

Impact de *Eucalyptus camaldulensis* sur la diversité des rhizobiums associés à *Acacia senegal* et *A. seyal* au Sénégal.

Abdoulaye SOUMARE^{1,2*}, Tahir DIOP^{1,2}, Ouahmane LAHCEN³, Gora BASSENE², Robin DUPONNOIS⁴, Ibrahima NDOYE^{1,2}

(¹) Département de Biologie Végétale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop, BP 5005, Dakar-Fann, Sénégal,

(²) LMI LAPSE (Adaptation des Plantes et microorganismes associés aux Stress Environnementaux), Laboratoire Commun de Microbiologie (LCM, IRD/ISRA/UCAD), Bel-Air BP 1386, CP 18524, Dakar-Senegal,,

(³) Laboratoire d'Ecologie et Environnement (URAC 32 associée au CNRST), Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc.

(⁴) CIRAD, UMR 113 CIRAD/INRA/IRD/SUPAGRO/UM2, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM), Montpellier, France.

Corresponding author: E-mail: ablaysoumare@yahoo.fr ; Fax: 33 849 33 02, Phone: 221 33 849 33 26, GSM: +221 77 502 27 22

Original submitted in on 30th May 2013 Published online at www.m.elewa.org on 30th July 2013.

RESUME

Objectif : Les rhizobiums sont des bactéries symbiotiques importantes pour le développement et l'adaptation des acacias aux contraintes environnementales. Cette étude avait pour objectif d'évaluer l'impact de *E. camaldulensis* sur la diversité des rhizobiums associés à *A. senegal* et *A. seyal*.

Méthodologie et résultats : La diversité des rhizobiums a été déterminée à partir de sols prélevés sous des plantations d'eucalyptus. Une suspension aqueuse de chaque sol a servi à inoculer de jeunes plantes d'acacia mises en culture dans des tubes Gibson. Au bout d'un mois, les nodules formés sur le système racinaire ont été récoltés, aseptisés et broyés. La région IGS des bactéries contenues dans chaque nodule a ainsi été amplifiée par PCR à l'aide d'amorces spécifiques. Les fragments amplifiés ont été séquencés et les séquences nucléotidiques obtenues ont permis de construire les arbres phylogénétiques. La diversité des rhizobiums dans les sols Sous Couvert (SC) et Hors Couvert (HC) a été calculée par l'indice de Shannon pour chaque plante piège. Les résultats obtenus montrent que les plantations de *E. camaldulensis* réduisent la diversité des rhizobiums associés aux acacias sahéliens mais l'effet varie selon la plante piège. Les bradyrhizobiums associés à *A. seyal* étaient majoritairement rencontrés dans les sols SC de *Eucalyptus* ; ce qui semble montrer un effet sélectif.

Conclusion et application de résultats : Cette étude a montré que *E. camaldulensis* impacte négativement sur la diversité des rhizobiums mais, le groupe des bradyrhizobiums semble être plus tolérant à l'effet *Eucalyptus* que les autres groupes de rhizobiums. Ces bactéries pourraient ainsi être utilisées pour la récupération des sols ayant servi à des plantations de *Eucalyptus*.

Mots clés : Diversité des Rhizobiums, Acacia, Impact de *Eucalyptus*.

Impact of *Eucalyptus Camaldulensis* on the diversity of rhizobia associated with *A. Senegal* and *Acacia seyal* in Senegal

ABSTRACT

Objective: Rhizobia, symbiotic bacteria are important for development and adaptation of Sahelian *Acacia* species. This study aimed to assess the impact of *E. camaldulensis* on the diversity of rhizobia associated with *A. senegal* and *A. seyal*.

Methodology and results: Rhizobia diversity was determined from soil collected under eucalyptus plantations and compared to control. An aqueous suspension of each soil was used to inoculate acacia seedlings grown in Gibson tubes. The nodules on the root system were harvested, sanitized and grind. The IGS region of bacteria was amplified by PCR using specific primers. The amplified fragments were sequenced and the nucleotide sequences obtained allowed us to construct phylogenetic trees. The diversity of rhizobia in SC (Under *Eucalyptus*) and HC (Control) soils was calculated by the Shannon index for each trap plant. The results show that plantations of *E. camaldulensis* reduce the diversity of rhizobia associated with Sahelian *Acacia*, but the effect depends on the trap plants. The bradyrhizobia associated with *A. seyal* were predominantly found in the SC soil, which seems to be a selective effect.

Conclusion and application of findings: It appears from this study that the plantations of *E. camaldulensis* reduce the diversity of rhizobia associated with Sahelian *Acacia* species. The bradyrhizobia group seems to be more tolerant to eucalyptus effect than other rhizobia groups. The study results suggest that these bacteria could be used for recovery of the areas which served to eucalyptus.

Key words: Diversity of rhizobia, *Acacia*, *Eucalyptus* Impact

INTRODUCTION

Les rhizobiums forment une symbiose avec les légumineuses (Frank, 1889) et cette association rhizobium-légumineuse permet la fixation biologique de l'azote moléculaire N₂. En effet, bien que l'atmosphère en contienne une réserve inépuisable, l'azote est un élément limitant la croissance des êtres vivants dans un écosystème. L'azote combiné directement assimilable par les organismes vivants ne représente que l'infime pourcentage de 0,001% de l'azote total de la biosphère (Newton, 1998). Ce paradoxe s'explique par l'incapacité de la plupart des organismes à utiliser directement l'azote moléculaire. Mais, les rhizobiums associés aux légumineuses possèdent cette aptitude. Cette fixation biologique de l'azote est possible grâce à leur complexe enzymatique, la nitrogénase, qui réduit le diazote (N₂) en ammonium selon la réaction suivante. L'intérêt écologique et agronomique de cette symbiose explique les études de la diversité et de l'efficacité des rhizobiums dans le but d'exploiter le potentiel symbiotique des sols pour une meilleure préservation et utilisation des ressources des écosystèmes sahéliens. C'est ainsi que la symbiose rhizobium-légumineuse est de plus en plus utilisée pour améliorer la croissance et la production de

gomme de *A. seyal* et particulièrement de *A. senegal* (Sarr et al., 2005 ; Faye et al., 2006 ; Herrmann et al., 2012).

De nombreux travaux ont mis en évidence une grande diversité des rhizobiums dans la zone sahélienne (Dreyfus et al., 1988 ; de Lajudie et al., 1998 ; Nick et al., 1999 ; Ba et al., 2002). Cette diversité expliquerait les potentialités d'adaptation des acacias à mieux se développer sur des sols pauvres et dégradés en milieu sahélien. Ces acacias constituent les espèces dominantes du parc arboré dans la zone sahélienne et présentent un intérêt tout particulier comme modèle d'étude d'écologie et de diversité des rhizobiums du fait de leur large répartition géographique. Cependant, l'introduction des espèces du genre *Eucalyptus* originaire de l'Australie, supposées plus productives que les essences locales dans la zone sahélienne a entraîné un mélange de *Eucalyptus* et acacias dans les parcs arborés. Ces plantations d'essences exotiques forestières peuvent impacter négativement sur la diversité des rhizobiums soit en réduisant leur nombre ou en modifiant leur répartition soit en limitant leurs performances symbiotiques (Moura et al., 1996 ; Santiago et al., 2002). Au Sénégal,

aucune étude d'impact sur la diversité des rhizobiums n'a été effectuée depuis l'introduction des *Eucalyptus* comme essence de reboisement. L'objectif de ce travail était ainsi d'évaluer l'effet de *E. camaldulensis* sur la diversité des rhizobiums

associés aux acacias sahéliens. Cette étude est sous tendue par l'hypothèse scientifique suivante : "*E. camaldulensis* en modifiant la composition chimique du sol va réduire la diversité des rhizobiums associés aux acacias sahéliens".

MATERIEL ET METHODES

Prélèvement du sol : Des prélèvements de sols ont été effectués dans quatre (4) plantations de *E. camaldulensis* (Tableau 1). Pour chaque plantation, cinq (5) points de prélèvements sous le houppier d'arbre de *E. camaldulensis* ont constitué un échantillon composite sous couvert (SC) et trois échantillons composites ont été formés par plantation. A chaque échantillon SC

correspond un échantillon témoin (HC), supposé non influencé par *E. camaldulensis* et situé à 20 m de la plantation. Les sols ont été prélevés entre l'horizon 0 et 30 cm et ont servi à déterminer la diversité des rhizobiums.

Tableau 1 : Coordonnées GPS des plantations étudiées et années de mis en place de chaque plantation

Zones agro écologiques	Lieu de prélèvements	Nom de la plantation	Année	coordonnées GPS
Niayes	Lompoul	Lompoul village	1982	17°07 N; 03°69 W
Vallée du Fleuve	Sinthiou Garba	Forêt régionale de Sinthiou	2003	17° 15N; 06° 82W
Vallée du Fleuve	Matam ville	Pépinière Régionale de Matam	1998	17°30N; 06° 87W
Sénégal Oriental	Tambacounda	Plantation villageoise	1983	15°23 N; 06°40W

Piégeage des rhizobiums : L'étape préalable à la caractérisation de la diversité des rhizobiums consiste à isoler les bactéries rhizosphériques à partir d'échantillons de sol, après piégeage sur une plante-hôte. Les sols HC et SC de chaque site ont ainsi été utilisés pour le piégeage des rhizobiums en tubes Gibson (Gibson, 1980). *A. senegal* et *A. seyal* ont servi de plantes pièges. Ces plantes pièges ont été repiquées individuellement dans des tubes Gibson contenant du milieu Jensen incliné stérile (Vincent, 1970). Pour chaque espèce et pour chaque type de sol (HC/SC), douze (12) répétitions ont été effectuées. Après quatre (4) jours de culture, les jeunes plants ont été ensuite inoculés avec 1 ml d'une suspension de sol provenant des sites d'échantillonnage (10 g de sol dans 90 ml d'eau physiologique). Les jeunes plantes en tubes ont ensuite été maintenues en chambre de culture à 28 °C, sous éclairage intermittent (16 heures de jour / 8 heures de nuit).

Isolement et conservation : Après 30 jours de culture, les nodules présents au niveau des racines ont été prélevés et aseptisés. Pour ce faire, les nodules ont été rincés à l'eau distillée, désinfectés superficiellement dans une solution d'hypochlorite de sodium (5 min) puis d'alcool 96% v/v (5 min). Après une série de rinçages à l'eau distillée stérile, chaque nodule a été broyé stérilement dans un tube Eppendorf de 1,5 ml contenant 200 µl d'eau distillée stérile. Chaque broyat de nodule a été ensemencé, avec une anse de platine, sur une boîte

de Petri contenant du milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) (Vincent, 1970). Les cultures ont été ensuite incubées à l'étuve à 30°C. Les isolats purs obtenus après plusieurs repiquages ont été conservés à -80°C dans du glycérol 60%.

Echantillonnage des nodules : Pour chaque espèce, les nodules ont été mélangés en un échantillon composite et pour chaque échantillon, nous avons pris 20 nodules tout en espérant obtenir au moins 10 à 15 isolats purs par type de sol. Les isolats obtenus ont été inoculés à la plante hôte afin de vérifier leur aptitude à former des nodules avant la caractérisation moléculaire.

Amplification et séquençage : La région intergénique 16S-23S rDNA (IGS) des bactéries a été choisie pour étudier la diversité des rhizobiums en raison de son pouvoir discriminant. Le couple d'amorces FGPS 1490-72 (5' - TGCGGCTGGATCACCTCCTT-3' ; Navarro *et al.*, 1992) et 23S-38 (5' -CCGGTTTCCCCATTCGG - 3' ; Ponsonnet et Nesme, 1994) a été utilisé pour les premières PCR (Polymerase Chain Reaction) mais suite à des problèmes d'amplification sur certaines souches, nous l'avons changé par le couple BR5 (5' - CTTGTAGCTCAGTTGGTTAG - 3' ; Willems *et al.*, 2001) et 23S-38 (5' -CCGGTTTCCCCATTCGG - 3' ; Rasolomampianina *et al.*, 2005). Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un thermocycleur <<GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer)>> selon la programmation suivante : dénaturation initiale de 5 min. à

94°C, suivi de 35 cycles de dénaturation (30 s à 94°C), d'hybridation (30 s à 55°C) et d'extension (à 72°C pendant 1 min), puis une extension finale à 72°C pendant 7 min. Les fragments amplifiés ont été contrôlés par électrophorèse sur gel agarose 1% puis purifiés à l'aide de QIAquick PCR Purification Kit ou QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Venlo, Pays-Bas). Ils ont été séquencés en sous-traitance à Genoscreen (Lille, France).

Correction et alignement des séquences : Les séquences nucléotidiques ont été vérifiées et au besoin corrigées manuellement à l'aide de Chromas Lite v2.01 (Technelysium Pty. Ltd., Tewantin, Australie), puis alignées à l'aide du logiciel ClustalX v1.8 (Thompson et al., 1997), les alignements étant recorrectés manuellement à l'aide de GeneDoc v2.7.000 (Nicholas et Nicholas, 1997). Un blast a été effectué pour comparer les

séquences obtenues avec des séquences de référence présentes dans la base de données de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les arbres phylogénétiques ont été construits par la méthode du maximum de vraisemblance avec le logiciel Mega 5.05. La robustesse des arbres a été testée par la méthode de bootstrap. Les valeurs de bootstrap ont été exprimées comme un pourcentage de 100 réplifications.

Analyse de la diversité par l'indice de Shannon : La diversité entre les sols SC et HC a été calculée par l'indice de Shannon (Shannon, 1962) donné par la formule : $H = - \sum p_i \log_2 p_i$ ou p_i correspond aux proportions des génotypes. Plus la valeur de cet indice est forte, plus le nombre de génotype de la population est important.

RESULTATS

Analyse de la diversité des rhizobiums associés à *A. seyal* en HC et SC de *E. camaldulensis* : Les résultats des isolements montrent que *A. seyal* est associé à trois genres de rhizobium: *Bradyrhizobium* (46.25%), *Mesorhizobium* (42.25%) et *Rhizobium* (11.25%) mais la répartition de ces genres varie selon le type de sol (HC/SC) (Tableau 2). En effet, dans les prélèvements SC, *A. seyal* est uniquement associé aux bactéries appartenant au genre *Bradyrhizobium* (85%) et au genre *Mesorhizobium* (15%). Par contre, dans les sols de prélèvement HC, il est associé aux bactéries appartenant aux genres *Mesorhizobium* (67.5%), *Rhizobium* (22.5%) et *Bradyrhizobium* (10%). Aucune bactérie appartenant au genre *Rhizobium* n'a été trouvée parmi les isolats obtenus à partir des sols SC. L'arbre phylogénétique montre une nette séparation des souches isolées en SC comparées à HC (Fig. 1). Les bradyrhizobiums isolés forment deux grands clusters dont l'un renferme (cluster 1) des souches qui sont proches de la souche type *Bradyrhizobium elkanii* LMG 6134^T (AJ279308). Le cluster 2 renferme des souches proches de

Bradyrhizobium japonicum LMG 6138^T(AF345255) et de *Bradyrhizobium sp.* STM 3078 (FJ012089) isolées de *Vigna unguiculata* en Cote d'Ivoire (N'Zoue et al., 2010). Les souches de *Mesorhizobium* isolées de *A. seyal* sont divisées en deux clusters (cluster 3 et 4). Le cluster 3 contient des souches proches de la souche *Mesorhizobium* CIRADF269 (AY458138) isolée en Mauritanie (Sarr et al., 2005). Le cluster 4 comprend trois sous groupes dont un sous groupe présentant une forte similarité avec *Mesorhizobium* ORS3576 (JQ606815) isolé au Sénégal sur *A. senegal*, le deuxième sous groupe est proche de *Mesorhizobium* ORS3610 (JQ606823) et le dernier est proche de *Mesorhizobium plurifarum* ORS 3604(JQ606823) (Bakhoum et al., 2012). Les bactéries du genre *Rhizobium* isolées se repartissent en deux clusters (cluster 5 et 6) dont l'un contient (cluster 5) une souche proche de *Rhizobium leguminosarum bv. Viciae* L165 (AY491955) isolées par Depret and Laguerre (2008) alors que l'autre cluster contient des souches proches de *Rhizobium hainanense* USDA 3588 (Kwon et al., 2005) et de *Agrobacterium vitis* (AB288343).

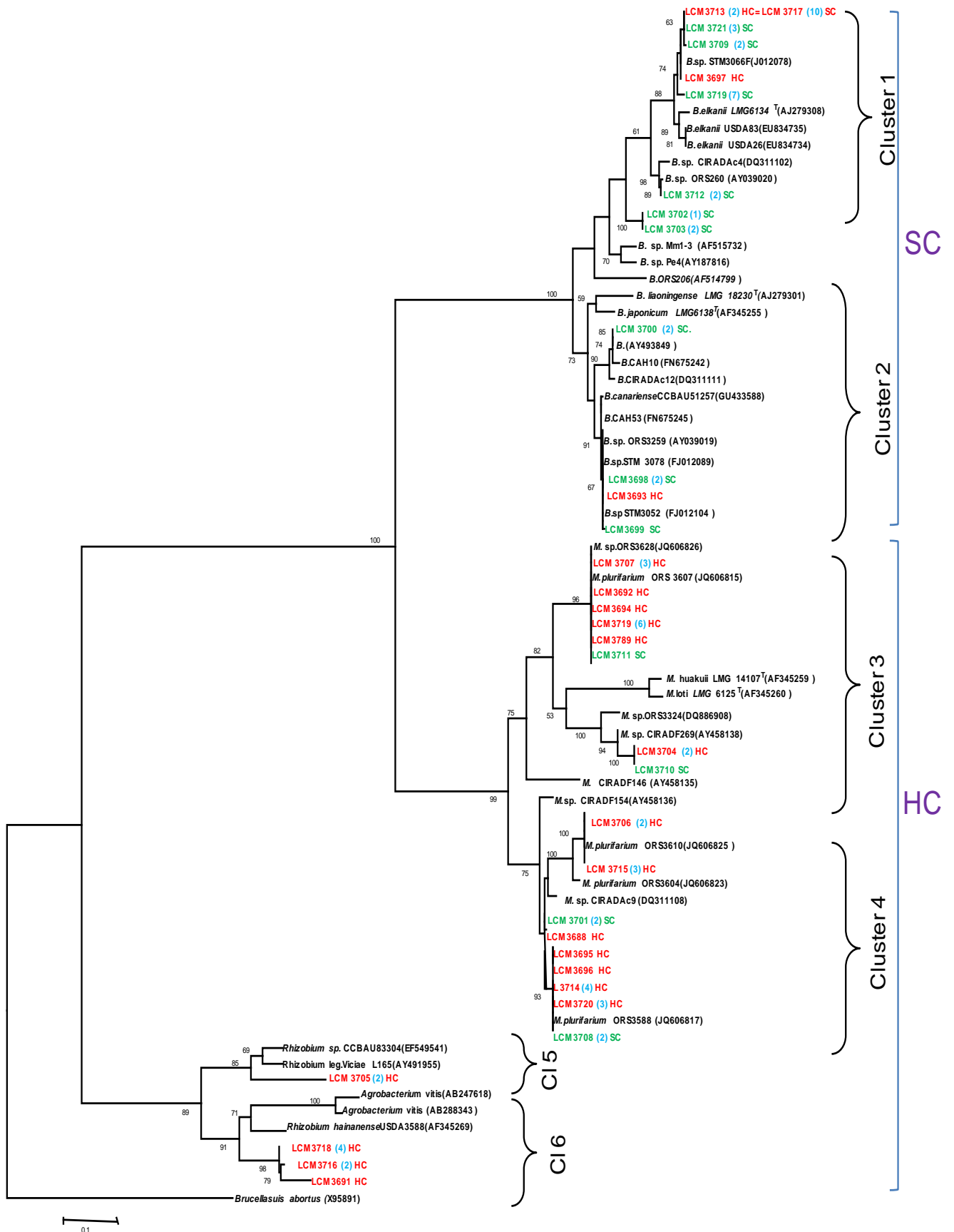


Figure 1 : L'arbre phylogénétique des souches de *A. seyal* obtenu par la méthode de maximum de vraisemblance. L'indice de fiabilité des nœuds a été obtenu sur 100 bootstraps. Seuls les nœuds à valeurs supérieures à 50% sont indiqués. Le nombre entre parenthèse indique le nombre de souches isolées ayant le même génotype ; HC et SC : hors couvert et sous couvert

Tableau 2 : Nombre de souches isolées dans les nodules formés sur les racines de *A. seyal* et pourcentage des genres rencontrés selon le type de sol

	Total		HC		SC	
	Nombre de souches	Proportion (%)	Nombre de souches	Proportion (%)	Nombre de souches	Proportion (%)
<i>Bradyrhizobium</i>	37	46,25	4	10	34	85
<i>Mesorhizobium</i>	34	42,25	29	67,5	6	15
<i>Rhizobium</i>	9	11,25	9	22,5	0	0
Total	80		40		40	

Analyse de la diversité des rhizobiums associés à *A. senegal* en HC et SC de *E. camaldulensis* : *A. senegal* est principalement associé aux genres *Mesorhizobium* (76%) et *Rhizobium* (20%). Le séquençage a révélé la présence de souches appartenant au genre *Burkholderia* dans les proportions de 4% (Tableau 3). Selon le type de sol, *A. senegal* s'associe aux genres *Mesorhizobium* et *Rhizobium* en HC comme en SC. Par contre, les bactéries appartenant au genre *Burkholderia* n'ont été isolées que dans les sols HC. L'arbre phylogénique ne montre pas de séparation nette entre les sols HC et SC, des souches appartenant au même genre se retrouvent indifféremment dans les deux types de sol (Fig. 2). Une grande partie des souches isolées de la plante hôte *A. senegal* sont regroupées dans le cluster 2 formé de souches très proches de *Mesorhizobium plurifarum* ORS3628 (JQ606826) et *Mesorhizobium plurifarum* ORS3576 (JQ606815) isolées au Sénégal sur *A. senegal*.

(Les autres souches de *Mesorhizobium* forment le cluster 1 et sont proches de la souche type *Mesorhizobium plurifarum* LMG 11892^T(AF345263) (Kwon et al., 2005) et de *Mesorhizobium plurifarum* ORS3600 (JQ606821). Le cluster 3 est formé d'espèces du genre *Rhizobium* dont certaines sont proches de la souche type *Rhizobium hainanense* USDA 3588^T (AF345269) (Kwon et al., 2005). Les souches de *Burkholderia* isolées sont proches de *Burkholderia sp* JNR58 (HQ895999) et de *Burkholderia sp.* AJNR107(HQ896008) isolés à partir des nodules de *Acacia pycnantha* (Rodriguez-Echeverria et al., 2011) (Fig. 2).

Indice de diversité de Shannon : La diversité des rhizobiums appréciée par l'indice de Shannon est plus importante dans les sols HC comparés aux sols SC de *E. camaldulensis* pour *A. seyal* et pour *A. senegal* (Tableau 4).

Tableau 3 : Nombre de souches isolées dans les nodules formés sur les racines de *A. senegal* et pourcentage de chaque genre selon le type de sol

	Total		HC		SC	
	Nombre de souches	Proportion (%)	Nombre de souches	Proportion (%)	Nombre de souches	Proportion (%)
<i>Rhizobium</i>	15	20	9	23,68	6	16,21
<i>Mesorhizobium</i>	57	76	26	68,32	31	83,37
<i>Burkholderia</i>	3	4	3	8	0	0
Total	75		38		37	

Tableau 4 : Indice de Diversité de Shannon entre les sols HC et SC

	<i>A. seyal</i>		<i>A. senegal</i>	
	HC	SC	HC	SC
H	1,2	0,61	1,16	0,63

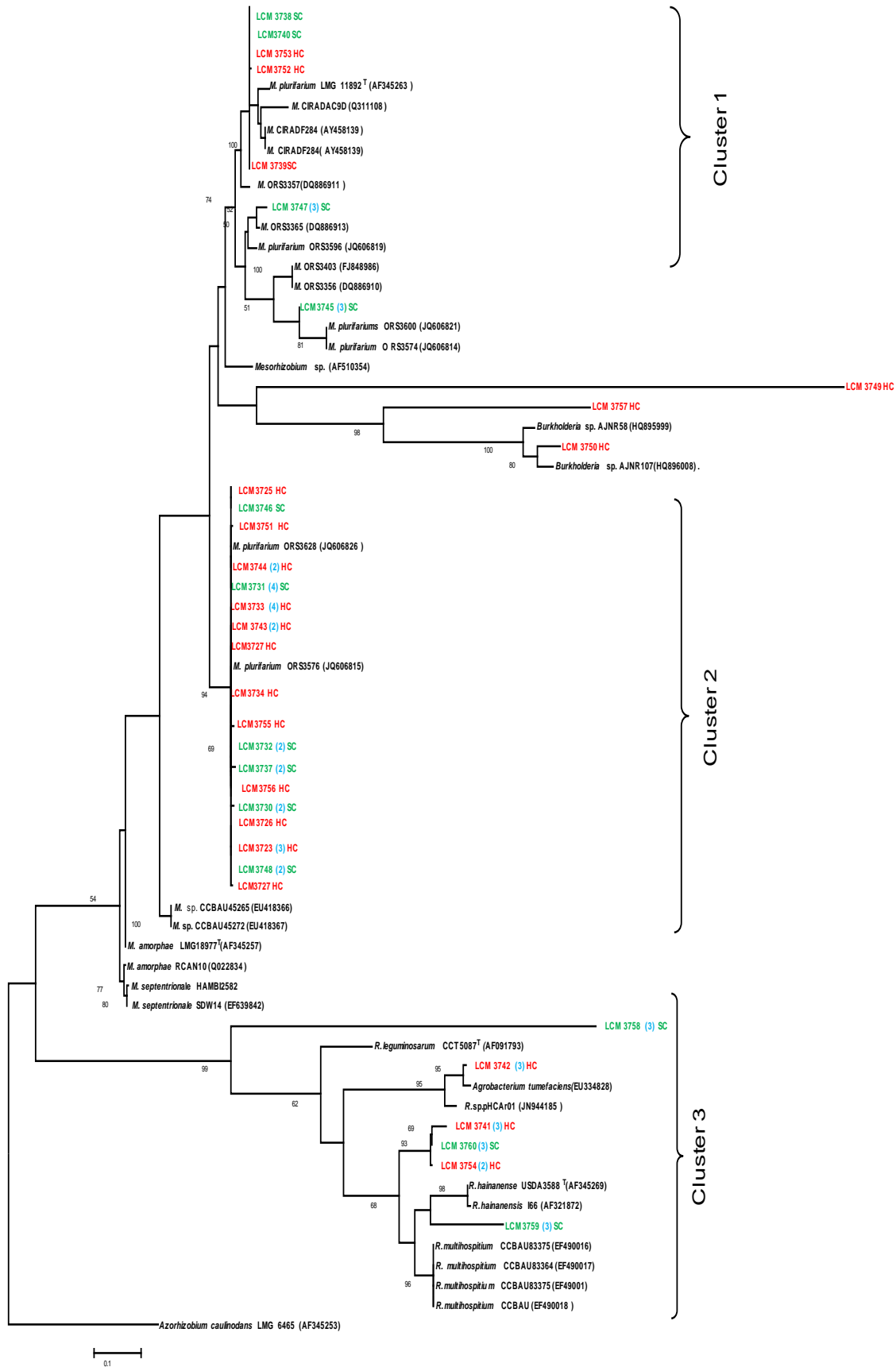


Figure 2 : L'arbre phylogénique des souches de *A. senegal* obtenu par la méthode de maximum de vraisemblance. L'indice de fiabilité des nœuds a été obtenu sur 100 bootstraps. Seuls les nœuds à valeurs supérieures à 50% sont indiqués. Le nombre entre parenthèse indique le nombre de souches isolées ayant le même génotype

DISCUSSION

Les résultats de notre étude, en accord avec celui de Dreyfus et Dommergues (1981), montrent que les deux acacias sont associés à une importante diversité de rhizobiums. *A. seyal* est associé à des rhizobiums à croissance rapide (*Mesorhizobium* et *Rhizobium*) et à des rhizobiums à croissance lente (*Bradyrhizobium*). Cependant, cette diversité est modifiée par *Eucalyptus*. En effet, *E. camaldulensis* semble exercer un effet sélectif sur la diversité des rhizobiums associés à *A. seyal*. Dans tous les sites, les espèces appartenant au genre *Rhizobium* n'ont pas été isolées dans les nodules récoltés sur les plants inoculés avec du sol SC alors que les bactéries du genre *Bradyrhizobium* ont été rencontrées majoritairement dans les nodules des plants inoculés avec du sol SC. Ce résultat suggère que les bradyrhizobiums associés à *A. seyal* semblent mieux s'accommoder aux effets de *E. camaldulensis* sur le sol. En effet, selon Santiago et al. (2002), les bradyrhizobiums seraient tolérants aux modifications induites par eucalyptus sur le sol. Cette tolérance s'expliquerait par leur capacité à dégrader les polyphénols pour les utiliser comme source de carbone (Lorite et al., 1998 ; Chen et al., 2004). Notre étude a, en plus montré que la diversité des rhizobiums associés à *A. seyal* et *A. senegal* était réduite dans les sols SC comparés aux sols HC. Cette réduction pourrait être la conséquence de l'acidification et/ou de l'accumulation de polyphénols, dans les sols sous plantation (Soumare et al., 2012). En effet, l'acidité comme les composés phénoliques du sol affectent toutes les étapes de la symbiose, depuis la survie des souches dans le sol jusqu'aux processus d'infection, de nodulation et de fixation d'azote (Caetano-Anolles et al., 1989). Il faut cependant souligner que certains composés phénoliques émis au niveau des racines de la plante hôte interviennent dans l'activation de gènes de nodulation bactériens (Dénarié et al., 1996). En réduisant le spectre d'hôtes symbiotiques, *E. camaldulensis* réduit ainsi la diversité des bactéries symbiotiques et par conséquent la résistance et/ou l'adaptation des acacias aux stress

CONCLUSION

Nos résultats montrent que *E. camaldulensis* réduit la diversité des rhizobiums associés aux acacias sahéliens. Cependant, il faut noter que la diversité existante dans les sols peut être plus importante que celle que nous avons trouvée par la méthode piégeage-isolement. En effet, la méthode de piégeage sur plante n'est pas optimale pour isoler l'ensemble de la diversité des souches symbiotiques associées à une plante,

environnementaux caractéristiques de la zone sahélienne. En effet, plus le spectre de partenaire bactérien est restreint, plus la plante, surtout symbiotiquement dépendante, est sensible aux perturbations de son écosystème.

La distribution des bactéries appartenant au genre *Mesorhizobium* et associées à *A. senegal* semble être moins affectée par *Eucalyptus* contrairement aux résultats obtenus avec *A. seyal*. En effet, ces bactéries ont été rencontrées à de fortes proportions en HC comme en SC. Les bactéries du genre *Rhizobium* uniquement isolées en HC sur *A. seyal*, sont rencontrées en SC dans les nodules de *A. senegal*. Ce résultat suggère que ces bactéries n'étaient pas tuées mais inhibées ou leur processus de nodulation bloqué. La plante hôte *A. senegal* aurait ainsi un système tampon à l'effet inhibiteur de *E. camaldulensis* sur le processus de nodulation. La comparaison des souches de mesorhizobiums associées à *A. seyal* et *A. senegal* montre que les souches proches de *Mesorhizobium plurifarium* ORS3576 (JQ606815) nodulent *A. senegal* et *A. seyal* suggérant ainsi une importante distribution et adaptation de ces souches aux conditions sahéliennes. Cette hétérogénéité des mesorhizobiums a déjà été mise en évidence par les travaux de Diouf et al. (2007). La présence de bactéries apparentées au genre *Burkholderia* est un résultat très intéressant car dans la littérature, aucune association *Acacia senegal* et les bactéries du genre *Burkholderia* n'a été décrite jusqu'à ce jour. Mais ce résultat doit être approfondi pour voir si cette association aboutit à une fixation efficiente de l'azote. Il est possible que ces bactéries aient acquis des gènes de nodulation par le processus de transfert latéral de gènes (Martens et al., 2008) mais que leur symbiose se traduit juste par la formation de nodules inefficients. En effet *Agrobacterium* et *Burkholderia* ont toujours été décrits comme des endophytes dans les nodules (colonisent les nodules après leur formation). Cette coexistence peut favoriser les échanges de matériel génétique intra ou interspécifique.

probablement à cause du phénomène de compétition entre souches pour la nodulation, les souches plus compétitrices pour la nodulation envahissant la plante en premier. Des études complémentaires sont ainsi nécessaires pour compléter et valider nos résultats. Il serait aussi intéressant de tester et comparer l'efficacité des souches à fixer l'azote en présence et en absence de *Eucalyptus*.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un projet financé par AIRE-Sud 7212 (MAEE/IRD). Les auteurs remercient le projet U3E qui a pris en charge le stage ayant permis de réaliser ce travail. Nous remercions

également le Laboratoire des Symbioses Tropicales et méditerranéennes (LSTM) de Montpellier pour son accueil et d'avoir aidé au séquençage des souches.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ba S, Willems A, de Lajudie P, Roche P, Jeder H, Quatrini P, Neyra M, Ferro Prome JC, Gillis M, Boivin-Masson C, Lorquin J, **2002**. Symbiotic and taxonomic diversity of rhizobia isolated from *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in Africa. *Systematic and applied microbiology* 25:130-145.
- Bakhom N, Kane A, Le Roux C, Galiana A, Fall D, Ndoye F, Duponnois R, Noba K, Diouf D, **2012**. Distribution and diversity of Rhizobial populations from Senegalese arid and semi-arid zones associated to different *Acacia Senegal* (L.) Willd. Provenances. <http://www.straininfo.net/sequences/genbank>.
- Caetano-Anolles G, Lagares A, Favelukes G, **1989**. Adsorption of *Rhizobium meliloti* to alfalfa roots: dependence of divalent cations and pH. *Plant Soil* 117: 67-74.
- Chen WM, Chang JS, Wu CH, Chang SC, **2004**. Characterization of phenol and trichloroethene degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. *Research in Microbiology* 155: 672-680.
- de Lajudie P, Dupuy N, Ndiaye A, Neyra M, Boivin C, Gillis M, Dreyfus B, **1998**. Acacia: nodulation et rhizobiums associés. Dans: *L'acacia au Sénégal* 359-375.
- Denarié J, Debellé F, Promé JC, **1996**. Rhizobium lipochitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry* 65:503-535.
- Depret G. and Laguerre G, **2008**. Plant phenology and genetic variability in root and nodule development strongly influence genetic structuring of *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* populations nodulating pea. *New Phytologist* 179(1): 224-235.
- Diouf D, Samba-Mbaye R, Lesueur D, Ba AT, Dreyfus B, de Lajudie P, Neyra M, **2007**. Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. rhizobial populations indigenous to Senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. *Microbial Ecology* 54: 553-566.
- Dreyfus B, Garcia JL, Gillis M, 1988. Characterization of Azorhizobium caulinodans gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from Sesbania rostrata. *Int J Syst Bacteriol* 38:89-98.
- Dreyfus B. and Dommergues Y, **1981**. Nodulation of Acacia species by fast-and slow-growing tropical strains of Rhizobium. *Applied and Environmental Microbiology* 41(1): 97.
- Faye A, Sarr A, Lesueur D, **2006**. Effect of inoculation with rhizobia on the gum-arabic yield of 10-year-old *Acacia senegal* trees. *Arid Land Research Management* 20: 79-85.
- Frank B, **1889**. Über die pilzsymbiose der leguminosen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 7332-346.
- Gibson AH, **1980**. Methods for legumes in glasshouses and controlled environment cabinets. In: Bergersen, FJ (Ed.) *Methods*.
- Herrmann L, Sanon K, Zoubeirou AM, Dianda M, Sall S, Thuita M, Lesueur D, **2012**. Seasonal changes of bacterial communities in the rhizosphere of Acacia Senegal mature trees inoculated with Ensifer strains in Burkina Faso and Niger. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 157: 47- 53.
- Kwon SW, Park JY, Kim JS, Kang JW, Cho YH, Lim CK, Parker MA, Lee GB, **2005**. Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 263-270.
- Lorite MJ, Sanjuan J, Velasco L, Olivares J, Bedmar EJ, **1998**. Characterization of *Bradyrhizobium japonicum* pcaBDC genes involved in 4-hydroxybenzoate degradation, *Biochim. Biophys. Acta* 1397 : 257-261.
- Martens M, Dawyndt P, Coopman R, Gillis M, De Vos P, Willems A, **2008**. Advantages of multilocus

- sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 58(1), 200.
- Moura VTL, Marques MS, Gonçalves LMB, Scotti MRM, **1996**. Nodulação de leguminosas cultivadas em solos sob eucaliptal e sob mata nativa; Relação com os efeitos alelopáticos do *Eucalyptus*. *Revista, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo* 20: 399–405.
- Navarro E, Simonet P, Normand P, Bardin R, **1992**. Characterization of natural population of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of ribosomal intergenic spacer. *Archives of Microbiology* 157 : 107–115.
- Newton W, **1998**. Nitrogénases: fonction et évolution. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 13(3): p. 238-241.
- Nicholas K. and Nicholas H, **1997**. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments, Version 2.7.000
- N'Zoue A, Moulin L, Prin Y, Laguerre G, De Lajudie P, **2010**. Bradyrhizobium in legumes-cereal-tuber associated cultures in Cote d'Ivoire: diversity and role in plant production. <http://www.straininfo.net/sequences/genbank>.
- Ponsonnet C, Nesme X, **1994**. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR–RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. *Archives of Microbiology* 161: 300–309.
- Rasolomampianina R, Bailly X, Fetiariison R, Rabevohitra R, Bena G, Ramaroson L, Raheriman-dimby M, Moulin L, de Lajudie P., Dreyfus B, Avarre JC, **2005**. Nitrogen-fixing nodules from rosewood legume trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to alpha- and beta-Proteobacteria. *Molecular Ecology* 14(13): 135–4146.
- Rodríguez-Echeverría S, Le Roux JJ, Crisóstomo JA, Ndlovu J, **2011**. Jack-of-all-trades and master of many? How does associated rhizobial diversity influence the colonization success of Australian *Acacia* species? *Diversity and Distributions* 17: 946-957.
- Santiago GM, Garcia QS, Scotti MRM, **2002**. Effect of post-planting inoculation with Bradyrhizobium sp. and mycorrhizal fungi on the growth of Brazilian rosewood, *Dalbergia nigra* Allem. ex Benth, in two tropical soils. *New Forests* 24: 15–25.
- Sarr A, Neyra M, Houeibib MaO, Ndoye I, Oihabi A, Lesueur D, **2005**. Rhizobial populations in soils from natural *Acacia senegal* and *Acacia nilotica* forests in Mauritania and the Senegal river valley. *Microbial ecology* 50(2):152-162.
- Shannon E, Weaver W, **1962**. The mathematical theory of communication. *The University of Illinois Press*, Urbana, Illinois.
- Soumare A, Sall SN, Manga GA, Hafidi M, Ndoye I, Duponnois R, **2012**. Effect of *Eucalyptus camaldulensis* and *Zea mays* litter on development, production, mycorrhizal colonization and roots nodulation of *Arachis hypogaea*. *African Journal of Biotechnology*, 11(93): 15994-16002
- Thompson J, Gibson T, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D, **1997**. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research* 25(24): 4876.
- Vincent J, **1970**. A manual for the practical study of root nodule bacteria. 164.
- Willems A, Coopman R, Gillis M, **2001**. Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA–DNA hybridizations in Bradyrhizobium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 623–632.

Données supplémentaires

<i>A. seyal</i>		<i>A. senegal</i>	
no LCM	no NCBI	no LCM	no NCBI
LCM 3688	KC201589	LCM 3723	KF290741
LCM 3689	KC201590	LCM 3724	KF290742
LCM 3691	KC201591	LCM 3725	KF290743
LCM 3692	KC201592	LCM 3726	KF290744
LCM 3693	KC201593	LCM 3727	KF290745
LCM 3694	KC201594	LCM 3728	KF290746
LCM 3695	KC201595	LCM 3730	KF290747
LCM 3696	KC201596	LCM 3731	KF290748
LCM 3697	KC201597	LCM 3732	KF290749
LCM 3698	KC201598	LCM 3733	KF290750
LCM 3700	KC201599	LCM 3734	KF290751
LCM 3701	KC201600	LCM 3735	KF290752
LCM 3702	KC201601	LCM 3737	KF290753
LCM 3703	KC201602	LCM 3738	KF290754
LCM 3704	KC201603	LCM 3739	KF290754
LCM 3706	KC201604	LCM 3740	KF290756
LCM 3707	KC201605	LCM 3742	KF290757
LCM 3708	KC201606	LCM 3743	KF290758
LCM 3709	KC201607	LCM 3744	KF290759
LCM 3710	KC201608	LCM 3745	KF290760
LCM 3711	KC201609	LCM 3747	KF290761
LCM 3712	KC201610	LCM 3748	KF290762
LCM 3713	KC201611	LCM 3749	KF290763
LCM 3714	KC201612	LCM 3750	KF290764
LCM 3715	KC201613	LCM 3751	KF290765
LCM 3717	KC201614	LCM 3752	KF290766
LCM 3718	KC201615	LCM 3753	KF290767
LCM 3719	KC201616	LCM 3755	KF290768
LCM 3720	KC201617	LCM 3756	KF290769
LCM 3722	KC201618	LCM 3759	KF290770
		LCM 3760	KF290771

no LCM : numéro de souche dans la collection du Laboratoire Commun de Microbiologie (LCM)

no NCBI : numéro d'accèsion des séquences dans la base de NCBI (National Center for Biotechnology Information)