

Diversité génétique et polymorphisme symbiotique de *Sinorhizobium meliloti* nodulant *Medicago truncatula* en sols tunisiens des régions arides

Zribi K., Jeidi N., Mhamdi R., Aouani M.E., Huguet T.

in

Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.).
Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens

Zaragoza : CIHEAM
Cahiers Options Méditerranéennes; n. 62

2004
pages 149-152

Article available on line / Article disponible en ligne à l'adresse :

<http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=4600149>

To cite this article / Pour citer cet article

Zribi K., Jeidi N., Mhamdi R., Aouani M.E., Huguet T. **Diversité génétique et polymorphisme symbiotique de *Sinorhizobium meliloti* nodulant *Medicago truncatula* en sols tunisiens des régions arides.** In : Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.). *Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens* . Zaragoza : CIHEAM, 2004. p. 149-152 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 62)



<http://www.ciheam.org/>
<http://om.ciheam.org/>

Diversité génétique et polymorphisme symbiotique de *Sinorhizobium meliloti* nodulant *Medicago truncatula* en sols tunisiens des régions arides

K. Zribi*, N. Jeidi*, R. Mhamdi*, T. Huguet** et M.E. Aouani*

*INRST, LAAP, BP 95, 2050, Hammam Lif, Tunisie

**LBM RPM, CNRS-INRA, BP 27, 31326 Castanet -Tolosan, France

SUMMARY – “Genetic diversity and symbiotic polymorphism of *Sinorhizobium meliloti* nodulating *Medicago truncatula* in arid Tunisian soils”. *Sinorhizobia* MPN was increased from Deguache ($6 \cdot 10^1$) to Majel BelAbbes ($31 \cdot 10^3$) respectively in saharien and semi arid bioclimatic areas. The characterization of 111 rhizobia isolated from nodules of *M. truncatula* grown on soils from 4 sites, with PCR/RFLP rDNA 16S, showed that *S. meliloti* was the only *Sinorhizobium* species in arid areas. Use of REP/PCR emphasized a remarkable genetic polymorphism in this species. The variability between strains is influenced by the soil of origin. Nitrogen fixation efficacy showed a significant strain x population interaction. Amra strains were efficient only with homologous population, however nitrogen fixation efficacy of *M. truncatula* plants recovered from Amra was enlarged to rhizobia from distant regions.

Key words: *S. meliloti*, *M. truncatula*, PCR/RFLP, REP/PCR, nitrogen fixation efficacy, MPN (Most probable number).

Introduction

M. truncatula est une légumineuse, fourragère, spontanée et ubiquiste. Elle pousse sur tout le territoire tunisien et semble adaptée à tous les étages bioclimatiques (Hassen *et al.*, 1994). Cette légumineuse mène une vie symbiotique avec les deux espèces rhizobiales, *S. meliloti* et *S. medicae* (Rome *et al.*, 1996). A l'état libre, ces bactéries subissent dans le sol, l'action de l'ensemble des facteurs environnementaux qui affectent leur survie, leur croissance et leur infectivité. Plusieurs travaux de recherche ont mis en évidence l'implication des deux partenaires de l'association *M. truncatula* - *Sinorhizobium* ainsi que leur interaction dans l'adaptation à l'environnement. L'identification de symbioses adaptées et leur exploitation dans la recherche du déterminisme des mécanismes impliqués dans leur tolérance aux facteurs biotiques et abiotiques représente un objectif majeur des travaux de plusieurs groupes (Cook, 1999 ; Thoquet *et al.*, 2002).

Dans le présent travail, nous évaluons la densité des *Sinorhizobium* dans certains sols des régions arides et identifions par PCR/RFLP de l'ADNr 16S les bactéries nodulant *M. truncatula*. La REP/PCR est utilisée ensuite pour examiner la diversité intra spécifique des *S. meliloti*. Enfin l'efficacité de fixation azotée de plusieurs associations est analysée en fonction de la provenance des souches et des populations étudiées.

Matériel et méthodes

Dénombrement des *Sinorhizobium*

Le dénombrement des bactéries dans le sol est réalisé avec la méthode du MPN 'Most Probable Number' (Vincent, 1970) sur *M. sativa*. La culture est faite dans des tubes contenant le milieu de Farhaeus (1957). L'inoculation des plantes est effectuée par des suspensions de sol de concentration 10^{-1} à 10^{-10} .

Souches étudiées

Les populations naturelles de *M. truncatula* sont cultivées soit sur leurs sols d'origine pour piéger

les bactéries indigènes soit sur d'autres sols. Les nodules formés sont utilisés pour l'isolement des bactéries rhizobiales (Vincent, 1970) qui sont conservées pour les études ultérieures de caractérisation.

Caractérisation moléculaire

111 bactéries ont été soumises à une caractérisation par PCR/RFLP de l'ADNr 16S selon Laguerre *et al.* (1996). La caractérisation par REP/PCR a été faite pour 18 souches selon De Bruijn (1992). Le dendrogramme illustrant les relations génétiques entre les souches caractérisées est construit en se basant sur les profils REP.

Evaluation de l'efficacité symbiotique

Après germination, les plantules sont cultivées sur milieu de Farhaeus (1957). L'inoculation des plantes est faite avec 100 µl d'une suspension de cellules bactériennes d'une culture âgée de 48h. Des témoins sans inoculation sont préparés. Les populations utilisées sont celles de Amra, Enfidha, Soliman, Elkef et une lignée de référence, Jemalong. Les souches sont A3 et A5 (issues de Amra), J2 (Jelma), MI4 (Majel BelAbbes), TI5 (Thala), KIII4a (elkef) et RCR2011 (souche de référence). Toutes ces souches sont des *S. meliloti*. Leur efficacité de fixation symbiotique est évaluée par le rapport de la production des biomasses des plantes inoculées avec celle des plantes non inoculées et poussant sur la réserve azotée de la graine uniquement.

Résultats et discussion

Dénombrement des *Sinorhizobium*

Le dénombrement des *Sinorhizobium* a été fait pour les quatre sols de Deguache, Amra, Jelma et Majel BelAbbes. Le Tableau 1 montre que le nombre de *Sinorhizobium* dans les sols diminue en allant des zones les moins arides vers les plus arides. Dans le sol de Deguache le MPN est de 60 bactéries g⁻¹ de sol, ce nombre est considéré très faible par rapport à celui du sol de Majel BelAbbes qui a un nombre égal à 31 10³ bactéries g⁻¹ de sol. Les deux autres sols de Amra et Jelma ont des nombres intermédiaires. La différence du MPN pourrait s'expliquer en partie par la variabilité des caractéristiques physicochimiques. La teneur en argile, la matière organique et l'azote total sont les plus faibles dans le sol de Deguache. Un taux minimum en ces composés est nécessaire pour le maintien à l'état saprophytique et l'hébergement de ces bactéries. Dans ce même sol la salinité est dix fois plus forte que les trois autres. Ces résultats confirment ceux présentés par Zahran (1999) et montrant que les conditions édaphiques et climatiques jouent un rôle essentiel dans la survie et la croissance des bactéries dans le sol.

Tableau 1. Nombre de *Sinorhizobium* estimé par MPN 'Most Probable Number' et paramètres physicochimiques et climatiques pour les 4 sites étudiés

Sols	Argile %	Salinité %	Mat org %	Azote total %	Précipitation en mm/an	MPN
Deguache	8	0,1	0,17	0,28	100-200	60
Amra	10	0,01	0,59	0,63	100-200	580
Jelma	13	0,01	0,84	1,19	200-300	1700
MajelBelAbbes	10	0,09	0,37	0,49	200-300	31000

Identification des *Sinorhizobium* nodulant *M. truncatula* dans les régions arides

La caractérisation moléculaire par PCR/RFLP a porté sur 12, 30, 32 et 37 souches bactériennes provenant successivement de Deguache, Jelma, Amra et Majel BelAbbes. Elles se sont avérées toutes des *S. meliloti*. Dans d'autres régions de la Tunisie se trouvant dans les étages subhumide et semi aride supérieur, *M. truncatula* était nodulée par *S. meliloti* et *S. medicae* (Talbi *et al.*, com. per.).

La nodulation des populations naturelles de cette espèce végétale uniquement par *S. meliloti* pourrait s'expliquer par une sélectivité des populations végétales vis à vis de *S. meliloti* ou une absence de *S. medicae* dans les sols étudiés. L'utilisation de *M. polymorpha* sur sols de Amra et Majel BelAbbes a confirmé l'absence de *S. medicae*. La présence exclusive de *S. meliloti* serait due à des facteurs liés au sol, au climat de la région considérée ou à une spécificité d'interaction plante-bactérie.

Diversité intra spécifique de *S. meliloti* caractérisées par REP/PCR

L'existence de *S. meliloti* dans plusieurs sols de la Tunisie couvrant des étages bioclimatiques différents allant de l'aride au subhumide nous a incité à comparer la structure génétique de cette espèce rhizobiale en zone aride avec celle des régions subhumides. La REP/PCR permet d'analyser la diversité intra spécifique, elle est réalisée sur six souches de *S. meliloti* piégées par la population de Amra sur le sol d'origine ainsi que ceux de Bulla Regia et Rhayet. La Figure 1A montre un polymorphisme génétique plus accentué chez les souches piégées par la population de Amra sur son propre sol, présentent une dissimilarité bien plus importante qu'entre souches de Rhayet (résultats non montrés). Les profils REP ont permis de construire un dendrogramme qui montre un regroupement génétique des souches du même sol ce qui reflète un certain effet sol sur la structure génétique des souches rhizobiales (Fig. 1B). Ces résultats confirment ceux obtenus par Paffetti *et al.* (1996) qui ont montré que la diversité génétique des souches rhizobiales peut être affectée par l'origine géographique du sol. D'autres travaux ont montré que la plante hôte aux niveaux population, lignée ou cultivars (Carelli *et al.*, 2000) ainsi que les facteurs externes modulent la structure de la population bactérienne (Labes *et al.*, 1996).

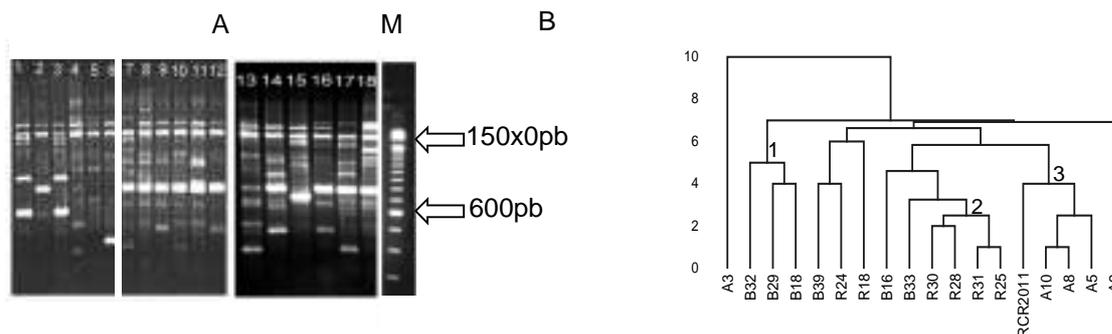


Fig. 1. Polymorphisme génétique (REP/PCR) des souches de *S. meliloti*. A : Profils des souches piégées par la population Amra cultivée sur trois sols différents (1-6, Amra ; 7-12, Rhayet et 13-18, Bulla Regia). B : Dendrogramme UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Averages) illustrant les relations génétiques entre les différentes souches étudiées, les groupes 1, 2 et 3 comprennent respectivement chacun uniquement des souches de Bulla Regia, Rhayet et Amra. M : marqueur de poids moléculaire, 100pb BRL.

Efficacité symbiotique

L'analyse de variance sur l'ensemble des résultats obtenus avec les 35 associations montre des effets significatifs ($p < 0,0001$) pour les populations, les souches ainsi que les interactions entre ces deux facteurs. Les deux facteurs étudiés interviennent de façon inégale dans l'ensemble de la variabilité. L'effet population contribue avec 69,5% alors que l'effet souche contribue avec 25,2% alors que celui de l'interaction intervient avec 5,3%. Les deux souches A3 et A5 isolées de la population de Amra sont efficaces sur la population d'origine. Avec les populations de Soliman, Elkef, Enfidha et Jemalong, elles sont inefficaces. Par ailleurs, la population de Amra originaire de l'aride inférieur s'est montrée efficace avec les souches de même origine ainsi que d'autres souches provenant des étages aride supérieur (J2, M14), semi aride inférieur (T15) et semi aride supérieur (K114a). Cette population est faiblement efficace avec la souche de référence RCR2011.

Conclusion

L'analyse de la densité de *Sinorhizobium* montre qu'elle varie dans les localités arides et sahariennes étudiées en fonction des caractéristiques édaphiques et climatiques. La caractérisation d'une collection de 111 souches par PCR/RFLP de l'ADNr 16S montrent qu'elles appartiennent toutes à l'espèce *S. meliloti*. Analysées par REP/PCR, ces bactéries affichent une variabilité génétique remarquable. La comparaison d'un échantillon de 6 souches issues du sol Amra et nodulant la population de même origine montre qu'elles sont plus variables que celles isolées sur la même population cultivée sur deux autres sols. L'analyse de l'efficacité de plusieurs associations entre souches bactériennes et populations végétales a permis de mettre en évidence une interaction significative entre ces deux facteurs et de ressortir les performances de la population de Amra.

Tableau 2. Efficacité de la fixation d'azote (EFA = matière sèche aérienne des plantes inoculées / matière sèche du témoin absolu) de 35 associations différentes. Les moyennes sont calculées sur 8 répétitions par traitement. Les résultats sont soumis à une analyse de variance et toutes les moyennes sont comparées par le test de Duncan. Deux moyennes avec des lettres différentes sont statistiquement différentes

Souche/population	Enfidha	Amra	Elkef	Soliman	Jemalong
A3	0,98 jk	2,17 ab	0,91 jk	0,94 jk	0,97 jk
A5	0,96 jk	2,22 a	0,90 jk	1,06 ijk	1,07 ijk
J2	1,04 ijk	2,21 a	1,05 ijk	1,00 jk	1,15 hijk
MI4	1,03 jk	2,29 a	1,12 ijk	1,03 jk	0,87 k
TI5	1,45 fgghi	2,11 abc	1,33 ghij	1,54 defgh	1,88 abcd
KIII4a	1,52 efgh	2,25 a	1,69 defg	1,79 bcdef	2,11 abc
RRC2011	1,30 ghijk	1,56 defg	1,94 abcd	1,74 cdef	1,76 cdef

Références

- Carelli M., Gnocchi S., Fancelli S., Mengoni A., Paffetti D., Scotti C. & Bazzicalupo M. 2000. Genetic Diversity and Dynamics of *Sinorhizobium meliloti* Populations Nodulating Different Alfalfa Cultivars in Italian Soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 /11 : 4785-4789.
- De Bruijn F.J. 1992. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 : 2180-2187.
- Farhåeus G. 1957. The infection of White clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple slide technique. *J. Gen. Microbiol.*, 16 : 374-381.
- Hassen H., Zoghalmi A. & Sassi S. 1994. Contribution à l'étude de quelques espèces pastorales en Tunisie centrale : répartition géographique et relation avec le milieu environnant. *Annales de l'INRA*, 1 & 2 : 203-222.
- Labes G., Ulrich A. & Lentzsch P. (1996). Influence of Bovine Slurry Deposition on the Structure of Nodulating *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Soil Populations in Natural Habitat. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 62 : 1717-1722.
- Laguerre G., Mavingui P., Allard M.R., Charnay M.P., Louvrier P., Mazurier S.I., Rigottier I-Gois L. & Amarger N. 1996. Typing of Rhizobia by PCR-DNA fingerprinting and PCR restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions : application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 : 2029-2036.
- Paffetti D., Scotti C., Gnocchi S., Fancelli S. & Bazzicalupo M. 1996. Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from *Medicago sativa* varieties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 : 2279-2285.
- Rome S., Fernandez M., Brunel B., Normand P. & Cleyet-Marel J.C. 1996- *Sinorhizobium medicae* sp. nov., Isolated from Annual *Medicago* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46(4) : 972-980.
- Thoquet P., Ghérardi M., Journet E.P., Kereszt A., Ané J.M., Prosperi J.M. & Vincent J.M. 1970. A manual for practical study of root-nodule bacteria. IBP handbook 15, Blackwell scientific publications, Oxford U.K. p164.
- Zahrán H.H. 1999. *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4) : 968-989.