Après migration, les gels ont été mis dans un bain de coloration au Bromure d'Ethidium à 1 mg/ml pendant 20 min. Ensuite, les gels ont été placés sur un trans-illuminateur à UV puis scannés (Perfect Image V.6).

2. 5 – Analyse des données

Les distances de migration des différents fragments de restriction générés par chaque enzyme ont été mesurées indépendamment pour chaque gel. Les poids moléculaires de ces fragments ont été calculés à l'aide de la fonction de la régression linéaire de la courbe logarithmique obtenue par la distance des différentes bandes du marqueur moléculaire utilisé (le 100pb) en fonction de leurs poids moléculaires.

Les similarités entre les différentes souches analysées ont été évaluées par la comparaison des profils de restriction prises deux à deux. Une matrice bidimensionnelle a été construite sur la base de ces profils comme a été décrit dans le chapitre II. Les distances génétiques calculées en utilisant la moyenne algorithmique UPGMA ont permis la construction d'un dendrogramme qui permet de mettre en évidence les relations génétiques existant entre les différentes souches analysées.

3 – RESULTATS

L'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction du gène de l'ADNr 16S amplifié par PCR est l'une des méthodes les plus utilisées pour l'identification des rhizobia (Young *et al.*, 2001). Elle est rapide, ne nécessite pas de grandes quantités de matière première et surtout reproductible (Clark, 1997). Sa résolution taxonomique qui permet la distinction entre les différentes espèces et genres de rhizobia nous a incité à l'utiliser comme un premier moyen pour l'étude de la phylogénie des 52 souches de lupin préalablement identifiées et caractérisées génétiquement par PCR/REP.

3.1 - Amplification par PCR de l'ADNr 16S

Le gène ribosomique de l'ADNr 16S des 52 souches de lupin ainsi que celui des 32 souches de référence a été amplifié. L'amplification a donné lieu à une bande unique révélée par électrophorèse chez l'ensemble des souches. La taille de la bande a été évaluée visuellement par comparaison au marqueur utilisé, le 100 pb. Elle correspond au poids moléculaire de 1500pb (figure 25). Ce résultat est parfaitement conforme aux travaux de Willems et Collins (1993) et celui de Laguerre *et al.* (1994).

3.2 - Analyse par PCR/RFLP de l'ADNr 16S

Le gène de l'ADNr 16S amplifié par PCR des 9 souches représentatives des différents groupes REP a été sujet à une digestion par huit enzymes de restriction. Les profils électrophorétiques des fragments obtenus ont permis la sélection des enzymes les plus discriminantes : *Msp I*, *Hinf I*, *Hha I* et *Taq I*. Les sites de clivage de la séquence nucléotidique spécifique reconnue par chacune de ces quatre enzymes figurent dans le tableau suivant

Tableau 18. Tableau indiquant le site de clivage de la séquence nucléotidique spécifique reconnue par les quatre enzymes de restriction utilisées

<i>Msp I</i>	C↓CGG	<i>Taq I</i>	T↓CGA
<i>Hha I</i>	GCG↓G	<i>Hinf I</i>	G↓ANTC

Les profils de restriction obtenus pour les 32 souches de référence utilisées dans cette analyse (figure 26) ont été validés par la comparaison aux profils de restriction établis par Neyra *et al.* (1998).

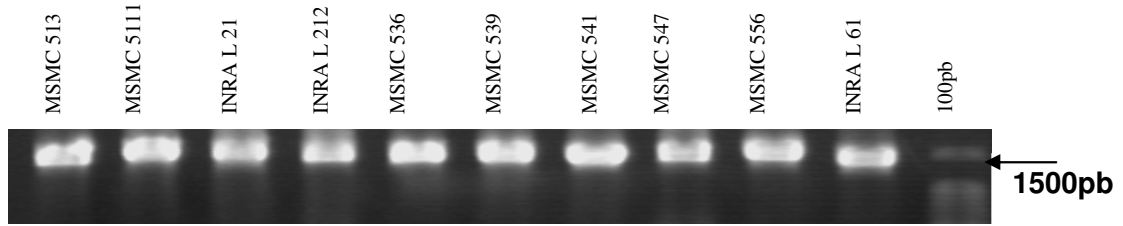


Figure 25: Profil de la bande de l'ADNr 16S de quelques souches nodulant le lupin
100pb: marqueur de poids moléculaire utilisé.

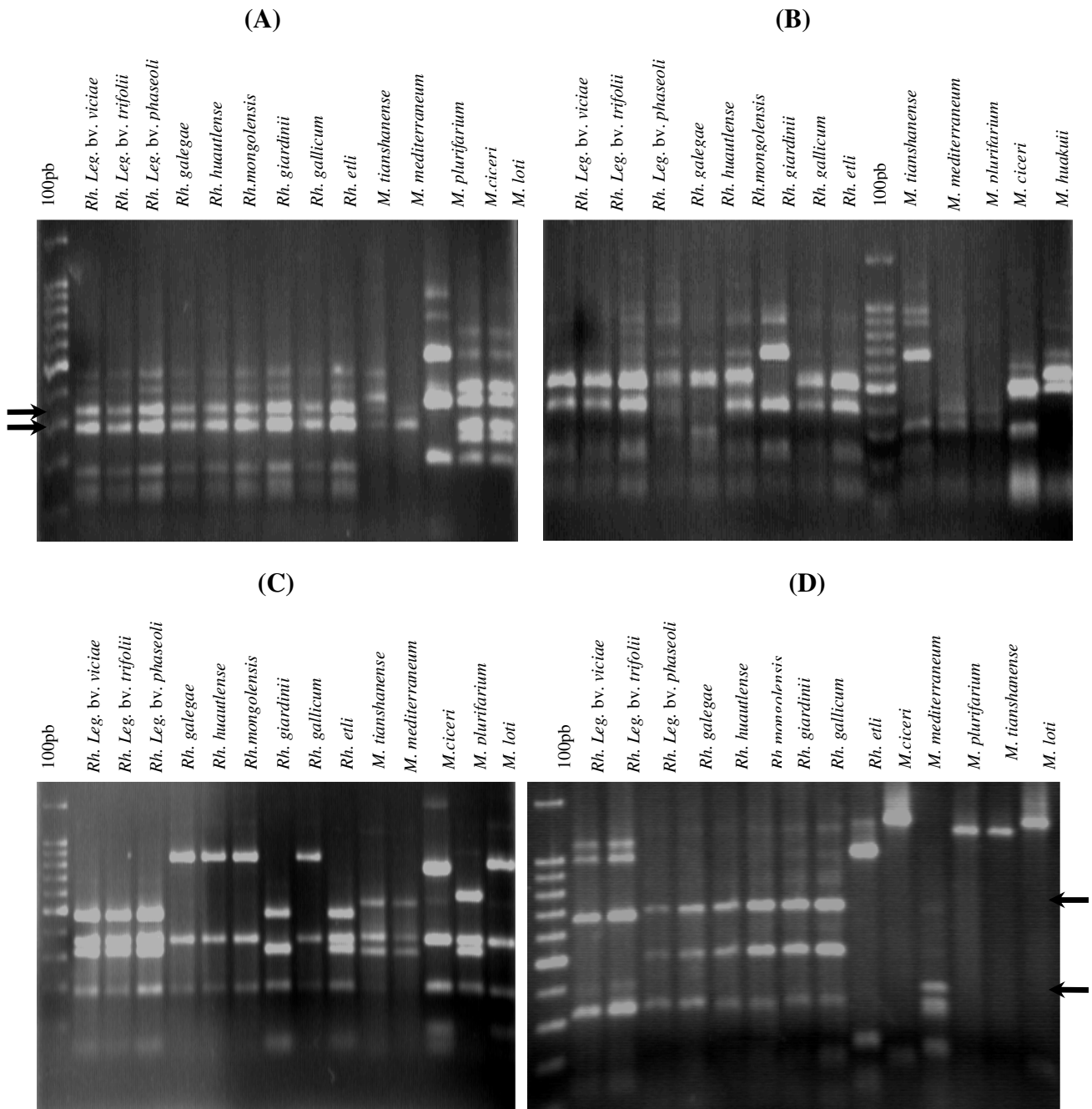


Figure 26. Profils électrophorétiques de la restriction par RFLP de l'ADNr 16S obtenus pour quelques souches de référence après la digestion par les endonucléases *HhaI* (A), *MspI* (B), *TaqI* (C) et *HinfI* (D)

Les profils obtenus pour les souches de lupin montrent des bandes de tailles variables. Une à onze bandes ont été obtenues selon la souche et selon l'enzyme utilisé (figures 27 et 28).

Concernant les souches de l'amas nodulaire, l'endonucléase *Msp* I représente l'enzyme la plus discriminante indiquant la grande diversité qui existe entre ces souches (figure 27 B). La diversité est également bien illustrée par les profils de la *Hha* I (figure 27 A). Les profils obtenus par ces deux enzymes ainsi que ceux obtenus par la *Taq* I (figure 27 C) montrent une nette distinction des souches de l'amas nodulaire par rapport non seulement aux souches de référence mais également aux différentes souches nodulant le lupin analysées (figure 28).

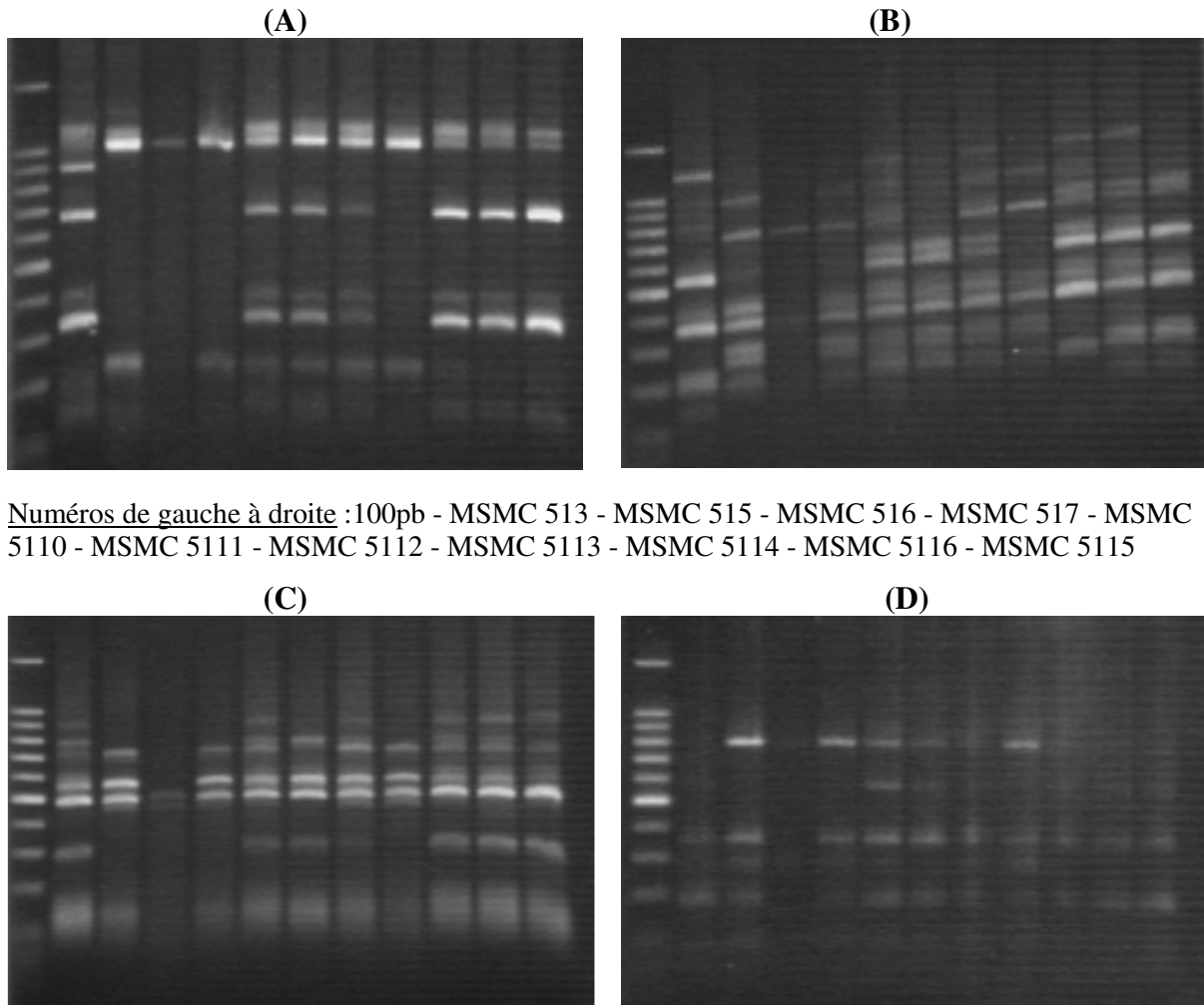
Concernant les autres souches de la collection nodulant le lupin, on constate que l'endonucléase *Hha* I est l'enzyme qui révèle le plus de polymorphisme. Sur la base des différents profils électrophorétiques obtenus, la majorité des souches présente des bandes intenses de 380 pb et 550 pb (figure 28 A). Alors que les souches de références présentent des bandes intenses de tailles différentes : 300 pb et 350 pb dans le cas de *Rhizobium* et 350 pb dans le cas de *Mesorhizobium* (figure 26 A).

Les profils de restriction générés par l'endonucléase *Taq* I ont permis également de mettre en évidence un polymorphisme assez important chez les souches nodulant le lupin (figure 28 C).

Contrairement aux souches de l'amas nodulaire (figure 27), les profils électrophorétiques obtenus par l'endonucléase *Msp* I semblent être peu diversifiés (figure 28 B). Toutefois, ces profils sont plus proches de ceux des souches de référence (figure 26 B).

Les profils obtenus par la *Hinf* I présentent également un monomorphisme apparent. La majorité de ces profils présentent des bandes communes dont les tailles sont de 320 pb et 690 pb (figure 28 D). Ces deux bandes figurent également dans les profils des souches de *Rhizobium* (figure 26 D).

L'analyse électrophorétique de la PCR/RFLP de l'ADNr 16S nous a permis de révéler la grande diversité qui existe entre les souches nodulant le lupin. Cette diversité est très importante chez les souches de l'amas nodulaire.



Numéros de gauche à droite : 100pb - MSMC 513 - MSMC 515 - MSMC 516 - MSMC 517 - MSMC 5110 - MSMC 5111 - MSMC 5112 - MSMC 5113 - MSMC 5114 - MSMC 5116 - MSMC 5115

Numéros de gauche à droite : 100pb - MSMC 513 - MSMC 515 - MSMC 516 - MSMC 517 - MSMC 5110 - MSMC 5112 - MSMC 5111 - MSMC 5113 - MSMC 5114 - MSMC 5115 - MSMC 5116

Figure 27 : Profils électrophorétiques de la restriction par RFLP de l'ADNr 16S obtenus pour quelques souches de l'amas nodulaire après la digestion par les endonucléases *HhaI* (A), *MspI* (B), *TaqI* (C) et *HinfI* (D)

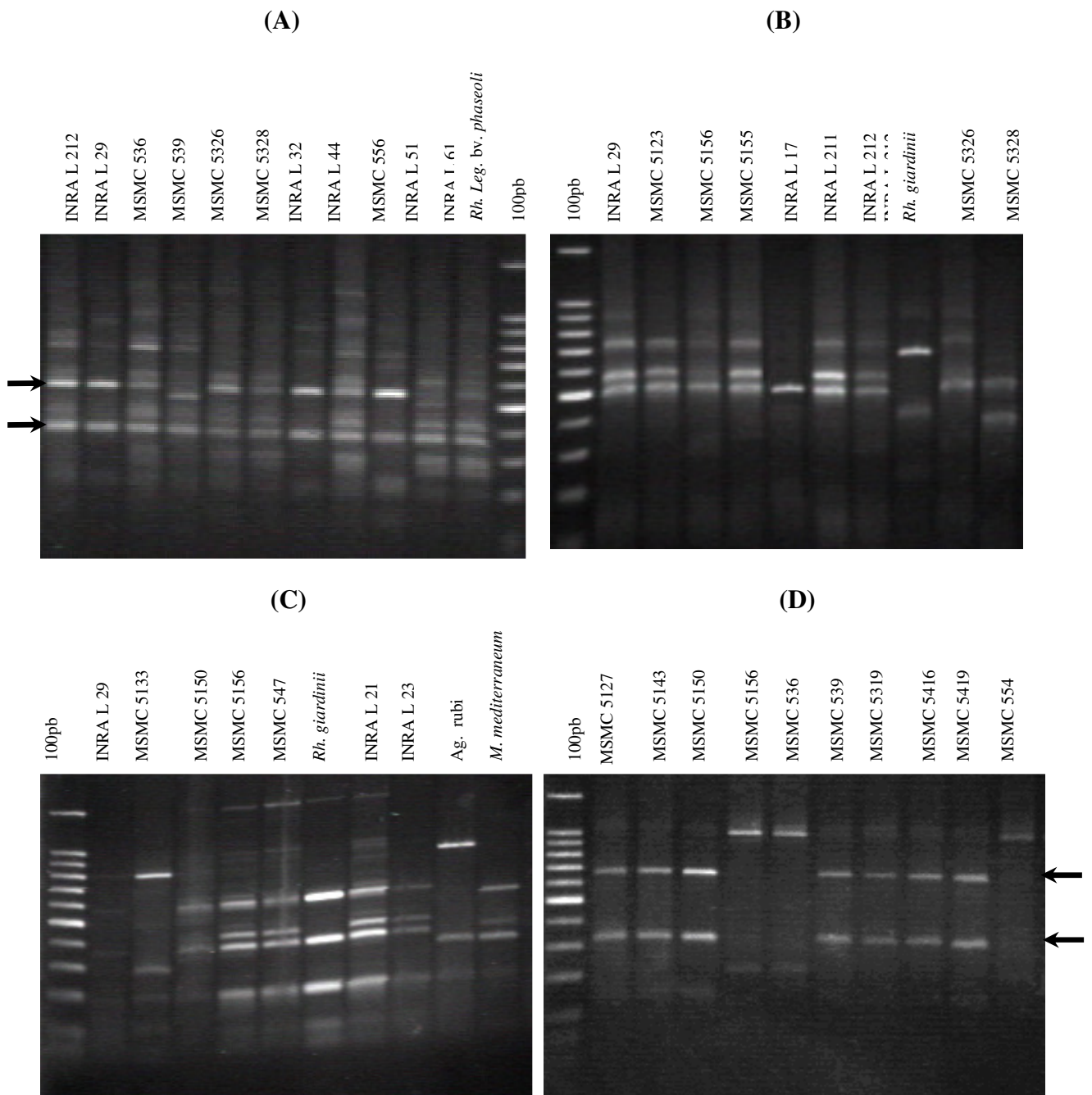


Figure 28 : Profils électrophorétiques de la restriction par RFLP de l'ADNr 16S obtenus pour des souches nodulant le lupin après la digestion par les endonucléases *HhaI* (A), *MspI* (B), *TaqI* (C) et *HinfI* (D)

3. 3 - Ribotypes déterminés par PCR/RFLP de l'ADNr 16S

L'analyse par PCR/RFLP de l'ADNr 16S avec les enzymes *Msp I*, *Hinf I*, *Hha I* et *Taq I* nous a permis de distinguer entre plusieurs profils de restriction. Les profils obtenus par chaque enzyme et pour chaque souche ont été désignés par des lettres alphabétiques. Les mêmes profils ont été comparés par paire afin d'établir le ribotype correspondant à chaque souche.

Dans le cas des 32 souches de référence, 28 combinaisons de profils de restriction ont été obtenues. Chaque combinaison correspond à un génotype bien déterminé (tableau 19). Des combinaisons identiques ont été retrouvées chez *Rhizobium Leguminosarum* bv. *viciae* et *Rhizobium Leguminosarum* bv. *Trifolii*, chez *Rhizobium gallicum* et *Rhizobium mongolensis*, chez *Mesorhizobium ciceri* et *Mesorhizobium loti* et chez deux souches de *Bradyrhizobium nodulans* l'arachide ISRA 601 et ISRA 616.

Laguerre *et al.* (1994) ont montré que les différents biovars des souches de *Rhizobium leguminosarum* possèdent le même ribotype. Maâtallah (2003) a montré que *Mesorhizobium ciceri* et *Mesorhizobium loti* possèdent des ribotypes différents. En fait, le nombre de ribotypes peut varier chez les souches appartenant à la même espèce et chaque ribotype caractérise une souche type bien déterminée.

Concernant les souches nodulant le lupin, 50 combinaisons différentes ont été distinguées (tableau 20). Ainsi, sur les 52 souches étudiées, seules les deux paires de souches MSMC 5110 avec MSMC 5112 et MSMC 5114 avec MSMC 5116 présentent deux ribotypes identiques. Ces quatre souches appartiennent toutes au groupe de l'amas nodulaire.

Chacune des combinaisons obtenues a été comparée à celles des souches de référence. Toutes se sont révélées très distinctes, à l'exception de la souche INRA L 61 qui est caractérisée par le même ribotype que celui de la souche *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.

Le nombre important de combinaisons obtenues indique l'existence d'un taux élevé de variabilité génétique entre les souches étudiées. En effet, tous les ribotypes obtenus, à l'exception de ceux de l'amas nodulaire, varient d'une souche à l'autre et ce pour l'ensemble des souches nodulant chacune des six espèces de lupin (tableau 21).

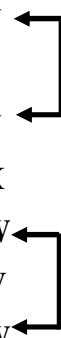
Tableau 19. Groupes de ribotypes des souches de référence utilisées déterminés par PCR/RFLP du gène de l'ARNr 16S.

Souches	Profils de restriction du gène de l'ADNr 16S par les quatre enzymes de restriction utilisées				Ribotype
	HinfI	HhaI	TaqI	MspI	
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	A	A	B	B	AABB
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	A	A	B	B	AABB
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	B	A	B	B	BABB
<i>Rhizobium gallicum</i>	B	A	A	C	BAAC
<i>Rhizobium huautlense</i>	B	A	A	G	BAAG
<i>Rhizobium mongolensis</i>	B	A	A	C	BAAC
<i>Rhizobium giardinii</i>	B	A	H	A	BAHA
<i>Rhizobium gallicum</i>	B	A	A	H	BAAH
<i>Rhizobium etli</i>	F	A	B	I	FABI
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	D	D	D	J	DDDJ
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	G	D	D	D	GDDD
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	C	E	E	D	CEED
<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	C	E	E	K	CEFK
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	C	F	F	E	CFFE
<i>Mesorhizobium loti</i>	C	F	F	E	CFFE
<i>Sinorhizobium arboris</i>	C	G	C	L	CGCL
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	D	G	C	M	DGCM
<i>Sinorhizobium medicae</i>	C	C	I	N	CCIN
<i>Sinorhizobium terangaie</i>	C	C	C	F	CCCF
<i>Sinorhizobium saheli</i>	C	C	J	F	CCJF
<i>Sinorhizobium kostiense</i>	D	C	K	F	DCKF
<i>Sinorhizobium fredii</i>	D	C	A	O	DCAO
<i>Agrobacterium tumefaciense</i>	B	A	A	A	BAAA
<i>Agrobacterium rhizogene</i>	B	A	B	P	BABP
<i>Agrobacterium rubi</i>	H	A	A	A	HAAA
<i>Agrobacterium vitis</i>	I	A	A	A	IAAA
<i>Allorhizobium undicola</i>	F	H	L	Q	FHLQ
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	E	B	M	R	EBMR
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	E	B	G	S	EBGS
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	E	B	N	A	EBNA
<i>Br.sp. (Arachis) ISRA 601</i>	E	B	G	A	EBGA
<i>Br.sp. (Arachis) ISRA 616</i>	E	B	G	A	EBGA

Tableau 20. Groupes de ribotypes des souches nodulant le lupin déterminés par PCR/RFLP du gène de l'ARNr 16S.

Plante hôte	Souches	Profils de restriction du gène de l'ADNr 16S par les quatre enzymes de restriction utilisées				Ribotype
		HinfI	HhaI	TaqI	MspI	
<i>L. luteus</i>	MSMC 511	N	J	F	E	NJFE
	MSMC 513	H	K	O	X	HKOX
	MSMC 514	A	N	M	Z	ANMZ
	MSMC 515	K	L	M	X	KLMX
	MSMC 516	O	Q	P	A	OQPA
	MSMC 517	K	L	N	X	KLNX
	MSMC 518	P	O	N	E	PONE
	MSMC 5110	L	K	I	U	LKIU
	MSMC 5111	L	O	I	U	LOIU
	MSMC 5112	L	K	I	U	LKIU
	MSMC 5113	K	L	Q	X	KLQX
	MSMC 5114	M	O	I	W	MOIW
	MSMC 5115	M	K	I	W	MKIW
	MSMC 5116	M	O	I	W	MOIW
	MSMC 5119	B	R	R	T	BRRT
	MSMC 5123	F	T	L	B	FTLB
	MSMC 5126	H	B	J	E	HBJE
	MSMC 5127	A	M	S	S	AMSS
	MSMC 5133	A	J	L	X	AJLX
	MSMC 5142	A	J	A	B	AJAB
	MSMC 5143	A	Z	J	X	AZJX
	MSMC 5150	A	Z	K	X	AZKX
	MSMC 5155	A	N	L	X	ANLX
	MSMC 5156	F	U	A	X	FUAX
	INRA L15	H	B	J	E	HBJE
	INRA L16	H	S	H	E	HSHE
	INRA L17	H	J	H	T	HJHT

Souches de l'amas nodulaire



Plante hôte	Souches	Profils de restriction du gène de l'ADNr 16S par les quatre enzymes de restriction utilisées				Ribotype
		<u>HinfI</u>	<u>HhaI</u>	<u>TaqI</u>	<u>MspI</u>	
<i>L. albus</i>	INRA L211	A	J	L	X	AJLX
	INRA L212	A	N	W	X	ANWX
	INRA L21	H	B	J	T	HBJT
	INRA L23	H	B	J	X	HBJX
	INRA L29	C	V	B	U	CVBU
<i>L. angustifolius</i>	MSMC 532	B	W	A	V	BWAV
	MSMC 536	F	J	A	V	FJAV
	MSMC 539	A	M	A	Y	AMAY
	MSMC 5319	A	M	A	T	AMAT
	MSMC 5326	A	J	L	Z	AJLZ
	MSMC 5328	H	S	F	E	HSFE
	INRA L32	A	J	L	X	AJLX
<i>L. cosentini</i>	MSMC 541	H	X	K	T	HXKT
	MSMC 547	B	R	T	V	BRTV
	MSMC 549	A	F	F	X	AFFX
	MSMC 5416	A	P	A	X	APAX
	MSMC 5419	A	P	A	T	APAT
	MSMC 5425	A	J	H	T	AJHT
	INRA L43	J	N	B	B	JNBB
	INRA L44	A	J	H	X	AJHX
<i>L. pilosus</i>	MSMC 554	J	N	H	T	JNHT
	MSMC 556	A	N	U	X	ANUX
	INRA L51	H	J	H	X	HJHX
	INRA L52	F	Y	V	T	FYVT
<i>L. atlanticus</i>	INRA L61	A	A	B	B	AABB ←

3. 4 - Etude des groupements phylogénétiques établis par l'analyse UPGMA

La combinaison des différents profils de restriction en une même matrice a été utilisée pour la construction d'un dendrogramme par analyse algorithmique UPGMA.

Les groupements phylogénétiques des souches de référence établis par notre étude sur la base des 4 endonucléases ; *Msp I*, *Hinf I*, *Hha I* et *Taq I* sont représentées par la figure 29.

A 75%, on obtient quatre clusters et un linéage indépendant formé par la souche *Allorhizobium undicola*. Le premier cluster (**A**) regroupe les souches des deux genres *Rhizobium* et *Agrobacterium*; le deuxième cluster (**B**) regroupe les souches de *Mesorhizobium*; le troisième cluster (**C**) regroupe les souches de *Sinorhizobium* et le quatrième cluster (**D**) est représenté par les souches de *Bradyrhizobium*.

Les groupements des souches de référence obtenus dans notre étude sont en parfait accord avec ceux obtenus par Laguerre *et al.* (1994) en utilisant l'ARDRA sur la base de 9 enzymes de restriction. En fait, ces mêmes auteurs ont rapporté qu'un minimum de 4 enzymes peut être utilisable pour une bonne discrimination entre les souches de rhizobia. En effet, les 4 enzymes utilisés, *Msp I*, *Hinf I*, *Hha I* et *Taq I*, donnent des profils à haut niveau de différenciation entre les souches les plus éloignées et figurent parmi celles les plus couramment utilisées dans l'étude de taxonomie des rhizobia (Laguerre *et al.*, 1994 ; Neyra *et al.*, 1998).

La classification des souches de référence étudiées reflète la classification établie sur la base de l'ARDRA par plusieurs autres études (Laguerre *et al.*, 1994 ; 1997 ; Khbaya *et al.*, 1998). En effet, par notre étude, nous avons également pu noter que les deux souches *S. meliloti* et *S. fredii* sont groupées ensemble. Le cluster 1 indique que les souches de *Rhizobium* et celles d'*Agrobacterium* sont entre-mélangées. En outre, *A. rhizogenes* est classé avec les différentes souches de *Rhizobium leguminosarum* et *A. tumefaciens* est proche de *R. galegae*. Cependant, selon Laguerre *et al.* (1997), les deux souches *S. terangaie* et *S. sahelii* présentent 100% de similitude. Dans notre cas, ces souches montrent un niveau de divergence de 0,5% seulement.

Le groupement général de l'ensemble des souches de référence reflète également la classification établie sur la base de la séquence complète de l'ADNr 16S (Terefework *et al.*, 2001 ; Sawada *et al.*, 2003 ; van Berkum et Fuhrmann, 2000). Dans notre cas, nous avons également pu mettre en évidence le regroupement de *S. kostiense* avec *S. terangaie* et de *M. huakuii* avec *M. plurifarum*.

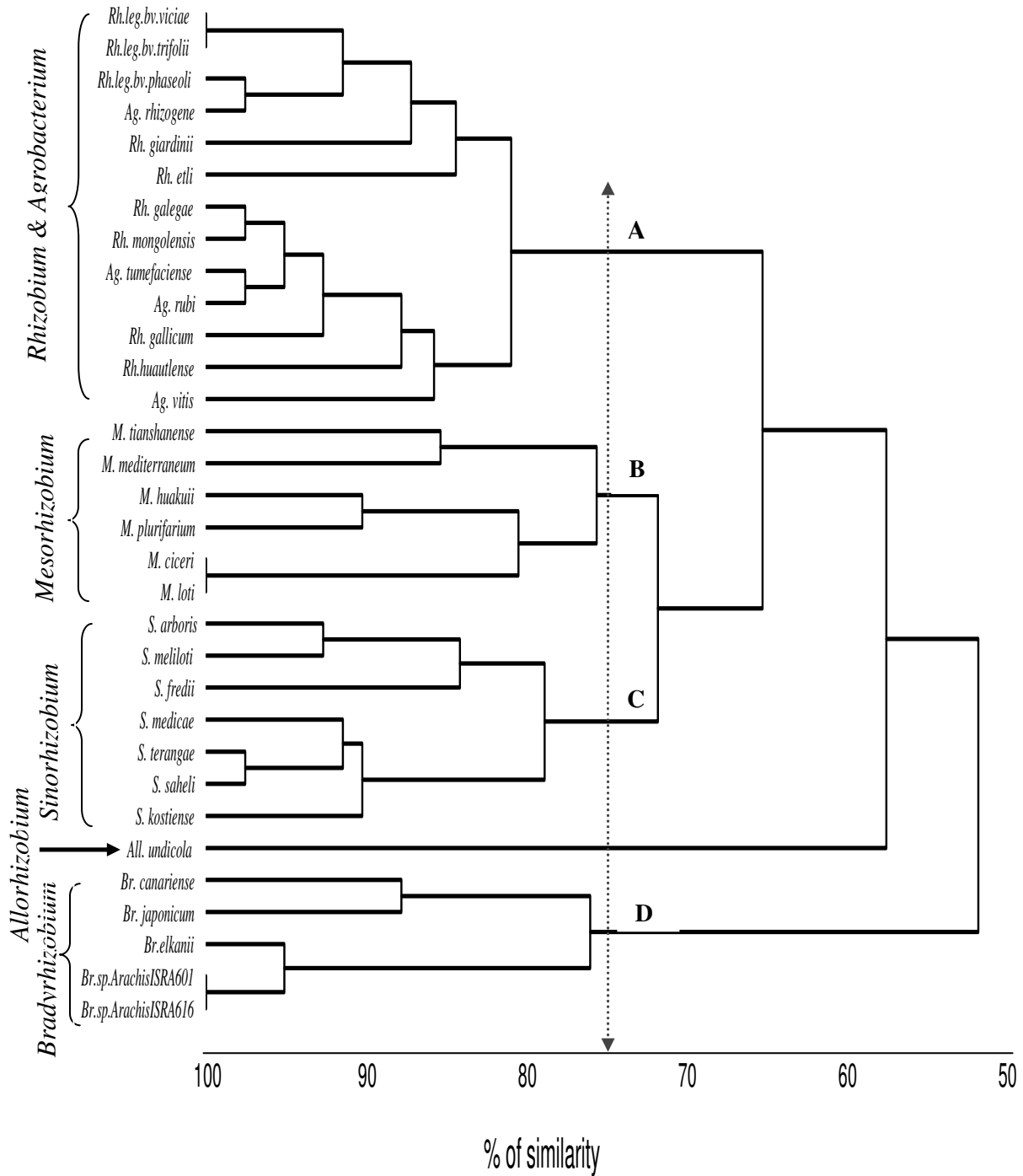


Figure 29 : Dendrogramme construit par UPGMA indiquant la position phylogénétique des souches de référence utilisées sur la base de la PCR/RFLP de l'ADNr 16S

Les groupements phylogénétiques combinant aussi bien les souches de lupin que les souches de référence sont représentés par la figure 30. Concernant les souches de lupin, à un niveau de similarité de 70%, elles se répartissent en cinq groupes distincts. Si on se situe à un niveau de similarité de 80%, on remarque que chacun des clusters 2, 3, 4 et 5 se trouve subdivisé en 3 à 4 sub-clusters indiquant ainsi la grande diversité génétique qui existe entre ces souches.

En comparant avec les souches de référence, nous avons noté que trois souches seulement de lupin ont un niveau de similitude élevé avec les souches de référence. Il s'agit de la souche INRA L 61 qui forme un même et unique linéage avec *R. leguminosarum* bv. *viciae* et *R. leguminosarum* bv. *Trifolii* ; la souche INRA L 23 rapprochée de *R. giardinii* avec un coefficient de similitude de 88%, et enfin, la souche INRA L 29 rapprochée des souches de *Mesorhizobium* avec toutefois un niveau de divergence de 25%.

Les souches du cluster 1 forment, à un niveau de similarité de 75%, un même groupe avec les différentes souches de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium*.

Le groupe de souches formé par les clusters 2, 3 et 4 se trouve rapproché au groupe de souches de référence appartenant aux genres *Rhizobium*, *Mesorhizobium* et *Sinorhizobium* à un niveau de similitude de 62% qui correspond à la troisième subdivision de l'arbre phylogénétique.

Le cluster 5 est formé par 11 souches de l'amas nodulaire. En fait, ces souches forment une branche séparée dans l'arbre phylogénétique et sont classées distinctement de la totalité des souches analysées dès la première subdivision de l'arbre qui se situe à un niveau inférieur à 55% de similitude.

A travers les groupements phylogénétiques, un grand niveau de polymorphisme moléculaire a été détecté au sein des souches nodulant les six espèces de lupin et entre ces souches et les souches de référence utilisées. Toutefois, la grande diversité obtenue entre les souches nodulant le lupin ne présente aucune relation avec la plante hôte d'origine puisqu'on retrouve des souches nodulant la même espèce dans différents clusters (ex. *Lupinus luteus*). Cette diversité est également indépendante de la région d'origine puisque les souches issues de la même région, par exemple du Gharb ou de Rabat, se trouvent réparties dans les différents clusters délimités. Ceci, à l'exception des souches de l'amas nodulaire qui ont été isolées de l'espèce *L. luteus* dans la région de Mnasra et qui constituent par leur positionnement distinct un cas bien particulier (Tableau 21).

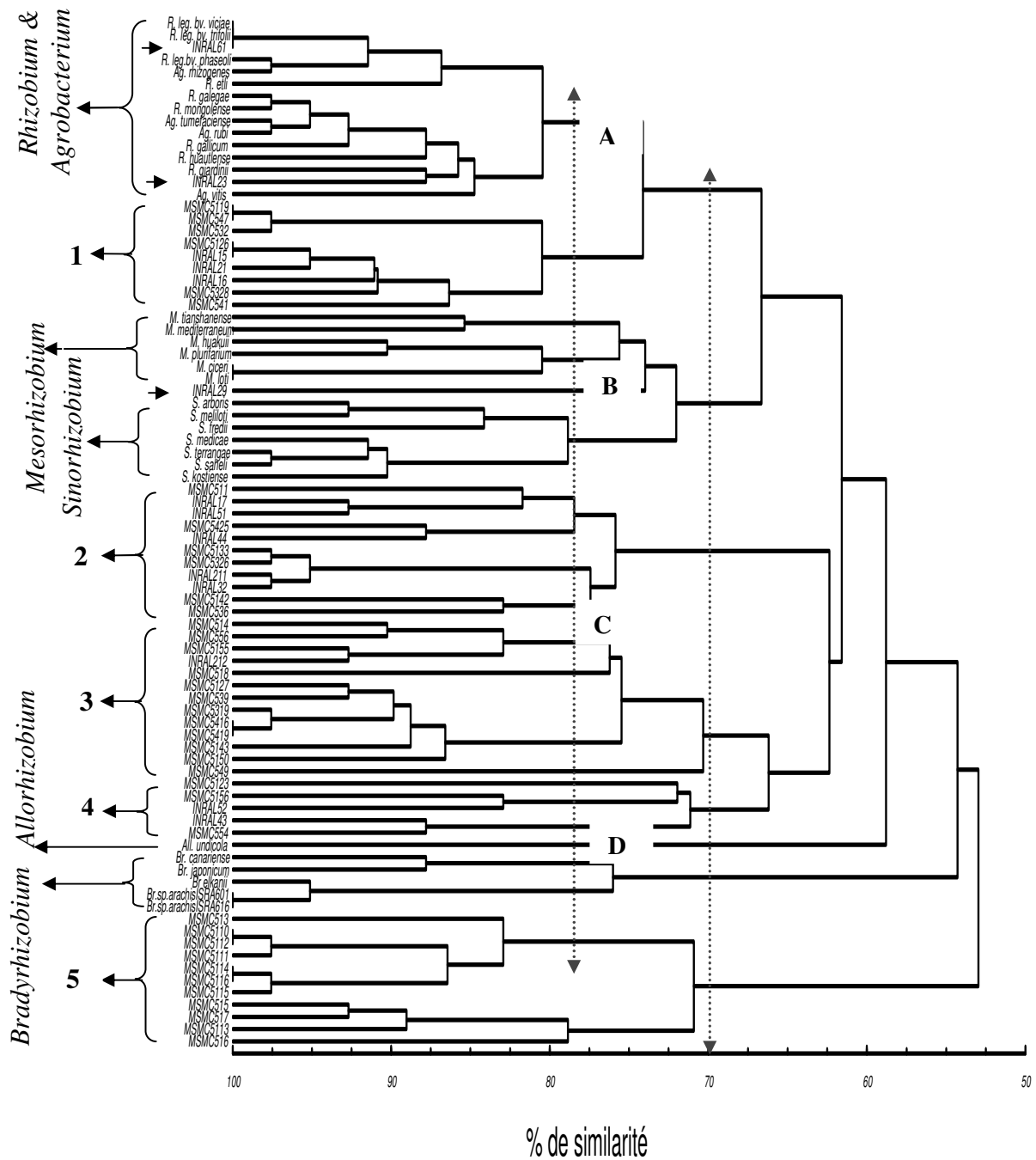


Figure 30 : Dendrogramme construit par UPGMA indiquant la position phylogénétique des souches nodulant le lupin et des souches de référence sur la base de la PCR/RFLP de l'ADNr 16S

Tableau 21. Groupes de souches nodulant le lupin formant les différents clusters délimités par la PCR/RFLP du gène de l'ADNr 16S par rapport à la plante et la région d'origine.

Cluster	Souches	Nbr. de ribotype	Région d'origine	Plante d'origine	
1	↑ MSMC 5119	9	Gharb	<i>L. luteus</i>	
	MSMC 5126		Rabat		
	INRA L 15		Assilah vers Tanger		
	INRA L 16				
	INRA L 21			Rabat	<i>L. albus</i>
	MSMC 532			Gharb	<i>L. angustifolius</i>
	MSMC 5328			Cherifat	
	MSMC 541			Gharb	<i>L. cosentinii</i>
	↓ MSMC 547				
2	↑ MSMC 511	11	Mnasra	<i>L. luteus</i>	
	MSMC 5133		Rabat		
	MSMC 5142		Sidi Yahya		
	INRA L 17		Assilah vers Tanger		
	INRA L 211			Blad dandoun	<i>L. albus</i>
	MSMC 536			Gharb	<i>L. angustifolius</i>
	MSMC 5326			Taza vers Bab Berred	
	INRA L 32			Rabat	
	MSMC 5425			Rabat vers Larache	<i>L. cosentinii</i>
	INRA L 44			Assilah vers Tanger	
	INRA L 51			Gharb	<i>L. pilosus</i>
3	↑ MSMC 514	13	Mnasra	<i>L. luteus</i>	
	MSMC 518				
	MSMC 5127		Rabat		
	MSMC 5143		Sidi Yahya		
	MSMC 5150		Asni		
	MSMC 5155		piégeage		
	INRA L 212			Merchouch	<i>L. albus</i>
	MSMC 539			Gharb	<i>L. angustifolius</i>
	MSMC 5319			Larache vers Tetouan	
	MSMC 549			Kenitra vers Larache	<i>L. cosentinii</i>
	MSMC 5416			Rabat	
	MSMC 5419				
	↓ MSMC 556			Larache vers Tetouan	<i>L. pilosus</i>
4	↑ MSMC 5123	5	Gharb	<i>L. luteus</i>	
	MSMC 5156		piégeage		
	INRA L 43			Rabat	
	INRA L 52			Settat	
	MSMC 554			Larache vers Tetouan	
5	↑ MSMC 513 - MSMC 515	9	Mnasra	<i>L. luteus</i>	
	MSMC 516 - MSMC 517				
	MSMC5110 - MSMC5111				
	MSMC5112 - MSMC5113				
	MSMC5114 - MSMC5115				
	↓ MSMC 5116				

4 – DISCUSSION

L'étude des relations génétiques révélées aussi bien par la PCR/REP que par la PCR/RFLP de l'ADNr 16S a permis de mettre en évidence un haut niveau de polymorphisme moléculaire entre les différentes souches de lupin. En outre, les deux analyses ont montré que les souches de l'amas nodulaire représentent un groupe particulier parmi les souches de lupin étudiées.

La conclusion la plus intéressante qui dérive de l'analyse par PCR/RFLP de l'ADNr 16S est que les souches de lupin étudiées sont totalement distinctes des souches du genre *Bradyrhizobium*. En outre, ces souches ne présentent pas un statut taxonomique précis et par conséquent leur classification phylogénétique exacte reste à déterminer.

En fait, le positionnement taxonomique des souches nodulant le lupin reste jusqu'à présent très controversé vu l'isolement de souches à croissance rapide et de souches à croissance lente rapporté dans différentes recherches. L'isolement de souches à croissance rapide a été rapporté par Corich *et al.* (1981) (cité par van Berkum et Eardly, 1998) ainsi que par Jordan (1984) chez *L. densiflorus*. La souche LUP 43 isolée d'une autre espèce de lupin dans la région de Baja California au Mexique présentait également un temps de génération de 3,6 heures (Schlinkert-Miller et Pepper, 1988). Toutefois, ces souches n'ont été caractérisées que sur la base du temps de génération et de quelques caractères phénotypiques. Cependant, sur la base des mêmes caractères, d'autres recherches ont pu classer les souches de lupin en tant que des bradyrhizobia (Jordan, 1982 ; Bottomley *et al.*, 1994). Xu *et al.* (1995) ont rapporté, sur la base de 191 caractères phénotypiques, que la souche *Bradyrhizobium* sp (*Lupinus*) G13 originaire d'Argentine présentait une grande similitude de l'ordre de 90% avec des souches de *Bradyrhizobium japonicum* originaire de Chine.

De point de vue génétique et sur la base de la PCR/RFLP de l'ADNr 16S, Laguerre *et al.* (1994, 1997) ont rapporté que la souche MSDJ 718 isolée de *L. luteus* en France ainsi que la souche VK7, VK4 isolée de *Lupinus* sp. en Afrique du Sud se sont révélées très proches des souches de *Bradyrhizobium*. En outre, sur la base de l'analyse aussi bien de l'ADNr 16S que de l'ADNr 23S, la souche DSM 30140 nodulant le lupin a montré un positionnement taxonomique au sein des bradyrhizobia (Ludwig *et al.*, 1995). De plus, Barrera *et al.* (1997) ont pu caractériser 41 souches de lupin isolées de *L. campestris*, *L. montanus* et *L. exaltatus* originaires du Mexique par l'analyse de la séquence complète de l'ADNr 16S. Les résultats ont montré que l'ensemble des souches a été regroupé avec la souche *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6.

Cependant, une étude récente menée par Jarabo-Lorenzo *et al.* (2003) a montré à travers la PCR/RFLP de l'ADNr 16S et par l'analyse de la séquence de ce gène, l'existence de 9 génotypes différents chez 45 souches nodulant le lupin dans les îles des Canaries. 69% de ces souches possèdent des génotypes qui se sont révélés très distincts de ceux des souches de référence nodulant le soja.

Récemment, Trujillo *et al.* (2005) ont montré sur une base comparative de la séquence complète de l'ADNr 16S que des souches à croissance rapide de lupin LUP 21 et LUP 23 isolées de *Lupinus honoratus* ont été classées avec les espèces du genre *Ochrobactrum* et ont présenté un niveau de similitude de 99,5% avec l'espèce *Ochrobactrum antropi*. Ces deux souches appartiennent par conséquent au genre *Ochrobactrum* qui appartient à la famille des *Brucellaceae* faisant partie de la sous-classe α_2 des Protéobactéries. Cette découverte a permis aux auteurs de conclure qu'il existe une dynamique très active entre les bactéries du sol via le transfert de plasmides porteurs de gènes symbiotiques de nodulation et de fixation.

En effet, durant les quatre dernières années, plusieurs bactéries, autres que les rhizobia, ont été rapportées comme étant des bactéries pouvant établir des relations symbiotiques avec différentes légumineuses. Parmi ces bactéries, on trouve quelques espèces du genre *Methylobacterium* (Sy *et al.*, 2001) et *Devosia* (Rivas *et al.*, 2002, 2003) qui appartiennent à la sous-classe α des Protéobactéries ainsi que d'autres espèces du genre *Ralstonia* (Chen *et al.*, 2001) et *Burkholderia* (Moulin *et al.*, 2001 ; Vandamme *et al.*, 2003) qui appartiennent à la sous-classe β des Protéobactéries.

Le développement de nouveaux systèmes de production agricole qui renforcent l'utilisation des ressources naturelles écologiquement non polluants et qui permettent de réduire l'usage d'engrais notamment riches en azote a permis de concentrer l'attention sur le rôle potentiel de la fixation biologique de l'azote. En effet, la reconnaissance de l'importance de la symbiose rhizobia – légumineuse a joué un rôle considérable dans l'accroissement du rendement des

légumineuses cultivées, dans l'amélioration de la fertilité du sol et dans la réhabilitation des sols appauvris.

L'axe de notre recherche couvre l'étude de la biodiversité des populations naturelles des bactéries symbiotiques nodulant les six espèces de lupin rencontrées au Maroc. Cette recherche a permis de déceler d'une part les différentes caractéristiques d'intérêt fonctionnel des souches et leur diversité en vue d'établir leur position taxonomique et de déterminer des candidats à inoculer. Or, jusqu'à nos jours, aucune étude précise n'a été menée pour étudier la variabilité des bactéries symbiotiques de lupin au Maroc et moins encore celles des espèces sauvages. Il a été donc crucial de pouvoir caractériser les souches indigènes sur des bases précises et selon les normes internationales.

A cet effet, des prospections de collecte de plantes nodulées appartenant à différentes espèces de lupin ont été menées dans différentes régions du Maroc. Une collection de 159 isolats issus à partir des nodosités fraîches a été réalisée. Ces isolats ont été authentifiés par inoculation des plantules de *L. luteus* et *L. albus* cultivées sur un sol stérile. Les résultats analysés après un mois de culture se sont révélés tous positifs et ceci indépendamment de l'espèce d'origine des isolats.

La côte atlantique qui s'étend de Rabat jusqu'à Larache et la région du Gharb ont pu donner le plus grand nombre d'isolats. En effet, le lupin se développe efficacement sur les sols de type sableux qui caractérisent la côte atlantique marocaine et le Gharb (province de Kenitra et celle de Sidi Yahya) représente la région la plus productrice en fourrage et en semences de lupin dans le pays.

La population des rhizobia dans chacun des sols caractérisés n'est pas homogène mais il s'est avérée qu'elle est composée de bactéries phénotypiquement et génétiquement très distinctes.

L'analyse par PCR/REP a été adoptée comme un premier moyen de caractérisation, elle a été utilisée essentiellement pour la différenciation des 159 isolats au niveau souche. Une hétérogénéité considérable a été mise en évidence témoignant de l'existence d'un nombre très élevé de souches équivalent à 157.

Par cette même analyse, nous avons pu démontrer l'existence de souches génétiquement différentes au sein d'un même amas nodulaire. En fait, même si les structures nodulaires de type lupinoid est une des caractéristiques qui distingue le genre *Lupinus* des autres genres

appartenant aux Génistées, aucune investigation n'a montré jusqu'à lors que ces structures peuvent abriter différentes souches bactériennes. Ainsi, pour expliquer, à titre hypothétique, la formation d'un tel type de nodosités, deux suppositions ont été émises. La première considère, qu'en dépit de leur hétérogénéité génétique, les souches présenteraient les mêmes facteurs de nodulation et par conséquent, une grande compatibilité d'infection et d'induction du développement nodulaire chez la même plante. La deuxième considère que la plante hôte, *L. luteus* présenterait une grande affinité pour différentes souches bactériennes et par conséquent la spécificité est moins restreinte.

La multiple infection nodulaire mise en évidence par cette étude pourrait être d'une grande valeur agronomique et pourrait constituer une direction importante pour l'amélioration de la symbiose rhizobium – légumineuse à travers des inoculations multiples.

52 souches ont été sélectionnées à partir de l'analyse PCR/REP et ont été utilisées dans les étapes de caractérisation ultérieures. Ces souches ont présenté une bonne affinité infective avec la plante hôte utilisée, *L. luteus*. La majorité des souches a présenté également des pourcentages d'efficacité relative très importants et ceci indépendamment de la plante hôte ou du site d'origine. Toutefois, les souches isolées à partir des espèces sauvages se sont révélées particulièrement très efficaces.

Curieusement, toutes les souches ont présenté un taux de croissance rapide. Cependant, les symbiotes de lupin sont généralement définis comme des bradyrhizobia. Quelques souches à croissance rapide ont été toutefois rapportées mais leur attribution à un genre bien déterminé de rhizobia n'a pas été élucidée. Récemment, il a été rapporté que deux souches de lupin à croissance rapide appartiennent au genre *Ochrobactrum* qui fait partie de la branche α_2 des Protéobactéries (Trujillo et al., 2005).

Dans notre étude, vu que les souches ont été isolées à partir de différentes espèces de lupin et de différents sites géographiques, on peut conclure que les souches à croissance rapide sont présentes dans les différents sols marocains. Cette croissance rapide est d'une grande importance pratique surtout dans les stratégies de production d'inoculums.

L'utilisation des différents substrats carbonés a montré également un profil d'assimilation très similaire à celui des souches à croissance rapide.

L'aptitude des souches à hydrolyser l'urée ou à réduire le nitrate a révélé une grande variabilité. Cependant, les souches à croissance très rapide ont montré des résultats négatifs et par conséquent, un excès d'urée ou de nitrate exogène dans le sol pourrait affecter le caractère symbiotique de ces souches.

Disposer d'une bonne collection de souches nodulant le lupin est essentiel pour la création de symbioses complémentaires et efficaces. Les souches indigènes sont plus compétitives et plus adaptées pour survivre sous les contraintes édaphiques locales (salinité, acidité, alcalinité, température, etc.) en l'absence de la plante hôte.

Ainsi, nous avons évalué la tolérance de toutes les souches de la collection vis-à-vis des principaux facteurs de stress, en l'occurrence la salinité et principalement le NaCl qui représente le sel le plus répandu Maroc, le pH et les températures extrêmes. L'osmotolérance s'est révélée très importante pouvant aller jusqu'à 1190 mM et 1700 mM NaCl. Les souches ont été capables également de pousser sur une gamme assez large de pH allant de 4,5 à 9,5. Cependant, Tang et Robson (1996) ont rapporté que des valeurs de pH au-dessus de 6 ont un effet inhibiteur sur la nodulation chez le lupin. Quant à la température, la tolérance totale s'étend de 10°C à 35°C.

Dans le sol, la salinité et les variations du pH sont accompagnées généralement par la toxicité minérale. Nous avons donc apprécié le degré de l'inhibition de la croissance des souches par six différents métaux sous formes de chlorure. L'inhibition s'est révélée plus importante selon l'ordre suivant $Cd > Hg > Co > Zn > Al > Mn$. La résistance des souches aux huit différents antibiotiques testés a indiqué une grande résistance à l'érythromycine et à l'ampicilline contre une sensibilité bien marquée à la kanamycine.

L'analyse combinée de toutes les données phénotypiques nous a permis de repérer des souches très performantes. En fait, les souches ont présenté une hétérogénéité suffisante pour permettre de sélectionner des souches adaptées à des conditions environnementales très variables. A travers la même analyse, on a pu déduire que l'hétérogénéité des souches ne peut être due ni aux différentes espèces de lupin ni aux différents sites géographiques d'origine puisqu'on retrouve dans un même cluster des souches isolées à partir de différentes espèces et de différents sites.

La méthode moléculaire adoptée pour évaluer la position taxonomique des souches est la PCR/RFLP du gène de l'ADNr 16S. La dimension et le degré de conservation de ce gène font

de lui un marqueur phylogénétique idéal. Les résultats obtenus ont montré que les souches sont également sur le plan génétique très hétérogènes et sont réparties dans cinq clusters très distincts de ceux des souches de référence utilisées. En outre, onze souches de l'amas nodulaire ont été groupées dans un même cluster (cluster 1) qui est largement distinct par rapport aux autres clusters (53 % de similitude). Quelques souches se sont révélées toutefois plus rapprochées à certaines souches de référence. C'est le cas de INRA L 61 avec *R. leguminosarum*, INRA L 23 avec *R. giardinii* et INRA L 29 avec le genre *Mesorhizobium*.

La conclusion la plus importante qui dérive de l'analyse ARDRA est que les souches de lupin étudiées sont parfaitement et totalement distinctes du genre *Bradyrhizobium*. Ce résultat confirme par ailleurs le taux de croissance rapide des souches. Cependant, la plupart des souches n'ont pu être rattachées aux souches de référence utilisées et par conséquent leur classification phylétique exacte reste à déterminer.

Les différents résultats obtenus dans cette étude ouvrent d'intéressantes perspectives sur le plan appliqué et pourraient également servir de base génétique pour les travaux ultérieurs.

Sur le plan appliqué, on peut noter :

- L'exploitation de la grande tolérance des souches aux différents stress environnementaux et de leur potentiel fixateur d'azote par leur utilisation dans des essais d'inoculation sous serre puis au champ (en cours avec l'INRA de Rabat).
- L'exploitation de la grande résistance des souches aux métaux lourds.
- L'établissement de stratégies d'amélioration efficace de la symbiose par la production d'inoculum de bonne qualité, c'est-à-dire l'étude de l'aptitude des souches sélectionnées à survivre et à maintenir leur potentiel symbiotique durant le stockage de l'inoculum, pendant l'inoculation au champ et durant les années suivantes (besoin de réinoculation).

Sur le plan écophysiologique et moléculaire, on peut citer :

- L'élucidation des mécanismes d'infection et des déterminants génétiques impliqués dans la formation de l'amas nodulaire.

-
- La détermination du statut taxonomique des souches de lupin étudiées par d'autres techniques moléculaires, en l'occurrence le séquençage du gène de l'ADNr 16S (analyse en cours). L'hybridation ADN/ADN pourra préciser si ces souches constituent une nouvelle espèce parmi les rhizobia ou parmi tout autre genre des protéobactéries.

- Aarons, S. R., and P. H. Graham.** 1991. Response of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* to acidity. *Plant Soil*. **134**, 145-151.
- Abbas S. M., and E.A. Kamel.** 2004. *Rhizobium* as a Biological Agent for Preventing Heavy Metal Stress. *Asian J. Plant Sc.* **3**, 416-424.
- Abdalla. M. H.** 1999. Nodulation and nitrogen fixation of *Lupinus* species with *Bradyrhizobium* (*Lupinus*) strains in iron-deficient soil. *Biol. Fertile. Soils*. **28**, 405-415.
- Abdelmoumen, H., A. Filali-Maltouf, M. Neyra, A. Belabed, and M. Missbah El Idrissi.** 1999. Effect of high salt concentrations on the growth of rhizobia and responses to added osmotica. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 886-898.
- Ahmad, M. H., and E. Smith.** 1985. Utilization of carbon and nitrogen sources and acid/alkali production by *Cowpea* rhizobia. *Plant and Soil*. **86**, 279-282.
- Alexander, E., D. Pham, and T. R. Steck.** 1999. The viable-but-nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3754-3756.
- Allen E. K., and O.N. Allen.** 1950. Biochemical and Physiological properties of the rhizobia. *Bacteriol. Rev.* **14**, 173-330.
- Allen E. K., and O.N. Allen.** 1981. The leguminosae: A source book of characteristics, uses and nodulation. Madison : University of Wisconsin Press, 812 pp.
- Amabile-Cuevas, C. F., and M. E. Chicure.** 1992. Bacterial plasmids and gene flux. *Cell* **70**, 189-199.
- Amarger, N., A. Mariotti, and F. Mariotti.** 1977. Essai d'estimation du taux d'azote fixé symbiotiquement chez le lupin par le traçage isotopique naturel (¹⁵N). *C. R. Acad. Sci.* **284**, 2179-2182.
- Amarger, N., V. Macheret, and G. Laguerre.** 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 996-1006.
- Angel, J. S., S. P. Mc Grath, A. M. Chaudri, R. L. Chaney, and K. E. Giller.** 1993. Inoculation effect on legumes grown in soil previously contaminated with sewage sludge. *Soil Biol. Biochem.* **25**, 575-580.
- Appana, V. D.** 1988. Alteration of polysaccharides composition in *Rhizobium meliloti*. JJ-1 exposed to manganese. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**, 79-82.
- Ara Begum A., S. Leibovitch, P. Migner, and F. Zhang.** 2001. Specific flavonoids induced *nod* gene expression and pre-activated *nod* genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *J. Exp. Bot.* **360**, 1537-1543.
- Arreseigor, C., F. R. Minchin, A. J. Gordon, and A. K. Nath.** 1997. Possible cause of the physiological decline in soybean nitrogen fixation in response to nitrate. *J. Exp. Bot.* **48**, 905-913.
- Ascherson P. and P. Graebner.** 1907. Synopsis der mitteleuropäischen Flora, Band III (Monocotyledones). Verlag Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Aurag J., and F. Brhada.** 1995. Dynamique des populations de *Rhizobium* introduites dans le sol: influence du stress hydrique, de l'acidité et de la texture du sol. In: INRA (eds)

Facteurs limitant la fixation symbiotique de l'azote dans le Bassin Méditerranéen. Paris, pp 149-158.

Aurag, J., and A. Sasson. 1992. Tolerance of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* to acidity and drought. *W. J. Microbiol. Biotech.* **8**, 532-533.

Ayisi, K. K. D. H. Putnam, C. P. Vance, and P. H. Graham. 1992. *Bradyrhizobium* inoculation and nitrogen fertiliser effects on seed yield and protein of white lupin. *Agronomy J.* **84**, 857-861.

Baldwin, I. L., and E. B. Fred. 1929. Nomenclature of the root nodule bacteria of the leguminosae. *J. Bacteriol.* **17**, 141-150.

Barnett, M. J., R. F. Fisher, T. Jones, C. Komp, A. P. Abola, F. Barloy-Hubler, L. Bowser, D. Capela, F. Galibert, J. Gouzy, M. Gurjal, A. Hong, L. Huizar, R. W. Hyman, D. Kahn, M. L. Kahn, S. Kalman, D. H. Keating, C. Palm, M. C. Peck, R. Surzycki, D. H. Wells, K-C. Yeh, R. W. Davis, N. A. Federspiel, and S. R. Long. 2001. Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc. Natl. Sci. USA.* **98**, 9883-9888.

Barnett, Y., P. C. Catt, R. Jenjareontham, and K. Mann. 1993. Fast-growing root nodule bacteria from Australian *Acacia* spp., in *New Horizons in Nitrogen Fixation*, Palacios, R. et al., Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 594p.

Barrera, L. L., M. E. Trujillo, M. Goodfellow, F. J. Garcia, I. Hernandez-lucas, G. Davila, P. van Berkum, and E. Martinez-Romero. 1997. Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 1086-1091.

Bassett, B., R. N. Goodman, and A. Novacky. 1977. Ultrastructure of soybean nodules. Release of rhizobia from the infection thread. *Can. J. Microbiol.* **23**, 573-582.

Beale P. E., A. Lahlou, and M. Bounejmate. 1991. Distribution of wild annual legume species in Morocco and relationship with soil and climatic factors. *Aust. J. Agric. Res.* **42**, 1217-1230.

Berg, D. E., N. S. Akopyants, and D. Kersulyte. 1994. Fingerprinting microbial genomes using the RAPD or AP-PCR method. *Methods Mol. Cellular Biol.* **5**, 13-24.

Beringer J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Genet. Microbiol* **84**, 188-198.

Beringer, J. E., N. J. Brewin, A. W. B. Johnston, H. M. Schulman, and D. A Hopwood. 1979. The *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **204**, 219-233.

Berkia, A. 2004. La symbiose *Acacia-Rhizobium* : effet de la salinité et implication des lipopolysaccharides. Thèse du Doctorat Nationale. Université Mohammed V. Rabat.

Beyerinck, M. W. 1888. Die Bacterien der Papilionaceen-Knöllchen. *Bot. Zeitung* **46**, 725-804.

Beyerinck, M. W. 1890. Künstliche Infection von *Vicia Faba* mit *Bacillus radicola*. Ernährungsbedingungen dieser Bacterie. *Bot. Zeitung* **52**, 837-843.

Beyerinck, M. W., and van Delden. 1902. Über die assimilation des freien stickstoffs durch bakterien. Zentrablatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. *Abteilung II.* **9**, 3-43.

- Bhagwat, A. A., K. C. Gross, R. E. Tully, and D. Keister.** 1996. β -Glucan synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: characterization of a new locus (*ndvC*) influencing β -(1 \rightarrow 6) linkages. *J. Bacteriol.* **178**, 4635-4642.
- Birouk, A.** 1990. Le lupin. IAV. HASSAN II. Dépt. de Biotechnologie et de Ressources Génétiques. IAV. HASSAN II. Rabat.
- Bohlool, B. B.** 1987. Fluorescence methods for study of *Rhizobium* I culture and in situ, p. 127-147. In G. H. Elkan (ed.) symbiotic nitrogen fixation technology. Marcel Dekker Inc., New York.
- Boncompagni E., M. Osteras, M.C. Poggi, and D. Le Rudulier.** 1999. Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family of rhizobiaceae and their roles in osmoprotection. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2072-2077.
- Bordeleau L. M., and D. Prévost.** 1994. Nodulation and nitrogen fixation under extreme environments. *Plant and Soil.* **161**, 115-135.
- Botsford L., and Lewis T.** 1990. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti* production of glutamic acid in response to osmotic stress. *Appl. Env. Microbiol.* **56**, 488-494.
- Bottomley, P. J., Hsin-hua Cheng, and S. R. Strain.** 1994. Genetic structure and symbiotic characteristics of a *bradyrhizobium* population recovered from a pasture soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1754-1761.
- Bounejmate, M., B. J. Buirchell, A. Birouk, A. Bouizgaren, and N. Saïdi.** 1993. Distribution naturelle au Maroc de trois espèces de lupin en relation avec certains facteurs du milieu. *Al Awamia.* **84**, 29-42.
- Bouzar, H. D.** 1994. Request for a judicial opinion concerning the type species of *Agrobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 373-374.
- Bouzar, H. D., and J. B. Jones.** 2001. *Agrobacterium Larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumors of *Ficus benjamina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1023-1026.
- Breedveld M. W., and K. J. Miller** 1998. Cell-surface β -glucans. In Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas J. J., eds. *The Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands, pp 81-96.
- Breedveld M. W., C. Dijkema, L. P. T. M. Zevenhuizen, and A. J. B. Zehender.** 1993. Response of intracellular carbohydrates to a NaCl shock in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* TA-1 and *Rhizobium meliloti* SU-47. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 3157-3163.
- Brewin N. J., Wood E. A., Young J. P. W.** 1983. Contribution of the symbiotic plasmid to the competitiveness of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Genet. Microbiol.* **129**, 2973-2977.
- Brhada F.; M.C. Poggi, and D. Le Rudulier.** 1997. Choline and Glycine betaine uptake in various strains of Rhizobia isolated from nodules of *Vicia faba* var. *major* and *Cicer arietinum* L.: Modulation by salt, choline and glycine betaine. *Current Microbiol.* **34**, 167-172.
- Brockwell, J., A. Pilka, and R. A. Holliday.** 1991. Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally-occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils of New South Wales. *Aust. J. Exp. Agric.* **31**, 211-219.
- Brockwell, J., E. A. Schwinghamer and R. R. Gault.** 1977. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments. A critical examination of the stability of antigenic streptomycin resistance markers for identification of strains of *Rhizobium trifolii*. *Soil Biol. Biochem.* **9**, 19-24.

- Bromfield, E. S., I. B. Sinha, and M. S. Wolynetz.** 1986. Influence of location, host cultivar, and inoculation on the composition of naturalized populations of *Rhizobium meliloti* in *Medicago sativa* nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1077-1084.
- Bromfield, E. S., L. R. Barran, and R. Wheatcroft.** 1995. Relative genetic structure of a population of *Rhizobium meliloti* isolated directly from soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) and sweet clover (*Melilotus alba*). *Mol. Ecol.* **4**, 183-188.
- Broughton W. J., and M. J. Dillworth.** 1971. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J.* **125**, 1075-1080.
- Broughton, W. J., S. Jabbouri, and X. Perret.** 2000. Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.* **182**, 5641-5652.
- Caetano-Anolles G., and P. M. Gresshoff.** 1991. Plant genetic control of nodulation. *Annu Rev Microbiol.* **45**, 345-382.
- Caldwell, B. E., and G. Vest.** 1968. Nodulation interactions between soybean genotypes and serogroups of *Rhizobium japonicum*. *Crop Sci.* **8**, 680-682.
- Casella, S., J. P. Shapleigh, F. Lupi, and W. J. Payne.** 1988. Nitrite reduction in bacteroids of *Rhizobium "hedysari"* strain HCNT1. *Arch. Microbiol.* **149**, 384-388.
- Cava, J. R., P. M. Elies, D. A. Truowski, and K. D. Neol.** 1989. *Rhizobium leguminosarum* CFN 42 genetic regions encoding lipopolysaccharide structures essential for complete nodule development on bean plants. *J. Bacteriol.* **171**, 8-15.
- Chaintreuil, C., E. Giraud, Y. Prin, J. Lorquin, P. de Lajudie, A. Ba, M. Gillis, and B. Dreyfus.** 2000. Photosynthetic *Bradyrhizobia* are Natural Endophytes of the African Wild Rice *Oryza breviligulata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (12), 5437-5447.
- Chakrabati, S. K., M. S. Lee and A. H. Gibson.** 1981. Diversity in the nutritional requirements of the strains of various *Rhizobium* strains. *Soil Biol. Biochem.* **13**, 349-354.
- Chen, H., A. E. Richardson, and B. G. Rolfe.** 1993a. Studies on the physiological and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1798-1804.
- Chen, H., A. E. Richardson, E. Cartner, M. A. Diordjevic, R. J. Roughley, and B. G. Rolfe.** 1991. Construction of an acid-tolerant *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* strain with enhanced capacity for nitrogen fixation. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2005-2011.
- Chen, H., E. Gartner, and B. G. Rolfe.** 1993b. Involvement of genes on a megaplasmid in the acid-tolerant phenotype of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1058-1064.
- Chen, W. M., S. Laevens, T. M. Lee, T. Coenye, P. De Vos, M. Mergeay, and P. Vandamme.** 2001. *Ralstoni taiwanensis* sp nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of *cystis fibrosis* patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1729-1735.
- Chen, W. X., E. T. Wang, and L. D. Kuykendall.** 2004. Genus *Mesorhizobium*, Family *Photobacteriaceae*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition, 2nd Volume.
- Chen, W. X., E. T. Wang, S. Wang, X. Chen, and Y. Li.** 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. X., G. H. Yan, and J. L. Li.** 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned by *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **38**, 392-397.
- Chen, W. X., Z. Y. Tan, J. L. Gao, Y. Li, and E.T. Wang.** 1997. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **47**, 870-873.
- Cheremisov, B. M.** 1991. Evaluation of lupine collection under inoculation conditions and without nodule bacteria. *Bull. VIR. St. Petersburg.* **213**, 12-17.
- Clark, C. G.** 1997. Ribotyping: a general tool for the study of genetic diversity in microorganisms. *J. Euk. Microbiol.* **44**, 277-283.
- Clements, J. C., B. J. Buirchell, and W. A. Cowling.** 1996. Relationship between morphological variation and geographical origin on selection history in *Lupinus pilosus*. *Plant Breed.* **115**, 16-22.
- Cloutier J., D. Prévost, P. Nadeau, and H. Antoun.** 1992. Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2846-2853.
- Cohen-Krausz S., and S. Trachtenberg.** 1998. Helical perturbations of the flagellar filament: *Rhizobium lupini* H 13-3 at 13A resolution. *J. Struct. Biol.* **122**, 267-282.
- Cole, M. A., and G. H. Elkan.** 1979. Multiple antibiotic resistance in *Rhizobium Japonicum*. *Appl. Env. Microbiol.* **37**, 867-870.
- Collins, M. D.** 1994. Isoprenoid quinines, p. 265-311. In M. Good-fellow and A. G. O'Donnell (ed.), *Modern microbial methods. Chemical methods in prokaryotic systematics.* John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, United Kingdom.
- Cooper, J. E.** 1982. Acid production, acid tolerance and growth rate of *Lotus* rhizobia in laboratory media. *Soil. Biol. Biochem.* **14**, 127-131.
- Cooper, J. E., M. Wood, and A. J. Bjourson.** 1985. Nodulation of *Lotus pedunculatus* in acid rooting solution by fast-and slow-growing rhizobia. *Soil Biol. Biochem.* **17**, 487-492.
- Chapitre 2 **Corby, H. D. L.** 1988. Types of rhizobial nodules and their distribution among the leguminosae. *Kirkia* **13** (1).
- Chapitre 3 **Cordero S., and J. G. Blair.** 1978. The effects of lime-pelleting and lime-superphosphate fertilizer on the growth of three annual legumes in an acid soil. *Plant and Soil.* **50**, 257-268.
- Cordovilla, M. P., F. Ligeró, and C. Lluch.** 1994. The effect of salinity on N fixation and assimilation in *Vicia faba*. *J. Exp. Bot.* **45**, 1483-1488.
- Corich, V., A. Giacomini, F. J. Ollero, A. Squartini, and M. F. Nuti.** 1991. Pulsed-field electrophoresis in contour-clamped homogeneous electric fields (CHEF) for the fingerprinting of *Rhizobium* spp. *FEMS*, 1991.
- Correa, O. S., and A. J. Barneix.** 1997. Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 153-157.
- Cowling, W. A., C. Huyghe, and W. Swiecicki.** 1998. Lupin breeding. In *Lupins as Crop Plants: Biology, production and utilization* (J. S. Gladstones, C. A. Alkins, and J. Hamblin, eds.) CAB International, Oxon.

- Damigri, S. M., L. R. Frederick, and I. C. Anderson.** 1967. Serogroups of *Rhizobium japonicum* in soybean nodules as affected by soil types. *Agron. J.* **59**, 10-12.
- Dangeard, P. A.** 1926. Recherches sur les tubercules radicaux des légumineuses. Le botaniste, Ser.16. 270 p. Paris.
- Date, R. A., and A. M. Decker.** 1965. Minimal antigenic constitution of 28 strains of *Rhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.* **11**, 1-8.
- Davidson, I. A., and M. J. Robson.** 1986. Effect of contrasting patterns of nitrate uptake, N₂-fixation, nodulation and growth of white clover. *Ann. Bot.* **57**, 331-338.
- Davis, E. O., and A. W. B. Johnston.** 1990. Regulatory functions of the 3 *nodD* genes of *rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli*. *Mol. Microbiol.* **4**, 933-941.
- de Bruijn, F. J.** 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2180-2187.
- de Bruijn, F. J., J. Rademaker, M. Schneider, U. Rossbach, and F. J. Louws.** 1996. Rep – PCR Genomic Fingerprinting of Plant Associated Bacteria and Computer – Assisted Phylogenetic Analyses. Biology of Plant – Microbe Interaction; Proceeding of the 8th International Congress of Molecular Plant – Microbe Interactions (G. Stacey, B. Mullin and P. Gresshoff. Eds.) APS Press, p. 497-502.
- de Bruijn, F. J., M. E. Mc Spadden-Gadener, B. Millcamps, J. L. Rademaker, W. Ragatz, D. Schultz, M. L. Struffi, and J. Stoltzfus.** 1997. Molecular approaches in microbial ecology to assess genomic diversity and stress induced gene expression in plant associated diazotrophs. In *Nitrogen Fixation: fundamentals and applications*, pp. 571-576. Edited by C. Elmerich, A Kondorosi and W. E. Newton. Kluwer. The Netherlands.
- de Faria, S. M., G.T. Hay, and J. I. Sprent.** 1988. Entry of rhizobia into roots of *Mimosa scabrella* Bentham occurs between epidermal cells. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 2291-2296.
- de Lajudie, P., A. Willems, B. Pot, and 7 other authors.** 1994. Polyphasic taxonomy of Rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 715-733.
- de Lajudie, P., E. Laurent-Fulele, A. Willems, U. Torck, R. Coopman, M. D. Collins, K. Kersters, and M. Gillis.** 1998a. *Allorhizobium undicola* gen. Nov. sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int.J. Syst.Bacteriol.* **48**, 1277-1290.
- de Lajudie, P., A. Willems, G. Nick, A. Moreira, F. Molouba, B. Hoste, U. Torck, M. Neyra, M. D. Collins, K. Lindstrom, B. Dreyfus, and M. Gillis.** 1998b. Characterisation of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. Nov. *Int.J.Syst. Bacteriol.* **48**, 369-382.
- de Maagd, R. A., C. van Rossum, and B. J. J. Lugtenberg.** 1988. Recognition of individual strains of fast-growing rhizobia by using profiles of membrane proteins and lipopolysaccharides. *J. Bacteriol.* **170**, 3782-3788.
- Debellé, F., G. P. Yag, M. Ferro, G. Truchet, J. C. Promé, and J. Denarié.** 1997. *Rhizobium* nodulation factors in perspective. NATO Adv. Study Inst. Ser. G *Ecol. Sci.* **39**, 15-23.

- Del Papa, M. F., L. J. Balague, S. C. Sowinski, C. Wegener, E. Segundo, F. M. Abarca, N. Toro, K. Niehaus, A. Pühler, O. M. Aguilar, G. Martinez-Drets, and A. Lagares.** 1999. Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of central Argentina and Uruguay. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1420-1427.
- Dénarié, J., F. Debellé and J-C. Promé.** 1996. *Rhizobium* lipochitooligosaccharide nodulation factors : signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 503-535.
- Dev, A., R. K. Gour, R. K. Jain, P. S. Bisen, and L. K. Sengupta.** 1998. Effect of vesicular arbuscular mycorrhiza-*Rhizobium* inoculation interaction on heavy metal (Cu, Zn and Fe) uptake in soybean (*Glycine max*, var. JS-335) under variable P doses. *Int. J. Tropic. Agric.* **15**, 75-79
- Djordjevic S. P., H. Chen, M. Bately, J. W. Redmond, and B. G. Rolfe.** 1987. Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by the addition of homologous exopolysaccharides. *J. Bacteriol* **169**, 53-60.
- Djordjevic, M. A., W. Zurkowski, J. Shine, and B. G. Rolfe.** 1983. Sym plasmid transfer to various symbiotic mutants of *Rhizobium trifolii*, *R. leguminosarum*, and *R. meliloti*. *J. Bacteriol.* **156**, 1035-1045.
- Dobert, R. C., B. T. Breil, and E. W. Triplett.** 1994. DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkani* and their phylogenyic relationships to those of other nodulating bacteria. *Mol. Plant-Microbe Inter.* **7**, 564-572.
- Dohler, K. and W. Klingmuller.** 1988. Genetic interaction of *Rhizobium leguminosarum* biovar viceae with Gram-negative bacteria. In W. Klingmuller (ed.) Risk assessment for deliberate releases, Springer-Verlag, Berlin.
- Downie, J. A., and J. P. W. Young.** 2001. Genome sequencing: The ABC of symbiosis. *Nature.* **412**, 597-598.
- DPV-DREF** (Direction de la Production Végétale). Ministère de l'Agriculture, du développement rural et des eaux et forêts. Bilan des cultures fourragères, Campagne agricole 1999/2000.
- Dracup, M.** 1993. Establishment of lupin seedlings. *W. A. Journal of Agriculture.* **34**, 157-159.
- Dreyfus, B., J. L. Garcia, and M. Gillis.** 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. Nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 89-98.
- Dudman, W. F.** 1971. Antigenic analysis of *Rhizobium japonicum* by immunodiffusion. *Appl. Microbiol.* **21**, 973-985.
- Dunn, D. B.** 1984. Cytotaxonomy and links distribution of New World lupin species. Pp. 68-85. In Proceeding of the Third International Lupine Conference. International Lupin Association. La Rochelle, France.
- Dupuy, N., A. Willems, B. Pot, D. Dewettinck, I. Vandenbruaene, G. Maestrojuan, B. Dreyfus, K. Kersters, M. D. Collins, and M. Gillis.** 1994. Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 461-473.

- Eaglesham, A. R. J.** 1987. The use of intrinsic antibiotic resistance for *Rhizobium* study. In Symbiotic Nitrogen Fixation Technology. Ed. H. Elkan. Pp 185-204. Macel Dekker Inc., New York.
- Eaglesham, A. R. J., and A. Ayanaba.** 1984. Tropical stress ecology of rhizobia, root-nodulation and legume fixation, p. 1-35. In N. S. Subba Rao (ed.), Current developments in biological nitrogen fixation. Edward Arnold Publishers, London, United Kingdom.
- Eardly, B. D., J. P. W. Young, and R. K. Selander.** 1992. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. Strain ORS 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1809.
- Eardly, B. D., L. A. Materon, N. H. Smith, D. A. Johnso, M. D. Rumbaugh, and R. K. Selander.** 1990. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 187-194.
- Eckhardt, M. M., I. L. Baldwin, and E. B. Fred.** 1931. Studies of the root nodule organism of lupines. *J. Bacteriol.* **21**, 273-285.
- Elkan. G. H.** 1992. Taxonomy of the rhizobia. *Can J. Microbiol.* **38**, 446-450.
- El-Mzouri E., and I. Thami Alami.** 2000. Forage and pasture legume biodiversity in the semi-arid areas of West Central Morocco. In Sulas L. (eds.). Legumes for Mediterranean forage crops, pastures and alternative uses. CIHEAM-IAMZ. *Cahiers Options Méditerranéennes*, **45**, 91-94.
- El-sheikh, E. A. E., and M. Wood.** 1989. Response of chickpea and soybean rhizobia to salt: osmotic and specific ions effects of salts. *Soil. Biol. Biochem.* **21**, 889-895.
- Engelhard, M., T. Hurek, and B. Reinhold-Hurek.** 2000. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environ. Microbiol.* **2**, 131-141.
- Ernst, W. H. O.** 1990. Mine vegetation in Europe, p. 21. In A. J. Shaw (ed.), Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Eriksson, J.** 1873. Studier öfver leguminosernas rotknölar. *Acta Univ. Lu....* (10) **8**, 1-30.
- Etzler, M. E., Kalsi, G., Ewing, N. N., Roberts, N. J., Day, R. B., and Murphy, J. B.** 1999. A nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 5856-5861
- Euzéby J. P., and B. J. Findall.** 2004. Status of strains that contravene rules 27(3) and 30 of the Bacteriological Code. Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 293-301.
- FAO.** 1988. Programme de cooperation technique. Programme de développement des productions fourragères et de l'élevage. Rapport de synthèse. 45p.
- Farrand, S. K., P. B. van Berkum, and P. Oger.** 2003. *Agrobacterium* is a definable genus of the family Rhizobiaceae. *Int J Syst Evol Microbiol.* **53**, 1681-1687
- Forsberg, L. S., and R. W. Carlson.** 1998. The structures of the lipopolysaccharides from *Rhizobium etli* strains CE358 and CE359. The complete structure of the core region of *R. etli* lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* **273**, 2747-2757.
- Foury, A.** 1954. Les légumineuses fourragères au Maroc. *Les cahiers de la recherche agronomique.* **3**, 55-78.

- Frank, B.** 1879. Über die Parasiten in den Wurzelanschwellungen der Papilionaceen. *Bot. Zeitung.* **24**, 377-388.
- Frank, B.** 1889. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **7**, 332-346.
- Frank, B.** 1890. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen *Landuv Jahrb.*, , 523-640.
- Fred, E. B., I. L. Baldwin, and E. McCoy.** 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Press, Madison, Wis. (in: Elkan, 1902).
- Freiberg, C., R. Fellay, A. Bairoch, W. J. Broughton, A. Rosenthal, and X. Perret.** 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* **387**, 394-401
- Fuhrman, J. J.** 1990. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxie, and hydrogenase phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 224-229.
- Fujihara, S., and T. Yoneyama.** 1993. Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* p220 and *Bradyrhizobium japonicum* A 1017. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1104-1109.
- Gabor, M.** 1965. Transformation of streptomycin markers in rough strains of *Rhizobium lupini*. II. The relation between the determinant of streptomycin dependence and those for streptomycin resistance and sensitiveness. *Genetics.* **52**, 905-913.
- Gagnon H., and R. K. Ibrahim.** 1998. Aldonic acids: a novel family of *nod* gene inducers of *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium lupini* and *Sinorhizobium meliloti*. *Mol.Plant Microbe Interact.* **11**, 988-998.
- Galibert F., Finan T. M., Long S. R., Pühler A., Abola P., Ampe F., Barloy-Hubler F., Barnett M. J., Becker A., Boistard P. etc.** 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**, 668-672.
- Gao J.-L., S. L. Turner, F. L. Kan, E. T. Wang, Z. Y. Tan, Y. H. Qiu, J. Gu, Z. Terefework, J. P. W. Young, K. Lindström, and W. X. Chen.** 2004. *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 2003-2012.
- Gao, J. L., J. G. Sun, Y. Li, E. T. Wang, and W. X. Chen.** 1994. Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan province, China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 151-158.
- Gault, R. R., J. Brockwell, E. J. Corbin, and K. A. Boundy.** 1986. Nodulation studies on legumes exotic to Australia: *Lupinus* and *Ornithopus* spp. *Aust. J. Exp. Agric.* **26**, 37-48.
- Géniaux, E., G. Laguerre, and N. Amarger.** 1993. Comparison of geographically distant population of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Ecol.* **2**, 295-302.
- Geurts R, and T. Bisseling.** 2002. *Rhizobium* Nod factor perception and signaling. *Plant Cell* **14**, 239-249.
- Gibson, A. H., and J. E. Harper.** 1985. Nitrate effect on nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Sci.* **25**, 497-501.
- Giller, E. K., E. Witter, and S. P. Mc Grath.** 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soil: a review. *Soil Biol. Biochem.* **30**, 1389-1414.

- Giller, K. E., S. P. McGrath, and P. R. Hirsch.** 1989. Absence of nitrogen fixation in clover grown on soil subject to long-term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective *Rhizobium*. *Soil Biol. Biochem.* **21**, 841-848.
- Gillis, M. P. Vandamme, P. De Vos, J. Y. Swings, and K. Kersters.** 2001. Polyphasic taxonomy. Pp. 43-48. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition, Volume I. Boone, D.R., R. W. Castenholz, G. M. Garrity (eds.).
- Giraud, E., L. Hanibal, J. Fardoux, A. Vermeglio, and B. Dreyfus.** 2000. Effect of *Bradyrhizobium* photosynthesis on stem nodulation of *Aeschynomene sensitive*. Proceedings of National Academy of Science USA. **97**, 14795-14800.
- Gladstones, J. S.** 1973. Observations on the distribution and ecology in Iberia and North Africa of some annual legumes adapted to neutral and acid soils. *Aust. Plant. Introd. Rev.* **11**, 9-23.
- Gladstones, J. S.** 1974. Lupins of the Mediterranean Region and Africa. Technical Bulletin number 26. Western Australian Department of Agriculture, Perth.
- Gladstones, J. S.** 1980. Recent developments in the understanding, improvement, and use of *Lupinus*. In: Summerfield R. J. & Bunting A. H. (ed.), *Advances in Legumes Science*, p. 603-611. University of Reading.
- Gladstones, J. S.** 1998. Distribution, origin, taxonomy, history, importance. In *Lupins as Crop Plant: Biology, Production and Utilization* (J. S. Gladstones, C. A. Alkins and J. Hamblin, eds.). CAB International, Oxon.
- Glenn, A. R., and M. J. Dilworth.** 1994. The life of root nodule bacteria in the acidic underground. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**:1-10.
- Gonzalez, J. E., B. L. Reuhs, and G. C. Walker.** 1996. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 8636-8641.
- González-Sama A., M. M. Lucas, M. R. de Felipe, and J. J. Pueyo.** 2004. An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin (*Lupinus albus*). [*New Phytologist*](#). **163**, 371-380.
- Gouffi K., N. Pica, V. Pichereau, and C. Blanco.** 1999. Disaccharides as a new class of non accumulating osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1491-1500.
- Graham, P. H.** 1963. Antibiotic sensitivities of the root nodule bacteria. *Aust. J. Biol. Sci.* **16**: 557-559.
- Graham, P. H.** 1964. Studies on the utilization of carbo-hydrates and Krebs cycle intermediates by rhizobia, using an agar plate method. *Antonie van Leeuwenhoek.* **30**, 68-72.
- Graham, P. H.** 1992. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* **38**, 475-484.
- Graham, P. H.** 1998. Symbiotic nitrogen fixation. In *Principles and applications of soil microbiology*. D. Sylvia et al (Eds.) pp: 325-347. Prentice Hall.
- Graham, P. H., and C. A. Parker.** 1964. Diagnostic features in the characterization of root nodule bacteria of legumes. *Plant Soil.* **20**, 383-396.
- Graham, P. H., K. Draeger, M. L. Ferrey, M. J. Conroy, B. E. Hammer, E. Martinez, S. R. Naarons, and C. Quinto.** 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and

Bradyrhizobium, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Can. J. Microbiol.* **40**, 198-207.

Graham, P. H., M. J. Sadowsky, H. H. Kersters, Y. M. Barnet, R. S. Bradley, J. E. Cooper, D. J. De Ley, B. D. W. Jarvis, E. B. Roslycky, B. W. Strijdom, and J. P. W. Young. 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 582-587.

Graham, P. H., M. J. Sadowsky, S. W. Tighe, J. A. Thompson, R. A. Date, J; G; Howieson, and R. Thomas. 1995. Differences among strains of *Bradyrhizobium* in fatty acid-methy ester analysis. *Can. J. Microbiol.* **41**, 1038-1042.

Grimont, F., and P. A. D. Grimont. 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *An. Inst. Pasteur Microbiol.* **137B**, 165-175.

Grimont, F., and P. A. D. Grimont. 1991. La carte moléculaire des bactéries. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **6**, 9-12.

Grundmann H. J., K. J. Towner, L. Dijkshoorn, P. Gerner-Smidt, M. Maher, H. Seifert, and M. Vanechoutte. 1997. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 3071-3077.

Guedira A. 2002. Contribution à l'étude de l'effet des sols calcaires sur la nodulation du lupin (*Lupinus albus* L.). Mémoire de DESA. Université Ibn Tofail. Kenitra.

Guillemand, M. 1999. Le lupin comme alternative au soja. La France agricole 03.09.1999, S. 40.

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

Gürtler, V., V. A. Wilson, and B. C. Mayall. 1991. Classification of medically important clostridia using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rDNA. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2673-2679.

Gusmão-Lima A. I., E. Figueira, M. P. de Almeida, and S. I. A. Pereira. 2005. Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: glutathione as a detoxifying agent. *Can. J. Microbiol.* **51**, 7-14.

Hartman, A., and N. Amarger. 1991. Genotypic diversity of an indigenous *Rhizobium meliloti* field population assessed by plasmid profiles, DNA fingerprinting, and insertion sequence typing. *Can. J. Microbiol.* **37**, 600-608.

Hartmann A., Giraud J. J., Catroux G. 1998. Genotypic diversity of *Sinorhizobium* (formerly *Rhizobium*) *meliloti* strains isolated directly from a soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) grown in the same soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**, 107-116.

Haukka, K. and K. Lindstrom. 1994. Pulsed-field gel electrophoresis for genotypic comparison of *Rhizobium* bacteria that nodulate leguminous trees. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**, 215-220.

Haukka, K., Lindström, K., and Young, P. W. 1998. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 419-426

Hellriegel, H., and H. Wilfarth. 1988. Untersuchungen über die stickstoffnahrung der gramineon und leguminosen. Beilageheft zu der ztschr. Ver Rübenzucker – Industrie Deuten Reichs.

- Hennecke, H., K. Kaluza, B. Thöny, M. Fuhrmann, W. Ludwig, and E. Stackebrandt.** 1985. Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen fixing bacteria. *Archiv. Microbiol.* **142**, 342-348.
- Hernandez B. S., and D. D. Focht.** 1984. Invalidity of the concept of slow growth and alkali production in cowpea rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 206-210.
- Herrera-Cervera, J. A., J. M. Sanjuan-Pinilla, J. Olivares, and J. Sanjuan.** 1998. Cloning and identification of conjugative transfer origins in *Rhizobium meliloti* genome. *J. Bacteriol.* **180**, 4583-4590.
- Heumann, W.** 1979. *Rhizobium lupini* genetics (lupin). *Current Topics in Microbiology and Immunology.* **88**, 1-24.
- Heyndrickx, M., L. Vauterin, P. Vandamme, K. Kersters, and P. Vos.** 1996. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *J. Microbiol. Methods.* **26**, 247-259.
- Hildebrand, E. M.** 1940. Cane gall of brambles caused by *Phytomonas rubi* nov. sp. *J. Agri. Res.* **61**, 685-696.
- Hillis, D. M., and M. T. Dixon.** 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* **66**, 411-453.
- Hirsch A. M., M. R. Lum, and J. A. Downie.** 2001. What makes the Rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiol.* **127**, 1484-1492.
- Hirsch A. M.** 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol* **122**, 211-237.
- Hirsch A. M.** 1999. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr Opin Plant Biol.* **2**, 320-326.
- Hoeflich, G., G. Kuehn, H. Goerlitz, P. Roemer, M. Brummund, and J. Heelmund.** 1994. Promotion of biological nitrogen fixation in lupines and serradella, a contribution to an economizing plant nutrition. *Arch. Agron. & Soil Sc.* **38**, 405-414.
- Hollis, A. B., W. E. Kloos, and G. H. Elkan.** 1981. Hybridization studies of *rhizobium japonicum* and related *Rhizobiaceae*. *J. Gen. Microbiol.* **123**, 215-222.
- Holmes, B.** 1988. Taxonomy of *Agrobacterium*. *Acta Hortic.* **225**, 47-52.
- Howieson, J. G., I. R. P. Fillery, A. B. Legocki, M. M. Sikorski, T. Strepkowsky, F. R. Minchin, and M. J. Dilworth.** 1998. Nodulation, nitrogen fixation and nitrogen balance. Pp. 149-180. *In* Lupins as Crop Plant. Biology, Production and Utilization (J. S. Gladstones, C. A. Alkins and J. Hamblin, eds.). CAB International, Oxon, UK.
- Howieson, J. G., M. A. Ewing, and M. F. D' Antuono.** 1988. Selection for acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Plant Soil.* **105**, 179-188.
- Huber, I., and S. Selenka-Pobell.** 1994. Pulsed-field electrophoresis-fingerprinting, genome size estimation and *rrn* loci number of *Rhizobium galegae*. *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 528-533.
- Hulton, C. S. J., C. F. Higgins, and P. M. Sharp.** 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements I the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* **5**, 825-834.
- Hume, D. J., and B. J. Shelp.** 1990. Superior performance of the hup-*Bradyrhizobium japonicum* strain 532C in Ontario soybean field trials. *Can J. Plant Sci.* **70**, 661-666.

- Hungria, M. and A. A. Franco.** 1993. Effect of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil*. **149**, 95-102.
- Ibekwe, A. M., J. S. Angle, R. L. Chaney, and P. Vonberkum.** 1997. Enumeration and nitrogen fixation potential of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* grown in soil with varying pH values and heavy metal concentrations. *Agric. Ecosyst. Environ.* **61**, 103-111.
- Irigoyen, J. J., M. Sanchez-Diaz and D. W. Emerich.** 1990. Carbon metabolism enzymes of *Rhizobium meliloti* cultures and bacterioids and their distribution within alfalfa nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2587-2589.
- ITCF, UNIP, FNAMS et AFPP.** 1988. Le lupin blanc doux protéagineux, culture – utilisation. Brochure rédigée sous la responsabilité de Ph. Blanc-quaert, Paris.
- Jarabo-Lorenzo A., R. Perez-Galdona , J. Donate-Correa , R. Rivas , E. Velazquez , M. Hernandez , F. Temprano , and E. Martinez-Molina , T. Ruiz-Argueso, M. Leon-Barrios.** 2003. Genetic diversity of bradyrhizobial populations from diverse geographic origins that nodulate *Lupinus* spp. and *Ornithopus* spp. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**, 611-623.
- Jarvis, B. D. W., A. G. Dick, and R. M. Greenwood.** 1980. Deoxyribonucleic acid homologies among strains of *Rhizobium trifolii* and related species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 42-52.
- Jarvis, B. D. W., C. E. Pankhurst, and J. J. Pastel.** 1982. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**, 378-380.
- Jarvis, B. D. W., H. L. Downer, and J. P. W. Young.** 1992. Phylogeny of fast-growing soybean nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 93-96.
- Jarvis, B. D. W., P. van Berkum, W. X. Chen, S. Nour, M. P. Fernandez, J. C. Cleyet-Marrel, and M. Gillis.** 1997. Transfert of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 895-898.
- Jarvis, B. D. W., T. S. Mc lean, I. G. C. Robertson, and G. R. Fanning.** 1977. Phenetic similarity and DNA base sequence homology and root nodule bacteria from New Zealand native legumes and *Rhizobium* strains from agricultural plants. *New Zealand J. Agric. Res.* **20**, 42-52.
- Jenkins M. B., and P. J. Bottemley.** 1985. Composition and field distribution of the population of *Rhizobium meliloti* in root nodules of uninoculated field grown alfalfa. *Soil Biol. & Biochem.* **17**, 173-179.
- Jensen, H. L.** 1967. Mutual host plant relationships in two groups of legume root nodule bacteria (*Rhizobium* spp.). *Arch. Microbiol.* **59**, 174-179.
- Jensen, H. L., and A. L. Hansen.** 1968. Observations on host relations in root nodule bacteria of the *lotus-Anthyllis* and *Lupinus-Ornithopus* groups. *Acta. Agric. Scand.* **18**, 135-142.
- Jensen, M. A., and N. Straus.** 1993. Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. *PCR Methods Appl.* **3**, 186-194.
- Jian, W., Y. Susheng, and L. Jilun.** 1993. Studies on the salt tolerance of *Rhizobium meliloti*. *Acta Microbiol. Sin.* **33**, 260-267.

- Johnson, A. C., and M. Wood.** 1990. DNA: a possible site of action of aluminium in *Rhizobium* spp. *Appl. & Environ. Microbiol.* **26**, 3629-3633.
- Johnston, A. W. B. and Beringer J. E.** 1975. Identification of the *Rhizobium* strains in pea root nodules using genetic markers. *J. Gen. Microbiol.* **87**, 343-350.
- Johnston, A. W. B., J. L. Beynon, A. V. Buchanan-Wollaston, S. M. Setchell, P. R. Hirsch, and J. E. Beringer.** 1978. High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature.* **276**, 634-636.
- 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, p.234-242. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Josey, D. P., J. Beynon, A. W. B. Jonston, and J. E. Beringer.** 1979. Strain identification of *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *J. Appl. Bacteriol.* **46**, 343-350.
- Judd, A. K., M. Schneider, M. J. Sadowsky, and F. J. de Bruijn.** 1993. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1702-1708.
- Kaneko T., Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, A. Ishikawa, and K. Kawashima.** 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* **7**, 331-338.
- Kannenbergh, E. L., and R. W. Carlson.** 2001. Lipid A and O-chain modifications cause *Rhizobium* lipopolysaccharides to become hydrophobic during bacteroid development. *Mol. Microbiol.* **39**, 379-39.
- Karanja, N. K., and M. Wood.** 1988. Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya. Tolerance of high temperature and antibiotic resistance. *Plant Soil.* **112**, 15-22.
- Kass, E., and M. Wink.** 1997. Molecular phylogeny and phylogeography of *Lupinus* (leguminosae) inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene and ITS 1+2 regions of rDNA. *Plant Syst. Evol.* **208**, 139-167.
- Kassem M., Capellano A., and A. M. Gounot.** 1985. Effets du chlorure de sodium sur la croissance in vitro, l'infectivité et l'efficacité de *Rhizobium meliloti*. *MIRCEN J.* **1**, 63-65.
- Kerstens K., K. H. Hinz, A. Hertle, P. Sergers, A. Lievens, O. Siegmann, and J. De Ley.** 1984. *Bordetella avium* sp. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 56-70.
- Keyser, H. H., and P. B. Cregan.** 1987. Nodulation and competition for nodulation of selected soybean genotypes among *Bradyrhizobium japonicum* serogroup 123 isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2631-2635.
- Keyser, H. H., B. B. Bohlool, T. S. Hu, and D. F. Weber.** 1982. Fast-growing rhizobia isolated from roots of soybean. *Science* **215**, 1631-1632.
- Khbaya B., M. Neyra, P. Normand, K. Zerhari, and A. Filali-Maltouf.** 1998. Genetic Diversity and Phylogeny of Rhizobia That Nodulate *Acacia* spp. in Morocco Assessed by Analysis of rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4912-4917.

- Kinkle, B. K., J. S. Angle, and H. H. Keyser.** 1987. Long-term effects of metal-rich sewage sludge application on soil populations of *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 315-319.
- Kinkle, B. K., M. J. Sadowsky, K. Johnstone, and W. C. Koskinen.** 1994. Tellurium and selenium resistance in rhizobia and its potential use for direct isolation of *Rhizobium meliloti* from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1674-1677.
- Kinkle, K. B. and E. L. Schmidt.** 1991. Transfer of the pea symbiotic plasmid pJB5JI in non-sterile soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3264-3269.
- Kishinevsky, B. D., D. Sen, and R. W. Weaver.** 1992. Effect of high root temperature on *Bradyrhizobium* – peanut symbiosis. *Plant Soil.* **143**, 275-282.
- Klucas, R. V., F. J. Hans, S. A. Russell, and H. J. Evans.** 1983. Nickel: a micronutrient element for hydrogen-dependent growth of *Rhizobium japonicum* and for expression of urease activity in soybean leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 2253-2257.
- Knösel, D. H.** 1984. Genus IV. *Phyllobacterium* (ex. Knösel. 1962) nom. Rev. (*Phyllobacterium* Knösel. 1962, 96). In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.1, pp. 254-256. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Kozhemyakov, A. P., B. M. Cheremisov, B. S. Kurlovich, I. A. Tikhonovich, L. T. Kartuzova, S. A. Tchetkova, and T. A. Emeljanenko.** 2001. Evaluation of the biological nitrogen-fixing ability of lupin (*Lupinus L.*). *PGR Newsletter.* **123**, 66-77.
- Kurlovich, B. S.** 1998. Species and intraspecific diversity of white, blue and yellow lupins. *Plant Genet. Resour. Newsl.* **115**, 1-10.
- Kurlovich, B. S., I. A. Tikhonovich, L. T. Kartuzova, and A. P. Kozhemyakov.** 1997. Trends and methods of lupine breeding for increasing level of symbiotic nitrogen fixation. *Bull. Appl. Bot. Gen. Plant Breed.* **152**, 39-47.
- Kuykendall, L. D.** 2004a. Genus *Azorhizobium* of the family *Hypomicrobiaceae*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition, 2nd Volume.
- Kuykendall, L. D. and F. B. Dazzo.** 2003. Genus *Allorhizobium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. II. 2nd Edition.
- Kuykendall, L. D., B. Saxena, T. E. Devine, and S. E. Udell.** 1992. Genetic diversity in *bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *bradyrhizobium elkanii* sp nov. *Can. J. Microbiol.* **38**, 501-505.
- Kuykendall, L. D., J. M. Young, E. Martinez-Romero, A. Kerr, and H. Sawada.** 2004b. Genus *Rhizobium*, a highly divergent genus in a revised family, the *Rhizobiaceae*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition, 2nd Volume.
- Kuykendall, L. D., M. A. Roy, J. J. O'Neil, and T. E. Devine.** 1988. Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 358-361.
- Ladha, J. K., R. P. Pareek, R. So, and M. Becker.** 1990. Stem nodule symbiosis and its unusual properties, p. 633-640. In P. M. Gresshoff et al (ed.), *Nitrogen fixation: achievements and objectives*. Chapman & Hall, Ltd., London.
- Lagares, A., G. Caetano-anolles, K. Niehauss, J. Lorenzen, H. D. Ljunggren, and G. Favelukes.** 1992. A *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation of alfalfa. *J. Bacteriol.* **174**, 5941-5952.

- Laguerre G., Louvier P., Allard M. R., Amarger N.** 2003. Compatibility of rhizobium genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* Biovar *viciae* for nodulation of host legumes. *Appl. & Environ. Microbiol.* **69**, 2276-2283.
- Laguerre, G., M. P. Fernandez, V. Edel, P. Normand, and N. Amarger.** 1993. Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 761-767.
- Laguerre, G., M. R. Allard, F. Revoy, and N. Amarger.** 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR- amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 56-63.
- Laguerre, G., P. Mavingui, M. R. Allard, M. P. Charnay, P. Louvrier, S. I. Mazurier, L. Rigottier-Gois, and N. Amarger.** 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.
- Laguerre, G., P. van Berkum, N. Amarger, and D. Prévost.** 1997. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4748-4758.
- Laguerre, G., S. M. Nour, V. Macheret, J. Sanjuan, P. Drouin, and N. Amarger.** 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* **147**, 981-993.
- Lal, B., and S. Khanna.** 1995. Selection of salt tolerant *Rhizobium* isolates of *Acacia nilotica*. *W. J. Microbiol. Biotech.* **10**, 637-639.
- Legocki, A. B., W. Karlowski, J. Podlowski, M. Sikorski, and T. Stepkowski.** 1997. Advances in molecular characterization of the yellow lupin- *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) symbiotic model. Pp. 263 – 266 in Biological Nitrogen Fixation for Ecology and Sustainable Agriculture (A. B. Legocki and H. Both, eds.). Proceedings NATO Advanced Research Workshop, Pozan, Poland, 10-14 September 1996. Springer-Verlag; Berlin, Germany.
- Lerouge, I., Laeremans, T., Verreth, C., Vanderleyden, J., Van Soom, C., Tobin, A., and R. W. Carlson.** 2001. Identification of an ATP-binding Cassette Transporter for Export of the O-antigen across the Inner Membrane in *Rhizobium etli* based on the Genetic, Functional, and Structural Analysis of an *lps* Mutant Deficient in O-antigen. *J. Biol. Chem.* **276**, 17190-17198.
- Leung K., S. R. Strain, F. J. de Bruijn, and P. J. Bottomley.** 1994. Genotypic and Phenotypic comparison of chromosomal types within an indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 416-426.
- Lindermann, W. C., E. L. Schmidt, and G. E. Ham.** 1974. Evidence for double infection within soybean nodules. *Soil Science.* **118**, 274-279.
- Lindström K.** 1989. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**, 365-367.
- Lindström K., and S. Lehtomäki.** 1988. Metabolic properties, maximum growth temperature and phase sensitivity of *rhizobium* sp. (*Galega*) compared with others fast-growing rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* **50**, 277-287.
- Lipsanen, P. and K. Lindström.** 1989. Lipopolysaccharides and protein patterns of *Rhizobium* sp. (*Galega*). *FEMS Microbiol. Lett.* **58**, 323-328.

- Lodeiro, A. R., S. L. Lopez-Garcia, T. E. Vasquez, and G. Favelukes.** 2000. Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of *Bradyrhizobium japonicum* by its treatment with soybean seed lectin. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**, 177-184.
- Lohnis, F., and R. Hansen.** 1921. Nodule bacteria of leguminous plants. *J. Agr. Res.* **20**, 543-546.
- Long, S. R.** 2001. Genes and signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiology*, **125**, 69-72.
- Lorenz, M. G., and W. Wackernagel.** 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* **58**, 563.
- Lorquin, J., G. Lortet, M. Ferro, N. Mear, B. Dreyfus, J. C. Prome, and C. Boivin.** 1997b. Nod factors from *Sinorhizobium saheli* and *S. teranga* bv. *sesbaniae* are both arabinosylated and fucosylated, a structural feature specific to *Sesbania rostrata* symbionts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**, 879-890.
- Lorquin, J., G. Lortet, M. Ferro, N. Méar, J.-C. Promé, and C. Boivin.** 1997a. *Sinorhizobium teranga* bv. *acaciae* ORS1073 and *Rhizobium* sp. strain ORS1001, two distantly related *Acacia*-nodulating strains, produce similar Nod factors that are O carbamoylated, N methylated, and mainly sulfated. *J. Bacteriol.* **179**, 3079-3083.
- Louws F. J., M. Schneider and F. J. de Bruijn.** 1996. In: Toranzos G, (ed), *Nucleic Acid Amplification Methods for the Analysis of Environmental Samples*. Technomic Publishing Co 63-94.
- Lowe, R. H., H. J. Evans, and S. Ahmed.** 1960. The effect of cobalt on the growth of *Rhizobium japonicum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**, 675-678.
- Ludwig, W., and K. H. Schleifer.** 1999. Phylogeny of bacteria beyond the 16S rRNA Standard. *ASM News.* **65**, 752-757.
- Ludwig, W., R. Rosselo-Mora, R. Aznar, S. Klugbauer, S. Springs, K. Reetz, C. Beimfohr, E. Brockmann, G. Kirchhof, S. Dorn, M. Bachleitner, N. Klugbauer, N. Springers, D. Lane, M. Weizenegger, and K. H. Schleifer.** 1995. Comparative sequence analysis of 23 rRNA from *Proteobacteria*. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**, 164-188.
- Lupski, J. R. and G. M. Weinstock.** 1992. Short interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* **174**, 4525-4529.
- Lynch, D. H., and D. L. Smith.** 1993. Soybean (*Glycine max*) nodulation and N₂-fixation as affected by exposure to low root-zone temperature. *Plant Physiol.* **88**, 212-220.
- Lynch, J. M., and J. M. Wipps.** 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant & Soil.* **129**, 1-10.
- Maâtallah, J.** 2003. Biodiversité et position phylogénétique des rhizobia nodulant le pois chiche au Maroc: evidence d'un transfert de gene de nodulation entre *Mesorhizobium* et *Sinorhizobium*. Thèse de Doctorat d'Etat Es-Sciences. Université Mohammed V. Rabat.
- Maâtallah, J., E. B. Berraho, S. Munoz, J. Sanjuan, and C. Lluch.** 2002. Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) growing in Moroccan soils. *Agronomie* **22**, 321-329.
- Madrzak, C. J., B. Golinska, J. Krolczak, K. Pudelko, D. Lazewska, B. Lampka and M. Sadowsky.** 1995. *Diversity among field populations of Bradyrhizobium japonicum in Poland.* *Appl. Environ. Microbiol.* **6**, 1194-1200.

- Maidak, B. L., N. Larsen, M. J. McCaughey, R. Overbeek, G. J. Olsen, K. Foge, J. Blandy, and C. R. Woese.** 1994. The ribosomal database project. *Nucleic Acid Res.* **22**, 3485-3487.
- Manniatis T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Martensson A. M., L. Brutti, and H. Ljunggren.** 1989. Competition between strains of *Bradyrhizobium japonicum* for nodulation of soybeans at different nitrogen fertilizer levels. *Plant Soil.* **117**: 219–225.
- Martinez-Romero, E., and J. Caballero-Mellado.** 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit. Rev. Plant Sci.* **15**, 113-140.
- Martinez-Romero, E., L. Segovia, F. M. Mercante, A. A. Franco, P. Graham, and M. A Pardo.** 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. Beans and *Leucaena* sp. Trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 417-426.
- McGrath, S. P.** 1994. Effects of heavy metals from sewage sludge on soil microbes in agricultural ecosystems. In Toxic metals in soil plant Systems, ed. S. M. Ross. Pp. 242-274. John Wiley, Chichester.
- McGrath, S. P., A. M. Chaudri, and K. E. Giller.** 1995. Long term effects of land application of sewage sludge: soils, microorganisms and plants. *J. Indust. Microbiol.* **14**, 94-104.
- McNeil, D. L.** 1982. Variation in *Rhizobium japonicum* strains to nodulate soybean and maintain fixation in the presence of nitrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 647-652.
- Mercado-Blanco, J., and N. Toro.** 1996. Plasmids in rhizobia: The role of nonsymbiotic plasmids. *MPMI.* **9**, 535-545.
- Michiels, J., C. Verreth, and J. Vanderleyden.** 1994. Effects of temperature stress on bean nodulating *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1206-1212.
- Ministère d'Agriculture et de Développement Rural.** 2005. Bilan des cultures fourragères. 2005 DPV.
- Missbah El Idrissi M., N. Auajjar, A. Belabed, Y. Dessaux, and A. Filali-Maltouf.** 1996. Characterization of rhizobia isolated from carob tree (*Ceratonia siliqua*) .*J. Appl. Bacteriol.* **80**, 165-173.
- Moawad H. A., Ellis W. R., Schmidt E. L.** 1984. Rhizosphere response as a factor in competition among three serogroups of indigenous *Rhizobium japonicum* for nodulation of field-grown soybeans. *Appl. & Environ. Microbiol.* **47**, 607-612.
- Moawad, H., and D. Beck.** 1991. Some characteristics of *Rhizobium leguminosarum* isolates from uninoculated field-grown lentil. *Soil Biol. Biochem.* **23**, 917-925.
- Mohamed, S. H., A. Smouni, M. Neyra, D. Kharchaf, and A. Filali-Matouf.** 2000. Phenotypic characteristics of root-nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. grown in Libya. *Plant & Soil.* **224**, 171-183.
- Molouba, F., J. Lorquin, A. Willems, B. Hoste, E. Giraud, B. Dreyfus, M. Gillis, P. de Lajudie, and C. Masson-Boivin.** 1999. Photosynthetic bradyrhizobia from *Aeschynomene* spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3084-3094.

- Monteiro, R., and P. E. Gibbs.** 1986. A taxonomic revision of the unifoliolate species of *Lupinus* (Leguminosae) in Brazil. *Notes RBG Edinb.* **44**, 71-104.
- Moreira, F. M. S., M. Gillis, B. Pot, K. Kersters, and A. A. Franco.** 1993. Characterisation of rhizobia isolated from different groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**, 135-146.
- Morton, A. C., A. P. Begg, G. A. Anderson, S. Takai, C. Lammler, and G. F. Browning.** 2001. Epidemiology of *Rhodococcus equi* strains on thoroughbred horse farms. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2167-2175.
- Moulin, L., A. Munive, B. Dreyfus, and C. Boivin-Masson.** 2001. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature.* **411**, 948-950.
- Mpepereki S, Makonese F, and A. G. Wollum.** 1997. Physiological characterization of indigenous rhizobia nodulation *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils. *Symbiosis.* **22**, 275-292.
- Muchbach, M., A. Nocker, and F. Narbahaus.** 1999. Multiple small heat shock proteins in rhizobia. *J. Bacteriol.* **181**, 83-90.
- Mullis, K. B., and F. A. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Munevar, F., and A. G. Wollum.** 1981. Growth of *Rhizobium japonicum* strains at temperatures above 27°C. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 272-276.
- Munns D. N.** 1968. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. III. Effects of nitrate on root hairs and infection. *Plant Soil.* **29**, 33-49.
- Ndoye, I., F. de Billy, J. Vasse, B. Dreyfus, and G. Truchet.** 1994. Root nodulation of *Sesbania rostrata*. *J. Bacteriol.* **176**, 1060-1068.
- Neyra, M., B. Khbaya, P. de Lajudie, B. Dretfus, and P. Normand.** 1998. Computer assisted selection of restriction enzyme for *rrs* genes PCR/RFLP discrimination of rhizobial species. *Genet. Sel. Evol.* **30**, 297-309.
- Nick, G.** 1998. Polyphasic taxonomy of rhizobia isolated from tropical tree legumes. Ph. D. Thesis. Departement of Applied Chemistry & Microbiology. University of Helsinki.
- Nick, G., and K. Lindström.** 1994. Use of repetitive sequences and polymerase chain reaction technique to fingerprint the genomic DNA of *Rhizobium Galegae* strains and to classify the DNA obtained by sonicating the liquid cultures and root nodules. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**, 265-273.
- Nick, G., P. de Lajudie, B. D. Eardly, S. Suomalainen, L. Paulin, X. Zhang, M. Gillis, and K. Lindström.** 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.
- Niehaus K, Lagares A, and A. Pühler.** 1998. A *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant induces effective nodules on the host plant *Medicago sativa* (alfalfa) but fails to establish a symbiosis with *Medicago truncatula*. *Mol Plant-Microbe Interact.* **11**, 906-914
- Noel, K. D., Forsberg, L. S., and Carlson, R. W.** 2000. Varying the Abundance of O Antigen in *Rhizobium etli* and its Effect on Symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *J. Bacteriol.* **182**, 5317-5324.

- Normand, P., C. Ponsoet, X. Nesme, M. Neyra, and P. Simonet.** 1996. ITS analysis of prokaryotes. *Mol. Microbial. Ecol. Manual.* **3**, 1-12.
- Norris, D. P.** 1965. *Rhizobium* relationships in legumes. Proc. 9th Int. Grassl. Congr. Sao Paulo. **2**, 1087-1092.
- Nour, S. M., Cleyet-Marel, J. C., Normand, P., and Fernandez, M. P.** 1995. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 640-648.
- Nour, S. M., Fernandez, M. P., Normand, P., and Cleyet-Marel, J. C.** 1994a. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 511-522.
- Nour, S. M., J. C. Cleyet-Marel, D. Beck, A. Effose, and M. P. Fernandez.** 1994b. Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Can J. Microbiol.* **44**, 345-354.
- Novikova, T. I., and N. I. A. Gordienko.** 2001. Study of the root nodules in some species of the *Papilionaceae* subfamily by scanning electron microscopy. *Tsitologiya.* **43**, 107-113.
- O.R.M.V.A.G., Mars** 1999. Diagnostic agronomique sur les possibilités de développement du lupin dans la région du Gharb. Rapport N°3.
- Obaton, M.** 1971. Utilisation de mutants spontanés résistants aux antibiotiques pour l'étude écologique des *Rhizobiums*. *C. R. Acad. Sci. Ser. D.* **272**, 2630-2633.
- Obbard, J. P., D. R. Sauerbeck, and K. C. Jones.** 1994. The effect of heavy metal-contaminated sewage sludge on the rhizobial soil population of an agricultural field trial, p. 127-161. In M. H. Donker, H. Eijsackers, and F. Heimback (ed.), *Ecotoxicology of soil organisms*. Lewis Publishers, London, United Kingdom.
- Oberreuter, H, J. Chrzinski, and S. Scherer.** 2002. Intraspecific diversity of *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium glutamium* and *Rhodococcus erythropolis* based on partial 16S rDNA sequence analysis and Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Microbiology.* **148**, 1523-1532.
- Ochman, H., J. G. Lawrence, and E. A. Groisman.** 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**, 299-304.
- Octive, J. C., A. Johnson, and M. Wood.** 1994. Effects of previous aluminium exposure on motility and nodulation by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Soil Biol. & Biochem.* **26**, 1477-1482
- Odee, D. W., J. M. Sutherland, E. T. Makatiani, S. G. Mc Inroy, and J. I. Sprent.** 1997. Phenotypic characteristics and composition of the rhizobia associate with woody legumes growing in diverse Kanyen conditions. *Plant & Soil.* **188**, 65-75.
- O'Hara, G. W., and A. R. Glenn.** 1994. The adaptive acid tolerance response in root nodule bacteria and *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **161**, 286-292.
- Olsen, G., J. C. Woese, and R. Overbeek.** 1994. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* **176**, 1-6.
- Ophel, K., and A. Kerr.** 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 236-241.

- Palmer, K. M., and J. P. W. Young.** 2000. Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations in arable soils than in grass soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2445-2450.
- Parke, D. and L.N. Ornston.** 1984. Nutritional diversity of rhizobiaceae revealed by auxanography. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1743-1750.
- Parker M. A.** 2002. Bradyrhizobia from wild *Phaseolus*, *Desmodium* and *Macroptilium* species in northern Mexico. *Appl. Env. Microbiol.* **68**, 2044-2048.
- Pawlowski, K, and T. Bisseling.** 1996. Rhizobial and actinorhizal symbioses: What are the shared features? *Plant Cell.* **8**, 1899-1913.
- Perret, X., and W. J. Broughton.** 1998. Rapid identification of *Rhizobium* strains by targeted PCR fingerprinting. *Plant & Soil.* **204**, 21-34.
- Perret, X., C. Staehelin, and W. J. Broughton.** 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 180-201
- Peters N. K., and Verma D. P. S.** 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Mol. Plant Microbe Interac.* **3**, 4-8.
- Petes, T. D., and C. W. Hill.** 1988. Recombination between repeated genes in microorganisms. *Annu. Rev. Genet.* **22**, 147-168.
- Pfeffer P. E., G. Becard, D. B. Rolin, J. Ukmalis, P. Cook, and S. Tu.** 1994. In vivo nuclear magnetic resonance study of the osmoregulation of phosphocholine-substituted β -1,3;1,6 cyclic glucan and its associated carbon metabolism in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2137-2146.
- Piha, M. I., and D. N. Munnus.** 1987. Sensitivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbiosis to high soil temperature. *Plant Soil.* **98**, 183-194.
- Pinero D., E. Martinez-Romero, and R. K. Selander.** 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2825-2832.
- Plitman, U. and C. C. Heyn.** 1984. Old World lupins: taxonomy, evolutionary relationships and links with New World species. Pp. 56-66. In Proceeding of the Third International Lupine Conference. International Lupin Association. La Rochelle, France.
- Pointereau, P.** 2001. Légumineuses : quels enjeux écologiques ? *Le courrier de l'environnement.* N°44.
- Prévost, D., H. Antoun, and L. M. Bordeleau.** 1987. Effects of low temperature on nitrogenase activity in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) nodulated by arctic rhizobia. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**, 205-210.
- Pudelko, K., and C. J. Mdrzak.** 1996. Populations of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* nodulating *Lupinus* in Poland, p. 156. In Abstracts of Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture. 2nd European Nitrogen Fixation Conference and NATO Advanced Research Workshop. Scientific Publishers OWN, Poznan, Poland.
- Pueppke, S. G., and W. J. Broughton.** 1999. *Rhizobium* sp. NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host-ranges. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**, 293-318

- Purchase, D., R. J. Miles and T. W. K. Young.** 1997. Cadmium uptake and nitrogen fixing ability in heavy-metal resistant laboratory and field strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**, 85-93.
- Rademaker, J. L., B. Hoste, F. J. Louws, K. Kersters, J. Swings, L. Vauterin, P. Vauterin, and F. J. de Bruijn.** 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 665-677.
- Rai R.** 1983. The salt tolerance of *Rhizobium* strains and lentil genotypes and the effect of salinity on the aspects of symbiotic N-fixation. *J. Agric. Sci.* **100**, 81-86.
- Räsänen, L., U. Heikkilä-Kallio, L. Suominen, P. Lipsanen, and K. Lindstrom.** 1991. Expression of *Rhizobium galegea* common *nod* clones in various backgrounds. *Mol. Plant Microbe Interc.* **4**, 536-544.
- Raza S., B. Jornsgard, H. Abou-Taleb , and J. L. Christiansen.** 2001. Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupini*) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**, 379-83.
- Reddy, G. B., C. N. Cheng, and S. J. Dunn.** 1983. Survival of *Rhizobium japonicum* in sludge environment. *Soil Biol. Biochem.* **15**, 343-345.
- Riley, I. T., and M. J. Dillworth.** 1985. Cobalt status and its effects on soil population of *rhizobium lupini*, rhizosphere colonization, and nodule initiation. *Soil bacteriol. & Biochem.* **17**, 81-85.
- Rinaudo, G., S. Orenge, M. P. Fernandez, H. Meugnier, and R. Bardin.** 1991. DNA homologies among members of the genus *Azorhizobium* and other stem- and root-nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 114-120.
- Rivas R., E. Velázquez, A. Willems, N. Vizcaíno, N. S. Subba-Rao, P. F. Mateos, M. Gillis, F. B. Dazzo, and E. Martínez-Molina.** 2002. A New Species of *Devosia* That Forms a Unique Nitrogen-Fixing Root-Nodule Symbiosis with the Aquatic Legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5217-5222.
- Rivas R., Willems A., Subba-Rao N. S., Mateos P.F., Dazzo F. B., Kroppenstedt R. M., Martínez-Molina E., Gillis M., and E. Velázquez.** 2003. Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**, 47-53.
- Rivas, R., A. Willems, J. L. Palomo, P., Garcia-Benavides, P. F. Mateos, E. Martinez-Molina, M. Gillis, and E. Velazquez.** 2004. "*Bradyrhizobium betae* sp. nov. isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumor-like deformations." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1271-1275.
- Robert, F. M., J. A. E. Molina and E. L. Schmidt.** 1982. Properties of *Rhizobium leguminosarum* isolated from various regions of Morocco. *Ann. Microbiol.* **133**, 461-470.
- Robinson, K. O.** 1997. Evaluation of lupin and *Bradyrhizobium* germplasm for nitrogen fixation. MS Thesis, Virginia State University.
- Robinson, K. O., D. A. Beyene, P. van Berkum, R. Knight-Mason, and H. L. Bhardwaj.** 2000. Variability in plant-microbe interaction between *Lupinus* lines and *Bradyrhizobium* strains. *Plant Science.* **159**, 257-264.

- Rome, S., M. P. Fernandez, B. Brunel, P. Normand, and J. C. Cleyet-Marel.** 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **46**, 972-980.
- Ross, I. S.** 1993. Membrane transport processes and response to heavy metals. In *Stress Tolerance of Fungi*, ed. D. H. Jennings, pp: 97-125. Marcel Dekker, New York.
- Roth, L. E., and G. Stacey.** 1989. Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: The symbiosome membrane comes from three sources. *Eur. J. Cell. Biol.* **49**, 13-23.
- Roughley, R. J.** 1970. The influence of root temperature, *Rhizobium* strain and host selection on the structure and nitrogen-fixing efficiency of the root nodules of *Trifolium subterraneum*. *Ann. Bot.* **34**:631-646.
- Roughley, R. J., F. A. Wahab, and J. Sundram.** 1992. Intrinsic resistance to streptomycin and spectinomycin among root-nodule bacteria from Malaysian soils. *Soil Biol. Biochem.* **24**, 715-716.
- Roughley, R. J., L. G. Gemell, J. A. Thompson, and J. Brockwell.** 1993. The number of *Bradyrhizobium* sp (*Lupinus*) applied to seed and effect on the rhizosphere colonization, nodulation and yield of lupin. *Soil. Biol. Biochem.* **25**, 1453-1458.
- Rüberg, S., Z. X. Tian, E. Krol, B. Linke, F. Meyer, Y. Wang, A. Pühler, S. Weidner, and A. Becker.** 2003. Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J. Biotechnol.* **106**, 255-68
- Sadowsky, M. J., P. B. Crega, and H. H. Keyser.** 1990. DNA hybridization probe for use in determining restricted nodulation among *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 fields isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1768-1774.
- Sahgal M. and B. N. Johri.** 2003. The changing face of rhizobial systematics. *Current Science* (84) No. **1**, 43-47.
- Saldana G., and V. Martinez-Alcantara.** 2003. Genetic diversity of fast growing rhizobia that nodulate soybean (*Glycine max* L. Merr). *Arch. Microbiol.* **180**, 45-52.
- Sawada H., and H. Ieki.** 1992. Phenotypic characteristics of the genus *Agrobacterium*. *Soc. Japan.* **58**, 37-45.
- Sawada H., H. Ieki, H. Oyaizu, and S. Matsumoto.** 1993. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised description for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 694-702.
- Sawada H., L. D. Kuykendall, and J. M. Young.** 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* (49) **3**, 155-179.
- Sawada, Y. Miyashita K., and T. Yokoyama.** 1990. Diversity within serogroups of Japanese isolates of *Bradyrhizobium* as indicated by intrinsic antibiotic resistance. *Soil Sci. Plant Nutr.* **30**, 501-504.
- Scharf, B., S. Wolff-Bühning, R. Rachel, and R. Schmitt.** 2001. Mutational analysis of the *Rhizobium Lupini* H 13-3 and *Sinorhizobium meliloti* flagellin genes: Importance of Fagellin A for flagellar filament structure and transcriptional regulation. *J. Bact.* **183**, 5334-5342.

- Schleifer, K. H., and O. Kandler.** 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**, 407-477.
- Schlinkert-Miller, M., and I. L. Pepper.** 1988. Physiological and biochemical characteristics of a fast-growing strain of lupin rhizobia isolated from the Sonaran Desert. *Soil Biol. Biochem.* **20**, 319-322.
- Schneider, M. and F. J. de Bruijn.** 1996. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. *W. J. Biotch.* **12**, 163-174.
- Schofield, P. R., A. H. Gibson, W. F. Dudman, and J. M. Watson.** 1987. Evidence for the genetic exchange and recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmids in a soil population. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2942-2947.
- Schofield, P. R., A. H. Gibson, W. F. Dudman, and J. M. Watson.** 1987. Evidence for the genetic exchange and recombination of *Rhizobium* symbiotic plasmids in a soil population. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2942-2947.
- Scholla, H. M., J. A. Moorefield, and H. E. Elkan.** 1990. DNA homology between species of the rhizobia. *Syst. Appl. Microbiol.* **13**, 288-294.
- Scholla, M. H., and G. H. Elkan.** 1984. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast growing species that effectively nodulates soybean. *Int. J. System. Bact.* **34**, 484-486.
- Scholla, M. H., J. A. Moorefield, and G. H. Elkan.** 1984. Deoxyribonucleic acid homology between fast-growing soybean-nodulating bacteria and other rhizobia. *Int. J. System. Bact.* **34**, 283-286.
- Schroeter, J.** 1886. p 1-814, in Cohn, F. (ed.) Kryptogamenflora von Schlesien, Band 3, Heft3, Pilze J. U. Kern's Verlag, Breslau.
- Schwinghamer, E. A.** 1967. Effectiveness of *Rhizobium* as modified by mutation for resistance to antibiotics. Antonie van Leeuwenhoek. *J. Microbiol. Serol.* **33**, 121-136.
- Segovia, L., D. Pinero, R. Palacios, and E. Martinez Romero.** 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 426-433.
- Segovia, L., J. P. W. Young, and Martinez-Romero.** 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 374-377
- Selander, R. K., D. A. Caugent, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour, and T. S. Whittam.** 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 873-884.
- Shalon D., S. J. Smith, and P. O. Brown.** 1996. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res.* **6**, 639-645.
- Sharples, G. J., and R. G. Lloyd.** 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucl. Acid Research.* **19**, 6503-6508.
- Sherwood, J. E., G. L. Truchet, and F. B. Dazzo.** 1984. Effect of nitrate supply on the in vivo synthesis and distribution of trifoliin A, a *Rhizobium trifolii*-binding lectin, in *Trifolium repens* seedlings. *Planta.* **126**, 540-547.
- Shishido, M., and I. L. Pepper.** 1990. Identification of dominant indigenous *Rhizobium meliloti* by plasmid profiles and intrinsic antibiotic resistance. *Soil Biol. Biochem.* **22**, 11-16.

- Silver, S.** 1992. Plasmid determined metal resistance mechanisms: Range and overview. *Plasmid* **27**, 1-3.
- Singleton P. W., El Swaify S. A., and B. B. Bohlool.** 1982. Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 884-890.
- Skerman, V. B. D., V. Mc Gowan, and P. H. A. Sneath.** 1980. Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 225-240.
- Slizak, W., and W. Piotrowski.** 1991. Response of *Rhizobium lupini* to some fungicides and antibiotics. *Phytopathologica Polonica.* **14**, 77-82.
- Smalla, K., E. Krogerrecklenfort, H. Heuer, W. Dejonghe, E. Top, and M. Osborn.** 2000. PCR-based detection of mobile genetic elements I total community DNA. *Microbiology.* **146**, 1256-1257.
- Smith, E. F., and C. O. Towsnd.** 1907. A plant-tumor of bacterial origin. *Science* **25**, 671-673.
- Sneath, P. H. A.** 1984. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, pp. 19 – 23. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore, USA: Williams & Wilkins.
- Somasegaran, P. and H. J. Hoben.** 1985. Methods in legume-*Rhizobium* technology, pp. 128-138. University of Hawaii, Honolulu.
- Somasegaran, P., V. G. Reyes, and H. J. Hoben.** 1984. The influence of high temperatures on the growth and survival of *Rhizobium* spp. in peat inoculants during preparation, storage and distribution. *Can. J. Microbiol.* **30**, 23-30.
- Spaink H. P.** 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 257-288.
- Spaink H. P., C. A. Wijffelman, E. Pees, R. J. H. Okker, and B. J. J. Lugtengerg.** 1987. *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature.* **328**, 337-340.
- Squartini A., P. Struffi, H. Döring, S. Seleka-Pobell, E. Tola, A. Giacomini, E. Vendramin, E. Velásquez, P. F. Mateos, E. Martinez-Molina, F. B. Dazzo, S. Casella, and M. P. Nuti.** 2002. *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly "*Rhizobium hedysari*"), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1267-1276.
- Stahl, D. A., and R. Amman.** 1991. Development and application of nucleic acid probes. In nucleic acid techniques in bacterial systematics. Edited by E. Stackebrandt and M. Goodfellow, Wiley, London.
- Sterner, J. P, and M. A. Parker.** 1999. Diversity and relationships of bradyrhizobia from *Amphicarpaea bracteata* based on partial nod and ribosomal sequences. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**, 387-392.
- Stougaard, J.** 2000. Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiol.* **124**, 531-540.
- Stowers M. D.** 1985. Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**, 89-108.
- Stowers M. D., and G. H. Elkan.** 1984. Gluconate catabolism in Cowpea rhizobia: evidence 111 for a Ketogluconate pathway. *Arch. Microbiol.* **137**, 3-9.
- Stowers, M. D., and A. R. J. Eaglesham.** 1984. Physiological and symbiotic characteristics of fast-growing *Rhizobium japonicum*. *Plant Soil.* **77**, 3-14.

- Sullivan, J. T., and Ronson, C. W.** 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500 kb symbiosis island integrates into a phe-rRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. **95**, 5145-5149.
- Sullivan, J. T., B. D. Eardly, P. van Berkum, and C. W. Roson.** 1996. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2818-2625.
- Sullivan, J. T., H. N. Patrick, W. L. Lowther, D. B. Scott, and C. W. Ronson.** 1995. Nodulation strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. **92**, 8985-8989.
- Suominen L., C. Roos, G. Lortet, L. Paulin, and K. Lindstrom.** 2001. Identification and structure of the *Rhizobium galegae* common nodulation genes: Evidence of horizontal gene transfer. *Mol. Biol. & Evol.* **18**, 907-916.
- Swiecicki, W., W. K. Swiecicki, and B. volko.** 1996. *Lupinus anatolicus*, a new species of the Old World. *Genet. Ressour. Crop Evol.* **43**, 109-117.
- Sy, A., E. Giraud, P. Jourand, N. Garcia, A. Willems, P. de Lajudie, Y. Prin, M. Neyra, M. Gillis, C. Boivin-Masson, and B. Dreyfus.** 2001. Methylo-trophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* **183**, 214-220.
- Szabolcs I.** 1986. Agronomical and ecological impact of irrigation on soil and water salinity. *Adv. Soil Sci.* **4**, 189-218.
- Tabor, C. W., and H. Tabor.** 1985. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* **49**, 81-99.
- Tan Z. Y., F. L. Kan, G. X. Peng, E. T. Wang, B. Reinhold-Hurek, and W. X. Chen.** 2001. *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 909-914.
- Tang, C., and A. D. Robson.** 1993. pH above 6.0 reduces nodulation in *Lupinus* species. *Plant Soil.* **152**, 269-276.
- Terefework, Z., G. Nick, S. Suomalainen, L. Paulin, and K. Lindström.** 1998. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 349-356.
- Terefework, Z., S. Kaijalainen, and K. Lindström.** 2001. AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae*. *J. Biotech.* **91**, 169-180.
- Teyssier, C., H. Marchandin, and E. Jumas-Bilak.** 2004. Le génome des alpha-protéobactéries : complexité, réduction, diversité et fluidité. *Can. J. Microbiol.* **6**, 383-387.
- Thami-Alami, I. J. Papineau, C. Huyghe, and C. Al Faiz.** 2004. Collection of the genus *Lupinus* in Morocco. Dans le développement des cultures fourragères; une nécessité pour améliorer les productions animaux et atténuer la dégradation des ressources naturelles, INRA Proceeding. Mars 2004. INRA. Rabat.
- Thami-Alami, I., and M. Bounejmate.** 1997. Lupins (*Lupinus* spp) In Jaritz et M. Bounejmate (ed.). Production et utilisation des cultures fourragères au Maroc. P: 198-204. INRA. Rabat.
- Tiller, K., R. Merry, and M. Mc Laughlin.** 1994. Cadmium: a modern day problem. *Rural Research.* **162**, 32-35.

- Toledo I., L. Lloret, and E. Martinez-Romero.** 2003. *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**, 54-64.
- Tomsett, A. B.** 1993. Genetics and molecular biology of metal tolerance in fungi. In *Stress Tolerance of fungi*, ed. D. H. Jennings, pp: 69-95. Marcel Dekker, New York.
- Tong, Z., and M. J. Sadowsky.** 1994. A selective medium for the isolation and quantification of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* strains from soils and inoculants. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 581-586.
- Trinick M. J., D. J. Goodchild, and C. Miller.** 1989. Localization of Bacteria and Hemoglobin in Root Nodules of *Parasponia andersonii* Containing Both *Bradyrhizobium* Strains and *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 2046-2055.
- Trinick, M. J.** 1980. Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *J. Appl. Bact.* **49**, 39-53.
- Trujillo, M. E., A. Willems, A. Abril, A. M. Planchuelo, R. Rivas, D. Ludena, P. F. Mateos, E. Martinez-Molina, and E. Velazquez.** 2005. "Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov." *Appl. & Environ. Microbiol.* **71**, 1318-1327.
- Tylor, K. D., G. Wang, S. D. Tyler, and W. M. Johson.** 1997. Factors affecting reliability and reproductibility of amplified – based DNA fingerprinting of representative pathogens. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 339-346.
- Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N., and Matsuguchi, T.** 1995. Phylogeny of Sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a *nodC* segment. *J. Bacteriol.* **177**, 468-472.
- Urtz, B. E., and G. H. Elkan.** 1996. Genetic diversity among *Bradyrhizobium* isolates that effectively nodulate peanut (*Arachis hypogaea*). *Can. J. Microbiol.* **42**, 1121-1130.
- van Berkum, P., and B. D. Eardly.** 1998. Molecular Evolutionary Systematics of the *Rhizobiaceae*. In: *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of plant-associated bacteria*. 1-24. (Spaink, H. P., A. Kondorosi and P. J. J. Hooykaas ed.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.
- van Berkum, P., and B. D. Eardly.** 2003. Impact of genomics on the reconstruction of evolutionary relationships of nitrogen-fixing bacteria and implications for taxonomy, p. 1-21. In R. Palacios and W. E. Newton (ed.), *Nitrogen fixation: 1888-2001*. VI. Genomes and genomics of nitrogen-fixing organisms. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- van Berkum, P., and J. J. Fuhrman.** 2000. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from the 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 2165-2172.
- van Berkum, P., D. Beyene, G. Bao, T. A. Campbell, and B. D. Eardly.** 1998. *Rhizobium mongolense* sp. nov. in one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen – fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **48**, 13-22.
- van Berkum, P., S. I. Kotob, H. A. Basit, S. Salem, E. M. Gewail, and J. S. Angle.** 1993. Genotypic diversity among strains of *Bradyrhizobium japonicum* belonging to serogroup 110. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3130-3133.

- van Berkum, P., Z. Terefework, L. Paulin, S. Suomalainen, K. Lindström, and B. D. Eardly. 2003. Discordant phylogenies with the *rrn* loci of rhizobia. *J. Bacteriol.* **185**, 2988-2998.
- van Rossum, D., A. Muyotcha, B. M. De Hope, H. W. Van Verseveld, A. H. Stouthamer, and F. C. Boogerd. 1994. Soil acidity in relation to groundnut-*Bradyrhizobium* symbiotic performance. *Plant Soil.* **163**, 165-175.
- van Rossum, D., F. P. Schuurmans, M. Gillis, A. Muyotcha, H. W. van Verseveld, A. H. Stotthamer, and F. C. Boogerd. 1995. Genetic and phenetic analysis of *Bradyrhizobium* strains nodulating Peanut (*Arachis hypogae* L.) roots. *Appl. Env. Microbiol.* **61**, 1599-1609.
- Vance C. P., M. A. Egli, S. M. Griffith, and S. S. Miller. 1998. Plant regulated aspects of nodulation and N₂-fixation. *Plant Cell Environment* **11** (5), 413-427.
- Vandamme P., J. Goris, W. M. Chen, P. de Vos, and A. Willems. 2003. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**, 507-512.
- Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. De Vos, K. Kersters, and J. Swings. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**, 407-438.
- Vanechoutte, M., R. Rossau, P. De Vos, M. Gillis, D. Janssens, N. Paepe, A. De Rouck, T. Fiers, G. Claeys, and K. Kersters. 1992. Rapid identification of bacteria of the *comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* **93**, 227-233.
- Velasquez, E., J. M. Igual, A. Williams, E. Murez, P. F. Mateos, A. Abril, N. Toro, P. Normand, E. Cervantes, G. Gillis, and E. Martinez-Romero. 2001. *Mesorhizobium Chocoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **51**, 1011-1021.
- Verma, D. P. S., and S. Long. 1983. The molecular biology of *Rhizobium*- legume symbiosis. International review and cytology, supplement, 14. pp 211-245. New York: Academic Press.
- Versalovic J. T., M. Schneider, F. J. de Bruijn, and J. R. Lupski. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* **5**, 25-40.
- Versalovic, J., and J. R. Lupski. 1998. Interspersed repetitive sequence in bacterial genomes. In *Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis*, pp. 437-454. Edited by F. J. de Bruijn, J. R. Lupski and G. M. Weinstock. New York: Chapman & Hall.
- Versalovic, J., F. J. de Bruijn, and J. R. Lupski. 1998. Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. In *Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis*, pp. 437-454. Edited by F. J. de Bruijn, J. R. Lupski and G. M. Weinstock. New York: Chapman & Hall.
- Versalovic, J., T. Koeuth, and J. R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6823-6831.
- Versalovic, J., T. Koeuth, Y. H. Zang, E. R. B. McCabe, and J. R. Lupski. 1992. Quality control for bacterial inhibition assays: DNA fingerprinting of microorganisms by rep-PCR. *Screening* **1**, 175-183.

- Vincent, J. M.** 1970. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP handbook, no. 15. Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford, England.
- Vinuesa P., M. Leon-Barrios, C. Silva, A. Willems, A. Jarabo-Lorenzo, R. Perez-Galdona, D. Werner and E. Martinez-Romero.** 2005. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 569-575.
- Vinuesa, P., L. W. Rademaker, F. J. de Bruijn, and D. Werner.** 1998. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, Repetitive Extragenic Palindromic PCR genomic fingerprinting and partial 16S rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2096-2104
- Vos, P., R. Hogers, M. Beeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau.** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4407-4414.
- Wang E. T., P. Van Berkum, D. Beyene, X. H. Sui I., O. Dorado, W. X. Chen, and E. Martinez-Romero.** 1998. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* which has a close phylogenetic relationships with *Rhizobium galegae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1023-1026.
- Wang, E. T., and E. Martinez-Romero.** 2000. *Sesbania herbacea*-*Rhizobium huautlense* nodulation in flooded soils and comparative characterization of *S. herbacea*-nodulating rhizobia in different environments. *Microb. Ecol.* **40**, 25-32.
- Wang, E. T., P. Van Berkum, X. H. Sui, D. Beyene, W. X. Chen, and E. Martinez-Romero.** 1999a. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorpha* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **49**, 51-65.
- Wang, L. X., M. Antonio Rogel, A. G. los Santos, J. Martnez-Romero, M. A. Cevallos, and E. Martinez-Romero.** 1999b. *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from Mimosa affinis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **49**, 1475-1491.
- Wang, L. X., Z. Y. Ta, A. Willems, M. Fernandez-lópez, B. Reinhold-Hurek, and E. Martinez-Romero.** 2002. *Sinorhizobium morolense* sp. nov., a *leucaena leucocephala* – associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1687-1693.
- Weaver, R. W., and L. R. Frederick.** 1982. *Rhizobium*. In Methods of Soil Analysis. Part2-Chemical and Microbiological Properties, 2nd ed. (A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Keeny, Eds), pp. 1043-1070. Am. Soc. Argonomy.
- Weber, D. F., H. H. Keyser, and S. L. Uratsu.** 1989. Serological distribution of *Bradyrhizobium japonicum* from U.S. soybean production areas. *Agron. J.* 786-789.
- Wei, G. H., E. T. Wang, Z. Y. Tan, M. E. Zhu, and W. X. Chen.** 2002. *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 2231-2239.
- Wei, G. H., Z. Y. Tan, M. E. Zhu, E. T. Wang, S. Z. Han, and W. X. Chen.** 2003. Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and

- Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium Loessense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1575-1583.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lae.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol* **173**, 697-703.
- Welsh, J., and M. McClelland.** 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 7213-7218.
- Wernegreen, J. J., and M. A. Riley.** 1999. Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 98-113.
- Wetzel, A., and D. Werner.** 1995. Ecotoxicological evaluation of contaminated soil using the legume root nodule symbiosis as effect parameter. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **10**, 127-134.
- Whipps J. M.** 1990. Carbon economy. In *The Rhizosphere*. J.M. Lynch Ed., John Wiley and Sons, Chester, p 59-97.
- Wiesniewski, J. P., and F. M. Delmote.** 1996. Modulation of carbohydrate-binding capacities and attachment ability of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) to white lupine roots. *Can. J. Microbiol.* **42**, 234-242.
- Willems, A., and M. D. Collins.** 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 305-315.
- Willems, A., M. Fernández-Lopez, E. Minos-Adelantado, P. De Vos, E. Martínez-Romero, N. Y. Toro, and M. Gillis.** 2003. Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *adhaerens* Cassida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* com.nov. Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1207-1217.
- Willems, A., R. Coopman, and M. Gillis.** 2001b. Comparison of sequences analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis, and DNA-DNA hybridization in *Bradyrhizobium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **51**, 623-623.
- Willems, A., R. Coopman, and M. Gillis.** 2001c. Phylogenetic analysis and DNA-DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **51**, 111-117.
- Willems, A., F. Doignon-Bourcier, J. Goris, R. Coopman, P. de Lajudie, and M. Gillis.** 2001a. DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1315-1322.
- Williams, M.** 1993. Lupin blight. *Forest pathology in New Zealand*. No. 22. New Zealand Forest Research Institute, Rotorua, New Zealand.
- Wilson D. O., and H. M. Reisenauer.** 1970. Effect of Manganese and Zinc Ions on the Growth of *Rhizobium*. *J Bacteriol.* **102**, 729-732.
- Wilson, J. K.** 1944. Over five hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of legumes. *Soil Sci.* **58**, 61-69.
- Wilson, K.** 1989. Preparation of genomic DNA from bacteria, pp. 2.4.1-2.4.5. In *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. eds). Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.
- Wink, M.** 1993. Allelochemical properties and the raison d'être of alkaloids. In *The Alkaloids*, G. Cordell (ed.), vol. 43: 1-117, Academic press.

- Woese C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* **512**, 221-71.
- Wong, F. Y., K. E. Stackebrandt, J. K. Ladha, D. E. Fleischman, R. A. Date, and J. A. Fuerst.** 1994. Phylogenetic analysis of *Bradyrhizobium japonicum* and photosynthetic stem-nodulating bacteria from *Aeschynomene* species grown in separated geographical regions. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 940-512.
- Wood, M., J. E. Cooper, and A. J. Bjourson.** 1988. Response of Lotus rhizobia to acidity and aluminum in liquid culture and in soil. *Plant Soil.* **107**, 227-231.
- Woronin, M. S.** 1866. Über die bei der Schwarzerle (*Alnus glutinosa*) und bei der gewöhnlichen Gartenlupine (*Lupinus mutabilis*) auftretenden Wurzelanschwellungen. Mémoires de l'Académie Impériale des Sciences de St. Pétersbourg, VII Series, vol. X.
- Xu, L. M., C. Ge, Z. Cui, J. Li, and H. Fan.** 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 706-711.
- Yadav, N. K., and S. R. Vyas.** 1971. Response of root nodule bacteria to saline, alkaline and acid conditions. *Indian J. Agric. Sc.* **41**, 875-881.
- Yadav, N. K., and S. R. Vyas.** 1973. Salt and pH tolerance of rhizobia. *Folia Microbiologica* **18**, 242-247.
- Yanagi, M., and K. Yamasato.** 1993. Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* **107**, 115-120.
- Yao, Z. Y., F. L. Kan, E. T. Wang, G. H. Wei, and W. X. Che.** 2002. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **52**, 2219-2230.
- Young, J. M.** 2004. Renaming of *Agrobacterium larrymoorei* Bouzar and Jones 2001 as *Rhizobium larrymoorei* (Bouzar & Jones, 2001) comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 149.
- Young, J. M., L. D. Kuykendall, E. Martinez-Romero, A. Kerr, and H. Sawada.** 2003. Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium* - a reply to Farrand et al. (2003). *Int J Syst Evol Microbiol.* **53**, 1689-1695
- Young, J. M., L. D. Kuykendall, E. Martinez-Romero, A. Kerr, and H. Sawada.** 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **51**, 89-103.
- Young, J. P. W.** 1985. *Rhizobium* population genetics: enzyme polymorphism in isolates from peas, clover, beans, and lucerne grown at the same site. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 2399-2408.
- Young, J. P. W., and K. E. Haukka.** 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* **133**, 87-94.
- Young, J. P. W., H. L. Downer, and B. D. Eardly.** 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bact.* **173**, 2271- 2277.
- Younis, M.** 2002. Nodulation and Nitrogen fixation by *Lupinus varius* L. a wild type of lupine grown in the southern part of the eastern desert of Egypt under different water regimes. *Online J. Biol. Sc.* **9**, 596-600.

- Zablotowicz, R. M. and D. D. Focht.** 1981. Physiological characteristics of cowpea rhizobia evaluation of symbiotic efficiency in *Vigna unguiculata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 679-685.
- Zahran, H. H.** 1991. Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. *Biol. Fertil. Soils.* **12**, 73-80.
- Zahran, H. H.** 1999. *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 968-989.
- Zahran, H. H., L. A. Räsänen, K. Karsisto, and K. Lindström.** 1994. Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-Page of rhizobia by osmotic and heat stress. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 100-105.
- Zerhari K., J. Aurag, B. Khbaya, D. Kharchaf, and A. Filali-Maltouf.** 2000. Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating *Acacia* species in the arid and Saharan regions of Morocco. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**, 351-357.
- Zhang, F., and D. L. Smith.** 1996. Inoculation of soybean (*Glycine max* L. Merr.) with genistein-preincubated *Bradyrhizobium japonicum* or genistein directly into soil increases soybean protein and dry matter yield under short season conditions. *Plant Soil.* **179**, 233-241.
- Zhang, F., T. C. Charles, B. Pan, and D. L. Smith.** 1996. Inhibition of the expression of *Bradyrhizobium japonicum nod* genes at low temperatures. *Soil Biol. Biochem.* **28**, 1579-1583.
- Zhang, X., M. Karsisto and K. Lindström.** 1992. Assessment of the competitiveness of fast-growing rhizobia infecting *Acacia Senegal* using antibiotic-resistance and melanin production as identification markers. *W. J. Microbiol. Biotech.* **8**, 199-205.
- Zhang, X.-X., B. Kosier, and U. B. Priefer.** 2001. Genetic diversity of indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolates nodulating two different host plants during soil restoration with alfalfa. *Mol. Ecol.* **10**, 2297-2305.
- Zhang, X.-X., R. Harper, M. Karsisto, and K. Lindström.** 1991. Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from root nodules of leguminous trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 104-113.
- Zuanazzi, J. A. S., Clergeot, P. H., Quirion, J.-C., Husson, H. P., Kondorosi, A., and Ratet, P.** 1998. Production of *Sinorhizobium meliloti nod* gene activator and repressor flavonoids from *Medicago sativa* roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 784-794.

ANNEXE 1

Paramètres climatiques des sites échantillonnés

Localité des sites d'échantillonnage	Numéro de la station	Altitude	Pluviométrie
M' nasra	1	15	500
24 Km de Rabat vers Kénitra	2	50	500
15 Km de souk Larbâa vers Kénitra	3	30	594
30 Km de Kénitra vers Larache	4	10	500
près du IAV, Rabat	5	50	523
entre IAV et la Ceinture verte, Rabat	6	55	523
près de la Ceinture verte, Hay Riad, Rabat	7	60	523
Ceinture verte, Hay Riad, Rabat	8	65	523
Ourika, Marrakech	9	800	400
Asni, Marrakech	10	-	-
10 Km de Kenitra vers My bouselham	11	50	500
Sidi Yahya du Gharb	12	25	530
67 Km de Rabat vers Larache	13	50	500
87 Km de Rabat vers Larache	14	50	500
75 Km de Larache vers Tétouan	15	40	550
62 Km de Larache vers Tétouan	16	610	1000
1 Km avant le branchement Tanger-Tétouan - Sidi Yamani	17	1000	380
5 Km de bab Taza vers Chefchaouen	18	60	600
8 Km de babTaza vers bab Berred	19	600	600
1 Km de Cherafat vers bab Taza	20	600	600
Dardara	21	60	600
point 154 Km de Rabat à Larache	22	55	600

ANNEXE 2

Composition du milieu YEM

Mannitol : 2,5g

Extrait de levure : 0,35g

$K_2HPO_4, 3H_2O$: 0,46g

KH_2PO_4 : 0,12g

$MgSO_4, 7H_2O$: 0,46g

NaCl : 0,1g

Agar : 15g

Stériliser à 121°C pendant 20min.

ANNEXE 3

Coloration de gram

- 1- Déposer une goutte d'eau sur une lame bien propre
- 2- Prélever un échantillon de colonie à l'aide d'un pique en bois et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
- 3- Couvrir le frottis par du violet de gentiane pendant 60 secondes
- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
- 5- Couvrir de lugol pendant 30 secondes
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 7- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone ou avec de l'éthanol en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette
- 8- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 9- Couvrir avec de la fuschine (ou safranine) pendant 60 secondes
- 10- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes et mettre la lame inclinée sur du papier absorbant
- 11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

Les cellules Gram+ absorbent la couleur du violet de gentiane et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

ANNEXE 4

Composition du milieu ½ TY

Tryptone : 2,5g

CaCl₂ : 0,35g

Extrait de levure : 1,5g

Agar : 12g

Stériliser à 121°C pendant 20min.

ANNEXE 5

Préparation des solutions du tampon de lyse

- Solution de SDS 10% : dissoudre 2g de SDS dans 16ml H₂O sous agitation magnétique, compléter à 20ml avec du H₂O.

- Solution de NaOH 5N : dissoudre 5g de NaOH dans 16ml H₂O sous agitation magnétique, compléter à 20ml avec du H₂O.

Préparer une solution de NaOH 0,1N et 0,5% SDS en prélevant 10µl de NaOH 5N et 25µl de SDS 10% et compléter avec de l'eau bidistillée stérile à 500µl.

Le mélange doit être à chaque fois fraîchement préparé.

ANNEXE 6

Composition du tampon Tris-EDTA (10 :1)

Préparer des solutions de 1M Tris (pH 8,0) et 0,5M EDTA.

Pour une solution TE (10 :1), mélanger - 1ml de Tris 1M

- 200µl du EDTA 0,5M

- 988µl d'eau bidistillée stérile

Stériliser à 121°C pendant 20min. et conserver à température ambiante.

ANNEXE 7

Composition du tampon de charge

Préparer en mélangeant les composés suivants :

- 0,25% bleu de bromophénol
- 50% glycérol
- 50% TE (10 :1)

Conserver à -20°C.

ANNEXE 8

Composition du tampon Tris – Borate – EDTA (solution 10x concentrée)

Préparer en mélangeant:

- 109g de Tris
- 55,7g d'acide borique
- 9,3g du EDTA

Mélanger les différents poids dans 1 litre H₂O bidistillée, Stériliser à 121°C pendant 20min. et conserver à température ambiante.

ANNEXE 9

Préparation du Bromure d'Ethidium (1mg/ml)

Dissoudre 10mg de Br Eth. Dans 10ml d'eau bidistillée. Mettre la préparation dans une bouteille noire ou envelopper avec du papier aluminium.

Conserver à température ambiante ou à 4°C.

Attention : ce produit est très cancérigène, mettre des gants et un masque avant toute manipulation en évitant les courants d'air car la poudre est très légère.

ANNEXE 10

Composition de la solution nutritive sans azote

Solution	Produit	Elément	Quantité (g/l)
1	CaCl ₂ , 2H ₂ O	Calcium	294,10
2	KH ₂ , PO ₄	Phosphore	136,10
3	MgSO ₄ , 7H ₂ O	Magnésium	194,21
	K ₂ SO ₄	Potassium	87,00
	MnSO ₄ , H ₂ O	Manganèse	0,338
4	H ₃ BO ₃	Bore	0,247
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	Zinc	0,288
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	Cuivre	0,1
	CoSO ₄ , 7H ₂ O	Cobalt	0,056
	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	Molybdène	0,048
5	Na ₂ FeEDTA	Fer	6,48

Prendre 5ml de chaque solution 1 à 5 et les mélanger dans 5 litres d'eau distillée. Le pH doit être ajusté entre 6,6 et 6,8 avec du NaOH 1N. Compléter ensuite le volume jusqu'à 10 litres. Pour la solution nutritive azotée, ajouter du KNO₃ à 0,05% (w/v) de la solution nutritive préparée.

ANNEXE 11

Préparation de la solution du BTB

Mélanger 0,5g de BTB dans 100ml d'éthanol, puis stériliser le mélange par filtration.

Conserver cette solution à 4°C.

Ajoutez 5ml de la solution dans 1 litre de YEM préalablement stérilisé.

La concentration finale du BTB dans le milieu est de 25ppm.

ANNEXE 12

Méthode de préparation des solutions d'antibiotiques et leur mode d'action

Antibiotique	Solubilité dans	Stockage	Mode d'action
Tétracycline	70% Ethanol	-20°C	Inhibe l'élongation en bloquant l'attachement de l'ARNt au ribosome
Spectinomycine	H ₂ O	0 – 5°C	Inhibe l'élongation en bloquant la translocation peptidique par l'ARNt
Streptomycine	H ₂ O	0 – 5°C	Inhibe la synthèse des protéines par attachement au niveau des sous unités ribosomiques 12/30S
Chloramphénicol	Méthanol	Température ambiante ou 0 – 5°C	Inhibe l'élongation en bloquant l'étape de la transpeptidation
Kanamycine	H ₂ O	0 – 5°C	Inhibition de la translocation par attachement au niveau des sous unités ribosomiques 30/70S
Erythromycine	70% Alcool	Température ambiante	Inhibition au niveau de l'étape de transpeptidation
Ampicilline	H ₂ O	0 – 5°C	Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne
Acide nalidixique	0,35 N NaOH	0 – 5°C	Inhibition de la synthèse de l'ADN par inhibition de la gyrase

ANNEXE 13

Profil d'assimilation de 49 substrats carbonés par les souches nodulant le lupin

	MSMC511	MSMC513	MSMC514	MSMC515	MSMC516	MSMC517	MSMC518
Control	0	0	0	0	0	0	0
Glycérol	1	1	1	1	1	1	1
Erythritol	0	1	0	0	1	0	0
D-Arabinose	1	1	0	0	1	0	0
L-Arabinose	1	1	1	1	1	1	1
Ribose	1	1	1	1	1	1	1
D-Xylose	1	1	0	1	1	1	1
L-Xylose	0	0	0	0	0	0	0
Adonitol	1	1	0	0	1	0	0
β-Methyl Xylose	1	1	0	0	0	0	0
Galactose	1	1	1	1	1	1	1
D-Glucose	1	1	0	1	1	1	1
D-Fructose	1	1	1	1	1	1	1
D-Mannose	1	1	0	1	1	1	1
L-Sorbose	0	0	0	0	0	0	0
Rhamnose	1	1	0	1	1	1	1
Dulcitol	1	1	0	0	1	0	0
Inositol	1	1	0	0	1	0	0
Mannitol	1	1	1	1	1	1	1
Sorbitol	1	1	0	1	1	1	1
α-Methy D-mannoside	0	0	0	0	0	0	0
α-Methy D-glucoside	1	1	0	0	1	1	1
N acetyl glucosamine	1	1	1	1	1	1	1
Amygdaline	0	1	0	0	1	1	1
Arbutine	1	1	0	0	1	1	1
Esculine	1	1	1	0	1	1	1
Salicine	0	0	0	0	0	1	1
Cellobiose	1	1	0	1	1	1	1
Maltose	1	1	1	0	1	1	1
Lactose	1	1	0	0	1	0	0
Mellibiose	1	1	0	1	0	1	1
Saccharose	1	1	0	1	0	1	1
Trehalose	1	1	1	1	0	1	1
Inuline	0	0	0	0	0	0	0
Melezitose	1	1	0	0	0	0	0
D-raffinose	1	1	0	0	1	1	1
Amidon	0	0	0	0	0	0	0
Glycogene	0	0	0	0	0	1	0
Xylitol	1	1	0	0	0	0	0
β-Gentiobiose	1	1	0	0	1	1	1
D-turanose	1	1	0	0	1	0	0
D-lyxose	1	1	0	1	1	1	1
D-tagatose	1	1	0	0	0	0	0
D-fucose	1	1	0	0	0	0	0
L-fucose	1	1	0	0	1	1	1
D-arabinose	1	1	1	1	1	0	0
L-arabitol	1	1	0	0	1	0	0
Gluconate	1	1	1	1	1	1	1
2ceto-gluconate	1	1	1	1	1	1	1
5ceto-gluconate	1	0	0	0	1	1	0

MSMC5110	MSMC5111	MSMC5112	MSMC5113	MSMC5114	MSMC5115	MSMC5116	MSMC5119
0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	1	1	0	0
0	0	0	0	1	1	1	0
0	0	0	0	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	0	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	1	0
0	1	0	0	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	0	0	0	0	0
1	1	1	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	1	1	0
0	1	1	0	1	0	0	0
1	1	1	0	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	1	1	1	0
1	1	1	0	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	1	1	0
1	1	1	0	1	1	1	0
0	0	0	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	1	0
1	1	1	0	1	1	1	0
1	0	0	1	1	1	1	1
0	0	0	0	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	0

MSMC5123	MSMC5126	MSMC5127	MSMC5133	MSMC5142	MSMC5143	MSMC5150	MSMC5155
0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	0	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	0	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	1	1	1	1	1
1	0	0	1	1	0	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	0	0	1	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	0	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	1	1	0	0
0	1	1	0	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	1	1	1	0
0	1	1	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	0	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	0	0	1	1	0
0	0	0	0	1	0	0	0
0	1	0	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	1	1	0
1	1	1	1	0	0	1	1
0	1	0	0	0	1	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	0	0	0	1	1	0

MSMC5156	INRAL15	INRAL16	INRAL17	INRAL21	INRAL23	INRAL29	INRAL211	INRAL212	MSMC532
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
0	1	0	0	1	1	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	0	0	1	1	1	0	0	0
0	1	0	0	1	1	1	0	0	0
0	1	0	0	1	1	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	0	0	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	0	0	0	1	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0	1	0	1	1	1	1	1	0	0
0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
0	0	1	1	1	1	1	0	1	0
0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
0	1	0	0	1	1	1	0	0	0
0	0	1	1	0	1	1	0	1	0
0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
0	1	0	0	1	1	0	0	0	0

MSMC536	MSMC539	MSMC5319	MSMC5326	MSMC5328	INRAL32	MSMC549	MSMC5416	MSMC5419
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	1	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	0	0	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	1
1	0	1	1	0	1	1	1	1
0	0	0	1	0	0	1	1	1
0	0	0	1	0	1	1	1	1
1	0	0	1	0	1	1	1	1
0	0	0	1	0	1	0	0	0
0	0	0	1	0	1	0	0	0
0	0	0	1	0	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	1	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0	1
0	0	0	0	0	1	0	0	1
0	0	1	0	0	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	1	1
1	1	1	0	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	0	1	0	0	1

MSMC547	MSMC541	MSMC5425	INRAL43	INRAL44	MSMC554	MSMC556	INRAL51	INRAL52	INRAL61
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1	0	0	1	1	0	1	0	0	0
0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	1	0	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
0	0	0	0	1	1	0	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	1	1	0	1	0	0	0
1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
0	1	1	1	1	0	1	0	0	1
1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
1	1	1	0	0	1	1	0	1	1

ANNEXE 14.

Tolérance des rhizobia nodulant le lupin à différentes concentrations du NaCl.

	Souches	NaCl (mM)										
		0	170	340	510	680	850	1020	1190	1360	1530	1700
<i>L. luteus</i>	MSMC 511	+++	+++	++	+	+	±	-	-	-	-	-
	MSMC 512	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	±	-
	MSMC 513	+++	+++	++	+	±	±	-	-	-	-	-
	MSMC 514	+++	+++	+	+	+	±	±	-	-	-	-
	MSMC 515	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	-	-
	MSMC 516	+++	+++	+	+	+	±	-	-	-	-	-
	MSMC 517	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	-
	MSMC 518	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	±	±	-
	MSMC 519	+++	+++	++	++	+	+	+	+	±	±	-
	MSMC 5110	+++	+++	++	++	+	±	-	-	-	-	-
	MSMC 5111	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	±	-
	MSMC 5112	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	±	-
	MSMC 5113	+++	+++	+	+	+	±	±	-	-	-	-
	MSMC 5114	+++	+++	+	+	±	-	-	-	-	-	-
	MSMC 5115	+++	+++	+	+	+	±	-	-	-	-	-
	MSMC 5116	+++	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	MSMC 5117	+++	+++	+	+	+	±	-	-	-	-	-
	MSMC 5118	+++	+++	+	+	+	±	±	-	-	-	-
	MSMC 5119	+++	+++	+	+	±	±	±	-	-	-	-
	MSMC 5120	+++	+++	+	+	±	-	-	-	-	-	-
	MSMC 5121	+++	+++	+	+	±	-	-	-	-	-	-
	MSMC 5122	+++	+++	+	+	+	±	-	-	-	-	-
	MSMC 5123	+++	+++	+	+	+	±	±	-	-	-	-
	MSMC 5124	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	±	±	±
	MSMC 5125	+++	+++	+	+	+	±	-	-	-	-	-
	MSMC 5126	+++	+++	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	MSMC 5127	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	-
	MSMC 5128	+++	+++	++	+	+	+	+	+	±	-	-
	MSMC 5129	+++	+++	++	+	+	+	-	-	-	-	-
	MSMC 5130	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	-
	MSMC 5131	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	±
	MSMC 5132	+++	+++	+	+	+	±	-	-	-	-	-
MSMC 5133	+++	+++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	
MSMC 5134	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+	±	-	
MSMC 5135	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	±	-	
MSMC 5136	+++	+++	+	+	+	±	-	-	-	-	-	
MSMC 5137	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	±	-	-	
MSMC 5138	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	±	-	
MSMC 5139	+++	+++	+++	++	++	+	+	±	±	±	-	
MSMC 5140	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	±	-	
MSMC 5141	+++	+++	+++	+++	++	+	++	+	+	+	-	
MSMC 5142	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	±	-	

+++ :très bonne croissance ; ++ : bonne croissance ; + : croissance normale ; - : pas de croissance

Souches	NaCl (mM)											
	0	170	340	510	680	850	1020	1190	1360	1530	1700	
<i>L. luteus</i>	MSMC 5143	+++	+++	++	+	+	+	±	±	±	±	-
	MSMC 5144	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	±	±	-
	MSMC 5145	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	±	-	-
	MSMC 5146	+++	+++	++	+	+	+	±	±	±	-	-
	MSMC 5147	+++	+++	+	+	+	+	±	±	±	-	-
	MSMC 5148	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	±	-
	MSMC 5149	+++	++	+	+	±	±	-	-	-	-	-
	MSMC 5150	+++	++	+	+	±	±	-	-	-	-	-
	MSMC 5151	+++	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-
	MSMC 5152	+++	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
	MSMC 5153	+	±	±	±	±	±	±	±	±		-
	MSMC 5154	+++	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
	MSMC 5155	+++	+	±	±	±	±	-	-	-	-	-
	MSMC 5156	+++	+	±	±	±	±	-	-	-	-	-
	MSMC 5157	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	±	-	-
	MSMC 5158	+++	++	+	±	±	-	-	-	-	-	-
	MSMC 5159	+++	+++	+++	+	+	+	±	-	-	-	-
	MSMC 5160	+++	+++	+++	++	+	+	+	±	-	-	-
	INRA L11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	±
	INRA L12	+++	+++	+++	+++	++	±	-	-	-	-	-
INRA L13	+++	+++	+++	+++	++	++	±	±	±	±	±	
INRA L14	+++	+++	++	++	++	±	±	±	±	±	±	
INRA L15	+++	++	++	++	++	++	++	++	±	±	±	
INRA L16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	±	-	
INRA L17	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	±	-	-	
INRA L18	+++	+++	+++	++	++	±	±	±	±	-	-	
INRA L19	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	±	±	
<i>L. albus</i>	MSMC 521	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
	MSMC 522	+++	+++	+++	++	++	+	±	-	-	-	-
	INRA L21	+++	+++	+++	+++	++	±	±	±	±	±	-
	INRA L210	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	±	±	-
	INRA L211	+++	+++	+++	++	++	±	±	±	±	-	-
	INRA L212	+++	++	±	±	±	±	±	±	-	-	-
	INRA L213	+++	++	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	INRA L23	+++	++	±	±	±	±	±	±	±	±	-
	INRA L24	+++	++	±	±	±	-	-	-	-	-	-
	INRA L26	+++	+++	+++	+++	++	±	-	-	-	-	-
	INRA L27	+++	+++	++	±	±	-	-	-	-	-	-
	INRA L28	+++	+++	++	±	±	-	-	-	-	-	-
	INRA L29	+++	++	++	±	±	-	-	-	-	-	-

Souches	NaCl (mM)										
	0	170	340	510	680	850	1020	1190	1360	1530	1700
<i>L. angustifolius</i> MSMC 531	+++	++	+	±	-	-	-	-	-	-	-
MSMC 532	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MSMC 533	+++	++	+	+	±	±	-	-	-	-	-
MSMC 534	+++	++	+	+	±	±	-	-	-	-	-
MSMC 535	+++	++	+	+	+	±	-	-	-	-	-
MSMC 536	+++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MSMC 537	+++	++	+	+	+	±	-	-	-	-	-
MSMC 538	+++	++	+	+	+	±	±	-	-	-	-
MSMC 539	+++	++	+	+	+	+	+	±	-	-	-
MSMC 5310	+++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	-
MSMC 5311	+++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	-
MSMC 5312	+++	++	+	+	±	±	-	-	-	-	-
MSMC 5313	+++	++	+	±	±	±	-	-	-	-	-
MSMC 5314	+++	++	+	±	±	±	-	-	-	-	-
MSMC 5315	+++	++	+	+	±	±	±	-	-	-	-
MSMC 5316	+++	++	+	+	+	+	+	+	-	-	-
MSMC 5317	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MSMC 5318	+++	++	+	+	±	±	±	-	-	-	-
MSMC 5319	+++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	-
MSMC 5320	+++	++	++	++	+	+	+	+	±	±	-
MSMC 5321	+++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-
MSMC 5322	+++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-
MSMC 5323	+++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-
MSMC 5324	+++	++	++	+	+	+	±	-	-	-	-
MSMC 5325	+++	++	++	+	+	+	±	-	-	-	-
MSMC 5326	+++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MSMC 5327	+++	++	+	+	+	+	±	-	-	-	-
MSMC 5328	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MSMC 5329	+++	++	+	+	+	±	-	-	-	-	-
MSMC 5330	+++	++	+	+	±	-	-	-	-	-	-
MSMC 5331	+++	++	+	+	+	+	±	-	-	-	-
MSMC 5332	+++	++	++	+	+	+	+	-	±	-	-
MSMC 5333	+++	++	++	+	+	+	±	-	-	-	-
MSMC 5334	+++	++	++	++	+	+	+	+	±	-	-
INRA L31	+++	++	++	±	±	±	-	-	-	-	-
INRA L32	+++	+++	+++	+++	++	±	±	±	±	±	-
INRA L33	+++	+++	++	±	±	-	-	-	-	-	-
INRA L34	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	±	±	±
INRA L35	+++	+++	++	++	±	±	±	±	±	-	-
INRA L36	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	±	±
INRA L37	+++	+++	++	±	±	-	-	-	-	-	-
INRA L38	+++	++	±	±	±	-	-	-	-	-	-

	Souches	NaCl (mM)										
		0	170	340	510	680	850	1020	1190	1360	1530	1700
<i>L. cosentini</i>	MSMC 541	+++	+++	++	+	+	+	+	±	±	-	-
	MSMC 542	+++	+++	+	+	+	+	+	±	±	-	-
	MSMC 543	+++	+++	+	+	+	+	±	±	-	-	-
	MSMC 544	+++	+++	++	++	+	±	±	±	-	-	-
	MSMC 545	+++	+++	++	++	+	+	+	±	±	-	-
	MSMC 546	+++	+++	++	++	+	+	+	±	±	-	-
	MSMC 547	+++	+++	+	+	+	+	+	±	-	-	-
	MSMC 548	+++	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	MSMC 549	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	-
	MSMC 5410	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	-
	MSMC 5411	+++	+++	++	+	+	+	+	±	±	±	±
	MSMC 5412	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	+	±
	MSMC 5413	+++	+++	+	+	+	±	-	-	-	-	-
	MSMC 5414	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	±	-
	MSMC 5415	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	±	±	±
	MSMC 5416	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-
	MSMC 5417	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	±	-
	MSMC 5418	+++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
	MSMC 5419	+++	++	++	+	+	±	-	-	-	-	-
	MSMC 5420	+++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	MSMC 5421	+++	+	±	±	-	-	-	-	-	-	-
	MSMC 5422	+++	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-
	MSMC 5423	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	-	-	-
	MSMC 5424	+++	++	+	+	+	±	-	-	-	-	-
MSMC 5425	+++	+++	++	+	+	+	+	+	±	-	-	
INRA L41	+++	++	±	±	±	-	-	-	-	-	-	
INRA L42	+++	++	++	++	±	-	-	-	-	-	-	
INRA L43	+++	++	++	++	++	±	-	-	-	-	-	
INRA L44	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>L. pilosus</i>	MSMC 551	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	-	-	-
	MSMC 552	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	MSMC 553	+++	+++	++	++	+	+	+	+	±	±	-
	MSMC 554	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-	-
	MSMC 555	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	+	-
	MSMC 556	+++	++	+	±	-	-	-	-	-	-	-
	MSMC 557	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	±	-
	MSMC 558	+++	+++	++	++	±	±	±	-	-	-	-
	MSMC 559	+++	+++	++	++	±	±	±	-	-	-	-
	MSMC 5510	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	±	-
	MSMC 5511	+++	+++	++	++	+	±	±	-	-	-	-
	MSMC 5512	+++	+++	++	++	+	+	±	-	-	-	-
	INRA L51	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	±	±	±	-
	INRA L52	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. atlanticus</i>	INRA L61	+++	++	±	±	±	±	±	±	-	-	-

