

## Diversité des *Rhizobia* qui nodulent quelques légumineuses de la région orientale du Maroc

Guerrouj Kamal, Hanane Benata<sup>1</sup>, Mohamed Ourarhi<sup>1</sup>, Hanaa Abdelmoumen<sup>1</sup>, Roger Paul et Mustapha Missbah El Idrissi<sup>1</sup>,

Laboratoire de Biologie des Plantes et des Microorganismes, Faculté des Sciences, Université Mohamed Premier, Oujda 60.000, Maroc

Laboratoire de Toxicologie environnementale, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, 5030 Gembloux (Belgique)

### Introduction

A l'échelle de la biosphère, la quantité d'azote disponible est l'un des facteurs limitants majeurs de la croissance des plantes. Néanmoins, bien que l'atmosphère soit composée de 78% de diazote, les plantes ne peuvent pas l'utiliser pour subvenir à leurs besoins. L'utilisation de cette source d'azote est limitée à certains procaryotes (cyanobactéries, actinomycètes, bactéries)-appelés diazotrophes. Ces procaryotes arrivent à fixer l'azote directement de l'atmosphère grâce à leur capacité de synthétiser un complexe enzymatique dénommé nitrogénase en conditions de carence azotée.

La fixation de l'azote peut être le fait de bactéries libres comme *Azotobacter*, *Azospirillum*,... etc., ou certaines cyanobactéries. Cependant, la fixation symbiotique de l'azote représente la plus grande part des apports d'azote au sol.

Une association symbiotique entre une bactérie fixatrice d'azote et une plante est en principe bénéfique pour les deux partenaires. Ainsi, le micro-organisme apporte sa capacité de réduction de l'azote gazeux pour le transformer en ammonium, essentiel pour le développement de la plante, celle-ci à son tour, fournit à la bactérie un apport carboné (produits de la photosynthèse) indispensable pour sa croissance et assure sa reproduction dans un milieu clos, la nodosité ou nodule, loin de toute compétition par d'autres micro-organismes. La bactérie utilise une partie de l'apport d'énergie de la plante pour la réduction de l'azote gazeux.

La symbiose fixatrice d'azote la plus importante au niveau de la biosphère est celle qui concerne les légumineuses et les bactéries de la famille des rhizobiacées (près de la moitié de l'azote fixé annuellement). Un autre grand groupe met en jeu des bactéries filamenteuses du genre *Frankia* et des végétaux très variés nommés plantes actinorhiziennes (aulne, Casuarina,...).

La famille des légumineuses est l'un des groupes des végétaux supérieurs les plus abondants et les plus diversifiés. Elle est subdivisée en trois sous-familles: Les Fabacées (Ex-Papilionoideae), les *Mimosoideae* et les *Caesalpinioideae*. Elle comporterait plus de 19000 espèces réunies en 750 genres et dont seulement 10% ont été examinées pour la nodulation racinaire ou caulinaire. Celle-ci a été observée dans plus de 90% des cas chez les Mimosacées et les Fabacées. En revanche on trouve peu d'espèces nodulées chez les césalpinacées (Sprent et al, 1987).

La morphogénèse du nodule est induite par un échange de signaux entre la plante et la bactérie. Des substances à effet mitogène sont synthétisées par les produits des gènes de nodulation de la bactérie en réponse à des substances de type flavonoïdes émises par la plante (Fisher et Long, 1992).

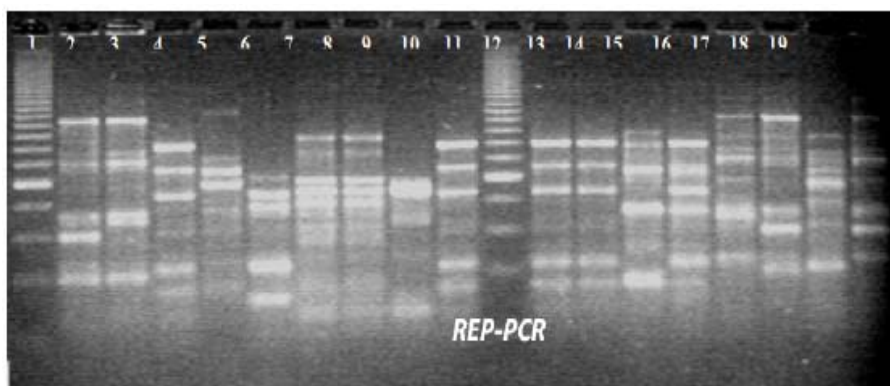
Les anciennes civilisations avaient déjà découvert que le rendement des cultures peut être exploité par une utilisation judicieuse des rotations avec les légumineuses pour améliorer la productivité des systèmes traditionnels. Les résultats agronomiques au champ, la fixation symbiotique de l'azote et sa disponibilité et par conséquent la nutrition azotée des céréales succédant aux légumineuses sont généralement améliorées.

## Résultats et discussion

Dans ce travail, nous avons analysé des souches de *Rhizobia* isolées des nodosités racinaires de différentes espèces de légumineuses locales et exotiques. Nous avons analysé 18 souches nodulant le baguenaudier (*Colutea arborescens*) isolées des sols de la région de Tafoughalt et pied de montagnes des Beni Znassen, 30 souches nodulant *Prosopis juliflora* isolées des sols dunaires de Figuig, 30 souches nodulant *Retama monosperma* isolées des sols de Saïdia et 18 souches nodulant *R. sphaerocarpa* isolées des sols de Jerrada.

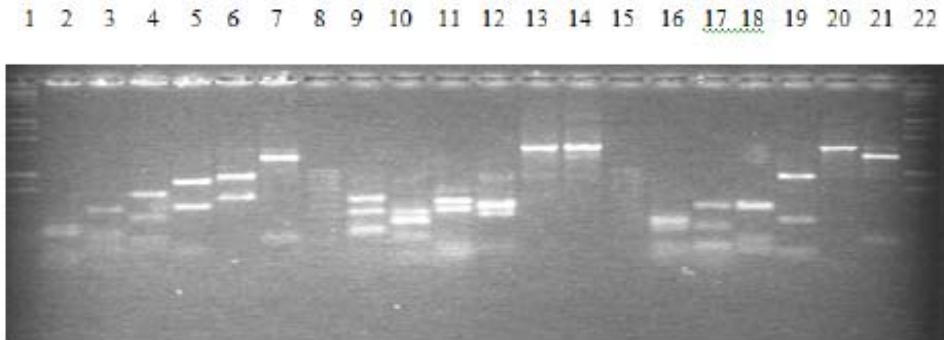
La diversité des isolats a été évaluée en analysant leurs caractéristiques phénotypiques et génétiques. Les caractéristiques phénotypiques étudiées sont le comportement des souches en milieu acides et alcalins, la tolérance à la salinité, l'hydrolyse de l'urée et de la gélatine, la croissance en présence de  $\text{KNO}_3$  (8%), la tolérance aux métaux lourds et antibiotiques, production du sulfure d'hydrogène, la production de mélanine, d'oxydase et de catalase, l'utilisation des sources de carbone, la croissance aux températures élevées. Toutes ces caractéristiques ont permis la mise en évidence d'une grande diversité physiologique parmi les isolats examinés. La caractérisation génétique consiste en l'analyse des empreintes génétiques obtenues par la rep PCR à l'aide des amorces ERIC (1 et 2), du Rep (1 et 2) et BOX A1R. La RFLP PCR de l'ADNr 16S a été réalisée en utilisant les endonucléases Msp1, HaeIII, CfoI et RsaI.

Nous avons observé une grande diversité de *Rhizobia* nodulant le baguenaudier dans la région orientale du Maroc (figure 1). L'ADNr 16S de six souches représentant les principaux ribotypes obtenus par la RFLP PCR ont été séquencés. Les résultats ont indiqué que ces souches appartiennent à différentes espèces des trois genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium*.



**Figure 1. Examples of electrophoretic patterns generated by rep-PCR using REP primer: REP-PCR patterns obtained with the same isolates. Lanes: (1), molecular weight marker (200 Pb ladder); (2) Ca14; (3) Ca20; (4) CaA4; (5) Cai11; (6) Cai15; (7) Cai22; (8) Cai34; (9) CaT1; (10) CaT7; (11) molecular weight marker (200 Pb ladder); (12) CaT8; (13) CaT13; (14) CaT14; (15) LB2Ca1; (16) LB2Ca3; (17) LB2Ca11; (18) LB1Ca4; (19) LB1Ca8.**

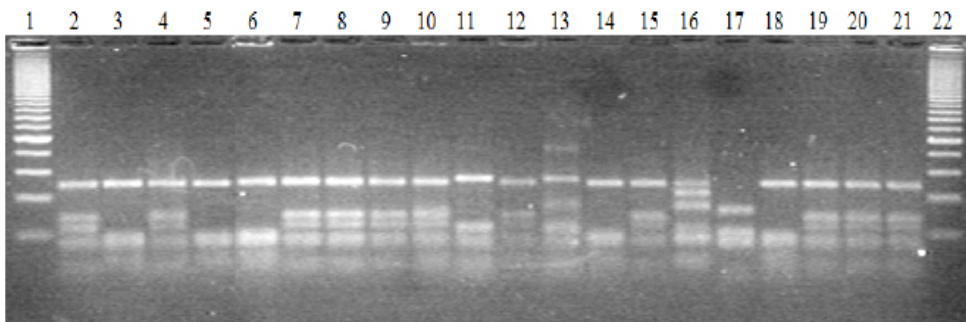
Par contre le séquençage de l'ADNr 16S des principaux représentants des ribotypes (Figure 2) des souches isolées de la plante exotique *Prosopis juliflora* appartiennent aux genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Achromobacter*. C'est la première fois qu'on a découvert que qu'une espèce d'*Achromobacter*, *A. xyloxydans* est impliquée dans la fixation symbiotique de l'azote. Cette espèce est fixatrice d'azote à l'état libre et se trouve dans plusieurs niches écologiques dont la rhizosphère. Elle est connue pour sa pathogénie chez les personnes immunodéficientes.



**Fig. 2. ARDRA electrophoretograms of 16S amplicons from three representative isolates of *Prosopis juliflora* nodulating strains.** Lanes: (1): Molecular weight marker (1 kb ladder); (8, 9, 16 and 17): Molecular weight marker (100 bp ladder); (2-7): Strain PjF82; (10-15): Strain PjF60; (18-23): Strain PjFa8. DNAs were digested with the following endonucleases: CfoI (lanes 2, 10, 18); HaeIII (lanes 3, 11, 19); MspI (lanes 4, 12, 20); RsaI (lanes 5, 13, 21); XbaI (lanes 6, 14, 22); XhoI (lanes 7, 15, 23).

*Retama monosperma* est nodulée dans les sols de *Saidia* par les souches apparentées aux espèces du genre *Rhizobium*, principalement *R. leguminosarum*.

*Retama sphaerocarpa* et *Prosopis chilensis* sont nodulées elles aussi par une diversité d'espèces de rhizobia. Plusieurs ribotypes obtenus par RFLP PCR ont été obtenus (figure 3) et nous attendons les résultats du séquençage de l'ADNr 16S pour statuer de leur position taxonomique au sein de la famille des Rhizobiaceae.



**Fig 3. Hae III, RFLP electrophoretograms of 16S rDNA amplicons of some strains nodulating *Prosopis chilensis*.** Lanes 1 and 22: Molecular weight marker (1 kb ladder)

A partir de ces travaux, nous concluons que les sols de la région orientale du Maroc sont riches en espèces de rhizobia. Cette diversité se manifeste surtout lorsque nous trouvons plusieurs espèces différentes qui nodulent la même plante. Le fait d'être nodulée par différents souches ayant des potentialités phénotypique différentes constitue un avantage pour la plante. En effet, elle pourra toujours être nodulée et fixer l'azote avec une souche de rhizobia même si les caractéristiques édaphoclimatiques du milieu subissent des changements (variation de la température, du pH ou de la salinité...).

L'autre conclusion très intéressante est que les sols contiennent des rhizobia compatibles avec des légumineuses exotiques qui n'ont jamais été cultivées dans la région (Prosopis).

## Références

- Fisher, R., and S. R. Long. 1992. Rhizobium-plant signal exchange. *Nature* 357:655-660
- Sprent J.I, Sutherland J.M, Faria S.M.d. Some aspects of the biology of nitrogen-fixing organisms. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 1987;317:111–129.