

CARACTERISATION DES BACTERIES ISOLEES A PARTIR DES NODULES DES ESPECES DE LEGUMINEUSES DU GENRE HEDYSARUM : *H. pallidum* Desf., *H. spinosissimum* subsp. *capitatum*, *H. carnosum* Desf. et *H. naudinianum* Coss

Reçu le 08/04/2007– Accepté le 13/12/2010

Résumé

Des bactéries ont été isolées à partir des nodules des espèces de plantes légumineuses du genre *Hedysarum* : *H. pallidum* Desf., *H. spinosissimum* subsp. *capitatum*, *H. carnosum* Desf. et *H. naudinianum* Coss. Pour l'espèce *H. naudinianum* Coss, c'est la première fois qu'une étude est faite pour mettre en évidence l'association symbiotique plante-bactérie. La caractérisation des bactéries isolées porte sur une identification phénotypique qui englobe une série de tests en plus de la détermination du profil protéique par SDS-PAGE et le test de nodulation et une caractérisation moléculaire des isolats.

Les résultats de la caractérisation phénotypique et phylogénétique (l'ARDRA et le séquençage de l'ADNr16S) montrent que les isolats appartiennent à la classe des *Gammaproteobacteria* spécifiquement les espèces de *Pseudomonas sp* et *Pantoea agglomerans*.

Mots clés : *Hedysarum naudinianum*, *Rhizobium*, *Gammaproteobacteria*, *Symbiose*.

Abstract

Bacteria were isolated from the nodules of leguminous plants species of the genus *Hedysarum* : *H. pallidum* Desf., *H. spinosissimum* subsp. *capitatum*, *H. carnosum* Desf. and *H. naudinianum* Coss. For the species *H. naudinianum* Coss., it is the first study to highlight symbiotic association plant-bacterium. The characterization of the isolated bacteria relates to a phenotypical identification which includes a series of tests in addition to the determination of the proteic profile by SDS-PAGE and the nodulation test and a molecular characterization of isolates.

Phenotypically, the isolates give comparable results with these of the reference strains *Gammaproteobacteria*. This is confirmed by the phylogenetic study. The results of the phenotypical and phylogenetic characterization (theARDRA and the sequencing of DNAr16S) show that the isolates belong to the class of *Gammaproteobacteria* specifically the species of *Pseudomonas sp* and *Pantoea agglomerans*.

Keywords : *Hedysarum naudinianum*, *Rhizobium*, *Gammaproteobacteria*, *Symbiosis*.

A. TORCHE¹
Y. BENHIZIA¹
A. BENGUEDOUAR¹
R. GHARZOULI¹
H. BENHIZIA¹
D. KHELIFI²
A. SQUARTINI³

¹Laboratoire des biotechnologies, Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri, Constantine. Algérie.

²Laboratoire de Biochimie, Génétique et Amélioration des plantes, Université Mentouri, Constantine. Algérie.

³Dipartimento di Biotechnologie Agrarie, Università di Padova, Legnaro (Italia)

ملخص

تم عزل مجموعة من البكتيريا انطلاقا من العقد الجذرية لعدة أنواع من النباتات البقولية لجنس *Hedysarum* : *H. naudinianum* ، *H. carnosum* ، *H. spinosissimum* subsp *capitatum* ، *H. pallidum* بالنسبة للنوع *H. naudinianum* فإنها أول دراسة مظهرية تحوي مجموعة من الإختبارات إضافة إلى تبين الشريط البروتيني عن طريق تقنية الهجرة الكهربائية على جال عديد الاكريل أميد تحت ظروف التشويه (SDS-PAGE) و اختبار تكوين العقد الجذرية وتعريف وراثي للعزلات البكتيرية. نتائج الدراسة المظهرية و الوراثة اظهرت ان العزلات تنتمي الى قسم *Gammaproteobacteria* خصوصا الانواع *Pseudomonas sp* و *Pantoea agglomerans*

الكلمات المفتاحية : *Gammaproteobacteria* ، *Hedysarum naudinianum* ، *Rhizobium* ، التعايش.

Hedysarum sp. est une plante légumineuse fourragère composée d'un grand nombre d'espèces avec une répartition très étendue dans le monde. Les espèces du genre *Hedysarum* d'intérêt agronomique, grâce à leur qualité fourragère et leur capacité à améliorer la fertilité des sols par la fixation de l'azote atmosphérique, peuvent être exploitées dans la valorisation des régions dégradées, surtout dans les zones arides et semi-arides (Hannachi et coll., 2004).

Les interactions symbiotiques sont caractérisées chez les légumineuses par la formation des nodules racinaires colonisés par des bactéries fixatrices d'azote. L'association symbiotique légumineuse-bactérie est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduit, mais aussi à la bactérie pour obtenir les nutriments nécessaires pour son développement. Elle est essentiellement basée sur une communication moléculaire entre les deux partenaires (Gage, 2004). Auparavant le groupe des bactéries qui colonisent les racines des légumineuses n'était composé que d'Alphaproteobacteria, mais récemment deux souches de Betaproteobacteria ont été décrites comme bactéries capables d'induire une nodulation chez les légumineuses du genre *Burkholderia* (Moulin et coll., 2001) et du genre *Ralstonia* (Chen et coll., 2001). Ainsi que des souches de Gammaproteobacteria ont été désignées comme des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum* (Benhizia et coll., 2004).

Ce présent travail repose sur une étude taxonomique basée sur la caractérisation phénotypique et phylogénétique des bactéries associées aux nodules des espèces légumineuses du genre *Hedysarum* : *H. pallidum* Desf. (Endémique nord Africaine), *H. spinosissimum* subsp *capitatum* Desf. (Espèce de la méditerranée occidentale), *H. carnosum* Desf. (Endémique nord Africaine), et *H. naudinianum* Coss. (Endémique de l'Algérie) (Quezel et Santa, 1962).

MATERIELS ET METHODES

Matériel biologique

Tableau 1 : matériel biologique

Isolement des bactéries à partir des nodules

La collecte des nodules est faite à partir de quatre espèces du genre *Hedysarum* situées dans des régions de l'est algérien différentes sur le plan climatique et pédologique. *H. spinosissimum* subsp *capitatum* est située dans le plateau d'Ain El Bey à la périphérie de la ville de Constantine. *H. pallidum* se rencontre à Sétif (Amoucha) et à Oum El Bouaghi. *H. carnosum* est récoltée dans la région d'El Faïd au sud est de Biskra. *H. naudinianum* est également collectée de Sétif (Bougaa, AinRoua et Ain Esfa). (Fig. 1).

Les souches ont été isolées à partir de nodules de différentes espèces du genre *Hedysarum*, nodules conservés par dessiccation (CaCl_2).

Les nodules sont stérilisés avec l'éthanol 95% pendant 5 à 10 secondes, puis au Chlorure de Mercure acidifié 0.1% pendant 3 minutes et enfin rincés 10 fois à l'eau distillée stérile. Ils sont ensuite écrasés dans une goutte d'eau distillée stérile puis ensemencés sur milieu Yeast-Mannitol-Agar au Rouge Congo, sur Yeast-Mannitol-Agar au Bleu de Bromothymol et sur Glucose-Peptone-Agar au Pourpre de Bromocrésol (Vincent, 1970).

Les bactéries isolées sont conservées sur milieu YMA tamponné au CaCO_3 à 4°C.

Authentification des isolats

La technique des jarres de Leonard selon la méthode de Vincent (1970) est utilisée pour évaluer l'aptitude des isolats à former des nodules sur les racines de la plante hôte. Ce test est réalisé en conditions bactériologiquement contrôlées, mettant en place les deux partenaires « plante-bactérie ».

Les graines de différentes espèces du genre *Hedysarum* sont stérilisées à l'éthanol absolu pendant 5 à 10 secondes et à l'acide sulfurique concentré pendant 3 minutes. Les graines sont ensuite abondamment rincées à l'eau distillée stérile et imbibées pendant 2 heures dans l'eau distillée stérile, enfin mises à germer sur boîtes de Tryptone-Yeast-Agar (Beringer, 1974) à l'obscurité pendant 3 à 7 jours selon les espèces. Les plantules sont transférées dans les jarres de Leonard (Vincent, 1970) et inoculées avec 2 ml de chacune des souches bactériennes en phase exponentielle de croissance ($\text{DO} \approx 1$). Les jarres sont mises dans une chambre de culture sous des conditions contrôlées. Le test dure deux à trois mois. Les plantules sont prélevées pour évaluer la nodulation.

Tests distinctifs entre *Rhizobium* et *Agrobacterium* (Vincent, 1982)

Ce sont des tests qui permettent de distinguer le genre *Agrobacterium* du genre *Rhizobium*. Le test 3-cétolactose se base sur l'oxydation du C3 du glycosyl des saccharides et la recherche de l'enzyme 3-cétoglucosidase sur milieu lactosé (Bernaerts et De Ley, 1963). La présence du 3-cétolactose se manifeste par la formation d'un halo jaune de Cu_2O autour des colonies. Seules les souches de *Agrobacterium* spp. produisent l'enzyme 3-cétoglucosidase.

Le deuxième test est la précipitation du glycérophosphate de calcium ou les souches sont cultivées sur le milieu Mannitol-Calcium Glycérophosphate (Hofer, 1941). La croissance de *Agrobacterium* spp. sur ce milieu produit des colonies entourées d'un halo brunâtre et présentent un précipité clair, constitué probablement de phosphate tricalcique. *Rhizobium* spp, sur ce milieu, ne donnent lieu à aucun brunissement (réaction négative).

Le troisième test est la réduction protéolytique sur lait tournesolé Litmus milk (Vincent, 1970). La protéolyse acide ou alcaline se traduit par la présence d'un halo clair autour des colonies caractéristique des souches de *Rhizobium*.

Tableau 1 : Matériel biologique

	Souche	Plante- hôte	Origine géographique	Source
4	<i>R. sullae</i> RH44	<i>H.coronarium</i>	Espagne méridionale	A.Toffanin- Madrid
19	<i>R. sullae</i> RH19	<i>H.coronarium</i>	Sicile, Italie	S. Casella- Pise
A6	<i>Rhizobium sullae</i> sp. nov. RHA6	<i>H.coronarium</i>	Constantine, Algérie	A.Benguedouar
F	<i>R. sullae</i> RHF	<i>H.coronarium</i>	Pise, Italie	S. Casella- Pise
H	<i>R. sullae</i> HCNT1	<i>H.coronarium</i>	Volterra, Italie	S. Casella- Pise
I	<i>R. sullae</i> RHIS123	<i>H.coronarium</i>	Cadix, Espagne	F.J.Ollero- Seville
T	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolli</i> 843			B.J.Rolfe, Camberra
V	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 1003			Rothamstead Collection
HS1	<i>Pseudomonas</i> sp. NZ096	<i>H.s.ssp.capitatum</i>	Constantine, Algérie	Y.Benhizia
HS6	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>H.s.ssp.capitatum</i>	Constantine, Algérie	Y.Benhizia
HS15	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>H.s.ssp.capitatum</i>	Constantine, Algérie	Y.Benhizia
HP7	<i>Enterobacter kobei</i>	<i>H.pallidum</i>	Setif, Algérie	Y.Benhizia
HP10b	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>H.pallidum</i>	Setif, Algérie	Y.Benhizia
HP22a	<i>Escherichia vulneris</i>	<i>H.pallidum</i>	Setif, Algérie	Y.Benhizia
HP23	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>H.pallidum</i>	Setif, Algérie	Y.Benhizia
Hca1	<i>Pseudomonas</i> sp.KD	<i>H.carnosum</i>	Biskra, Algérie	Y.Benhizia
Hca4	<i>Pseudomonas</i> sp.523 11	<i>H.carnosum</i>	Biskra, Algérie	Y.Benhizia
HnA	Isolat	<i>H.naudinianum</i>	Setif, Algérie	Cette étude
HnM1	Isolat	<i>H.naudinianum</i>	Setif, Algérie	Cette étude
HnM2	Isolat	<i>H.naudinianum</i>	Setif, Algérie	Cette étude
HnN1	Isolat	<i>H.naudinianum</i>	Setif, Algérie	Cette étude
HnN2	Isolat	<i>H.naudinianum</i>	Setif, Algérie	Cette étude
HP	Isolat	<i>H.pallidum</i>	Setif, Algérie	Cette étude
HPSb+	Isolat	<i>H.pallidum</i>	Oum el Bouaghi, Algérie	Cette étude
HPSb-	Isolat	<i>H.pallidum</i>	Setif, Algérie	Cette étude
HS	Isolat	<i>H.s.ssp.capitatum</i>	Constantine, Algérie	Cette étude
scapt	Isolat	<i>H.s.ssp.capitatum</i>	Constantine, Algérie	Cette étude
car	Isolat	<i>H.carnosum</i>	Biskra, Algérie	Cette étude

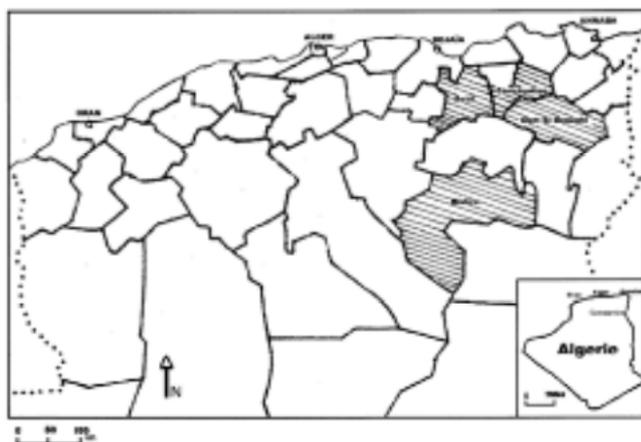


Figure 1 : Sites de collecte des différentes espèces de *Hedysarum*

Caractérisation phénotypique des souches

Caractéristiques culturelles

Elles ont été étudiées sur YMA ou YMB (Vincent, 1970). et incubation à 30 °C. Le temps d'apparition des premières colonies et les caractéristiques morphologiques sont relevées pour chaque souche.

Les besoins nutritionnels sont évalués en cultivant les souches sur le milieu YMA où le mannitol est remplacé par l'une des sources de carbone suivantes : xylose, arabinose, saccharose, fructose, galactose, raffinose, lactose, maltose, glucose puis le sorbitol et le citrate de Na., et pour la source d'azote, elles sont cultivées sur milieu défini 8 (Vincent, 1970) où le glutamate de sodium est remplacé par les différents acides aminés (valine, tyrosine, leucine, proline, thréonine, isoleucine, phénylalanine, tryptophane, lysine, glycine, sérine, histidine, arginine, méthionine, alanine, asparagine et cystéine).

La stimulation de croissance par les vitamines est évaluée en cultivant les isolats sur le milieu BIII (Dazzo, 1982) en changeant de vitamine et l'on compare ensuite les D.O. obtenues par la croissance des isolats sur BIII contenant toutes les vitamines testées (riboflavine, acide p-aminobenzoïque, acide nicotinique, biotine, thiamine-HCl, pyridoxine-HCl, panthoténate de Ca).

La recherche des enzymes spécifiques nécessaires pour la relation symbiotique (nitrate- réductase, uréase, pectinase et cellulase) est réalisée en cultivant les souches sur milieux de culture contenant les substrats spécifiques de ces enzymes (Struffi et coll., 1998).

La tolérance des souches aux différents facteurs abiotiques est testée sur le milieu liquide Yeast-Mannitol-Broth aux différentes valeurs de pH allant de 4.0 à 10.0, sur YMA et incubées aux températures de 4°C à 50°C et pour la salinité, les souches sont cultivées sur le milieu Lactate-aspartate de sodium (Gloux et Le Rudelier, 1989) avec différentes concentrations de NaCl allant de 0.5% à 10%.

Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques

Les concentrations inhibitrices sont déterminées en cultivant les bactéries sur le milieu TY (Beringer, 1974) contenant une gamme de concentrations de 0.5 à 5000 µg/ml des antibiotiques suivants : spectinomycine, erythromycine, rifampicine, gentamycine, streptomycine, kanamycine, chloramphenicol, acide nalidixique, et 0.5 à 6000 µg/ml des métaux lourds, HgCl₂, ZnCl₂, CuCl₂, Pb(CH₃COO)₂ et SbO₃.

Tolérance aux bactériophages

La méthode utilisée est celle de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben (1994) et est réalisée en deux étapes : l'isolement des bactériophages à partir des sols provenant des lieux de récolte des différentes espèces végétales du genre *Hedysarum* utilisées dans cette étude et l'analyse des phages en utilisant le milieu MNA (Vincent, 1970).

Détermination du profil protéique par SDS-PAGE

Le profil des protéines totales est déterminé par la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes SDS-PAGE (Laemmli, 1970). La caractérisation des souches par cette technique repose sur le degré de similitude entre les bandes polypeptidiques des isolats et des souches de référence.

Caractérisation moléculaire

La caractérisation moléculaire des souches isolées est réalisée au niveau du Département de Biotechnologie agricole de Padoue (Italie) sous la direction du Professeur A. Squartini selon le protocole expérimental décrit par Benhizia et coll. (2004).

Le protocole expérimental consiste à faire l'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction de l'ADNr 16S (ARDRA), qui est une méthode basée sur la PCR, permet d'obtenir plusieurs copies d'une zone spécifique de l'ADN et précisément de la région codée par l'ARN 16S. Un µl de lysat dilué contenant tout l'ADN des isolats bactériens est traité par un appareil de type PCR BioRad I-Cycler à l'aide des deux amorces bactériennes universelles cibles ADNr16S :

1. 63F (5'CAGGCCTAACACATGCAAGTC) (Marchesi et coll., 1998)
2. 1389R (5'ACGGGCGGTGTGTACAAG) (Osborn et coll., 2000).

L'utilisation de ces primers spécifiques permet d'amplifier un segment d'ADN d'environ 1300 paires de bases. Et en utilisant l'enzyme de restriction *CfoI* (enzyme obtenue à partir de la bactérie *Clostridium formicoaceticum* et dont le site de restriction est « GCG/C », Pharmacia, Upsal, Suède).

Le séquençage selon la méthode de Sanger consiste à synthétiser *in vitro* des brins d'ADN complémentaires à l'un des brins de l'ADN que l'on veut séquencer. Avant de

procéder au séquençage, l'ADN à analyser est purifié en utilisant le Kit Qiagen QIAquick PCR (Qiagen, GmbH, Hilden Allemagne, 1999). Le séquençage est effectué en utilisant deux amorces, la 63F et la 1389 R dans deux réactions séparées pour avoir une lecture dans les deux sens 5'- 3' et 3'- 5'.

Les fragments de l'ADNr 16S séquencés des souches étudiées sont comparés à l'ensemble des séquences déjà entreposées dans les bases de données, site web du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

RESULTATS ET DISCUSSION

Caractérisation phénotypique

L'aspect morphologique des 11 isolats sur les différents milieux de culture montre qu'ils ont une croissance rapide avec une production abondante des poly β -hydroxybutyrate (PHB). La croissance sur YMA-rouge Congo montre que les souches présentent une différence dans leur absorption du rouge Congo. Elles ne modifient pas le pH sur le milieu GPA et provoquent une réaction acide sur YMA-BTB en 24 heures. (Fig 2).

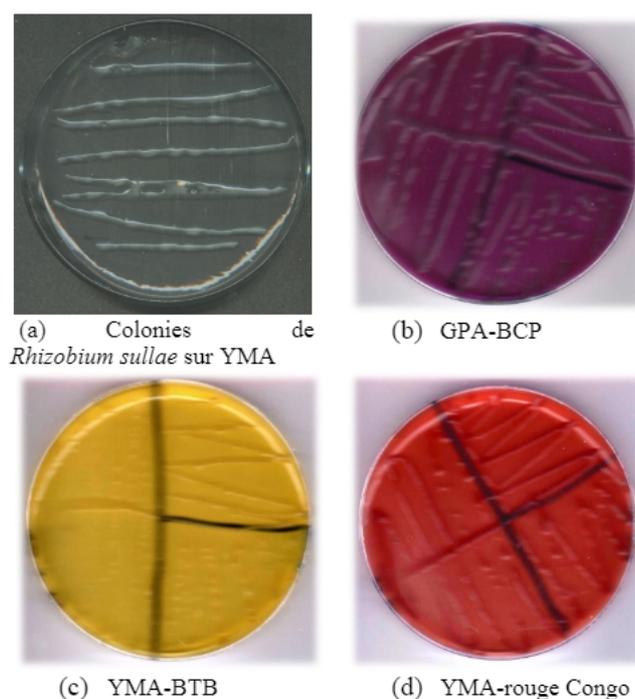


Figure 2 : Caractères cultureux.

Les résultats du test de nodulation montrent que les isolats sont infectifs et il y a une bonne stimulation de la partie racinaire et un bon développement de la partie aérienne. Ceci confirme la relation symbiotique entre les souches bactériennes et les plantes hôtes. Aussi la présence de la souche *R.sullae* en inoculant un couple de souches n'a pas d'influence sur la formation de nodules par les souches testées. (Fig3).

Les isolats ne produisent pas le 3-cétoglucosidase et ne donnent pas un précipité sur gélose au mannitol et au

glycérophosphate, montrant ainsi un résultat négatif avec les tests du 3-cétolactose et la précipitation du Ca-glycérophosphate, et confirme ainsi que nos souches n'appartiennent pas au genre *Agrobacterium*. Deux souches seulement (HnN1 et HnN2) qui ont donné un résultat positif sur le lait tournesolé qui se traduit par un halo clair autour des colonies.

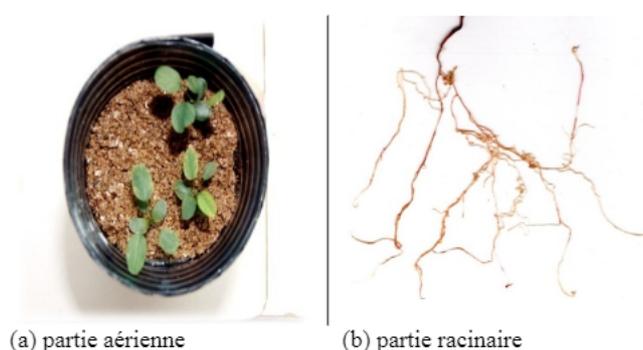


Figure 3 : développement de la plante *Hedysarum naudinianum*

Les résultats des tests nutritionnels montrent que les souches peuvent utiliser une large gamme de carbohydrates, peuvent pousser en présence de la majorité des acides aminés testés et n'exigent pas toutes les vitamines pour la croissance.

La recherche des enzymes spécifiques nécessaires pour la relation symbiotique démontre que les souches sont pourvues d'une nitrate réductase, uréase et pectinase. On remarque que la cellulase est présente seulement chez deux isolats (HnN1 et HnN2).

Les souches sont halotolérantes et peuvent résister à des concentrations élevées du NaCl arrivant jusqu'à 10%. Elles présentent une croissance optimale dans l'intervalle de 20 à 37 °C. Il apparaît aussi que des souches peuvent se développer à une température de 50°C. Les résultats de l'effet du pH révèlent la croissance des souches à des valeurs comprises entre pH 4 et pH 10 avec un optimum de croissance entre pH 6.5 et pH 7.5.

Toutes les souches tolèrent la présence de l'antimoine et leur sensibilité apparaît avec le mercure. Elles tolèrent différemment la présence du zinc, du cuivre et du plomb mais en général la concentration inhibitrice est observée à des concentrations élevées. Les souches sont résistantes à l'acide nalidixique, érythromycine et spectinomycine. Elles sont sensibles au chloramphénicol, kanamycine et rifampicine.

Les isolats et les souches de référence présentent un résultat négatif par rapport aux phages qui se traduit par l'absence de la zone de lyse

Après avoir obtenu les électrophorogrammes de chaque souche, nous avons effectué une analyse numérique pour la

caractérisation des souches. Ceci nous a permis d’obtenir le diagramme type qui englobe l’ensemble de bandes polypeptidiques de chaque souche et à partir des valeurs du coefficient de similitude Cs on a pu évaluer le degré de ressemblance et de différence entre les isolats et les souches témoins. Les résultats obtenus montrent que les isolats donnent un degré de similitude assez élevé avec les souches de référence appartenant à la classe des *Gammaproteobacteria* (Fig4) (Tab2).

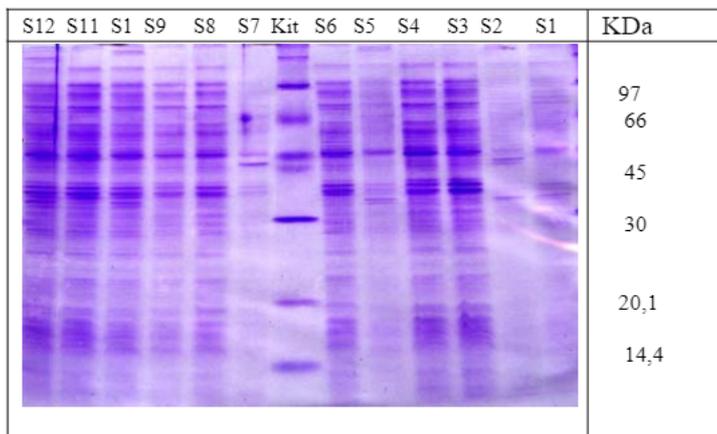


Figure 4: profils protéiques des différentes souches

Souches isolées : S1(HP), S2 (HS), S3 (Hcar), S4 (HnA), S5 (HnM1), S6 (HnN1).
 Souches de référence : *Gammaproteobacteria* [S7(HP23), S8 (HS1),S9(Hca1)], *Rhizobia* [S10(A6), S11(T), S12 (V)]

Tableau 2 : Coefficient de similitude entre les isolats et les souches témoins

		Isolats					
		S1	S2	S3	S4	S5	S6
Témoins	S7	66.6	64.1	53.8	53.8	71.7	61.5
	S8	51.2	46.1	71.7	71.7	48.7	79.4
	S9	56.4	46.1	79.4	79.4	58.9	89.7
	S10	56.4	48.7	76.9	76.9	61.5	82
	S11	41	41	66.6	66.6	43.5	74.3
	S12	46.1	43.5	56.4	56.4	43.5	51.2

Analyse numérique de la caractérisation phénotypique

L’ensemble des résultats obtenus de la caractérisation phénotypique est traité par une analyse numérique avec l’aide d’un logiciel statistique Minitab, mettant en évidence de tous les caractères phénotypiques. Les matrices des données donnent comme résultat un dendrogramme qui indique la consistance phénotypique des souches. Les résultats obtenus à partir des caractères étudiés montrent une très forte similitude et par conséquent le dendrogramme ne fait pas ressortir une distinction appréciable (Fig5).

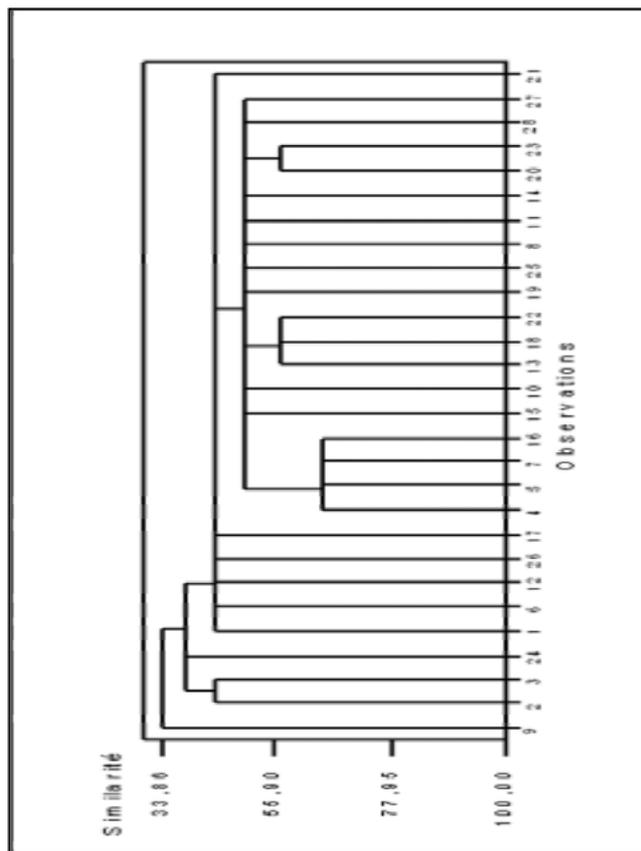


Figure 5 : Dendrogramme des caractères phénotypiques

Caractérisation moléculaire

Les isolats ont fait l’objet d’une étude moléculaire en les analysant par la technique de l’ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) en utilisant l’enzyme de restriction *CfoI*. Les résultats de cette analyse donnent des profils qui semblent similaires mais ne sont pas très significatifs du fait qu’on a obtenu des impuretés avec les souches analysées. Le séquençage de l’ADNr16S montre que les souches analysées appartiennent à la classe des *Gammaproteobacteria* spécifiquement les espèces de *Pseudomonas sp* et *Pantoea agglomerans*. (Fig6) (Tab2).

CONCLUSION

L’espèce *H. naudiniamum* est une autre espèce de légumineuses qui semble avoir une infection bactérienne non rhizobiale, et les résultats obtenus supposent l’existence des bactéries appartenant à la classe *Gammaproteobacteria* dans l’association symbiotique des deux partenaires.

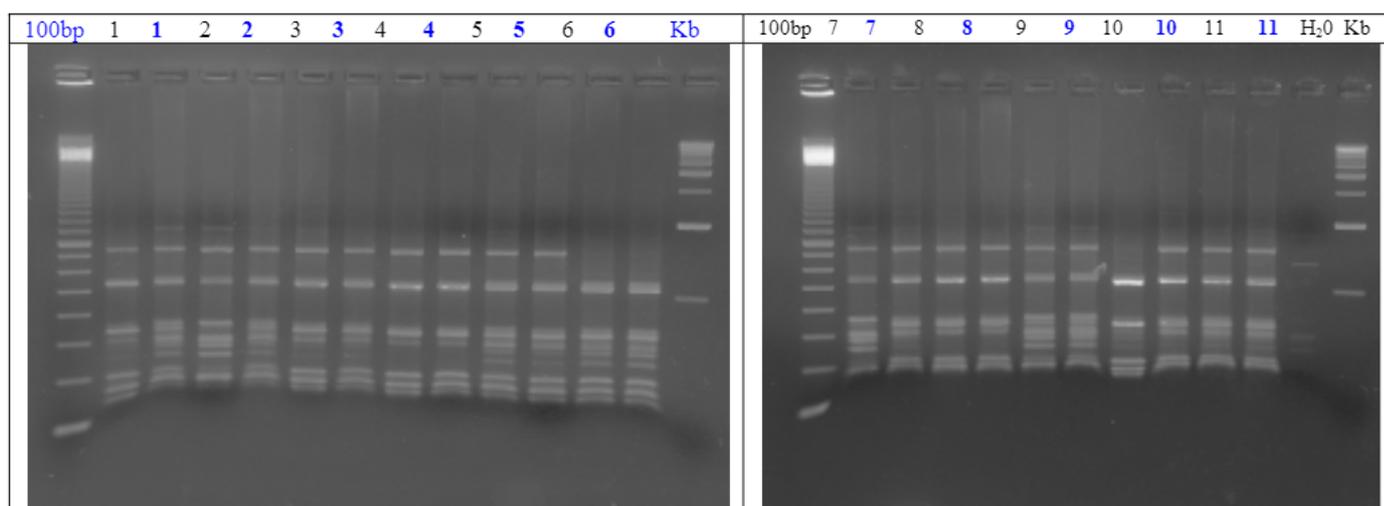


Figure 6 : Profils électrophorétiques sur gel d'agarose de l'ARDRA.

Isolats : 1/1(HnA), 2/2(HnM1), 3/3(HnM2), 4/4(HnN1), 5/5(HnN2), 6/6(HP), 7/7(HPSb+), 8/8(HPSb-), 9/9(HS), 10/10(Hscapt), 11/11(Hcar).

Tableau3 : Résultats du séquençage ADNr 16S (*A. Squartini*)

Plante hôte	Isolats	Espèce correspondante
<i>H. naudiniamum</i>	1 noir (HnA)	<i>Panotoea agglomerans</i>
<i>H. naudiniamum</i>	2 noir (HnM1)	<i>Pseudomonas</i> sp
<i>H. pallidum</i>	6 noir (HP)	<i>Panotoea agglomerans</i>
<i>H. spinossissimum</i>	9 noir (HS)	<i>Pseudomonas</i> sp
<i>H. spinossissimum</i>	10 noir (Hscapt)	<i>Panotoea agglomerans</i>
<i>H. carnosum</i>	11 noir (Hcar)	<i>Panotoea agglomerans</i>

REFERENCES

- [1]- Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A., Squartini A., (2004). Gammaproteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *System.Appl.Microbial* . **27** : 462-468.
- [2]- Beringer J. E. (1974). R-Factor transfer in rhizobium legume. *J. Gen. Microbiol.*, **84**: 188-198.
- [3]- Bernaerts J. E. ; De Ley J. (1963). A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature*. **199**: 406-407.
- [4]- Chen W.M., Laevens S., Lee T.M., Coenye T., De Vos P., Mergeay M., Vandamme P., (2001). *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1729-1735.
- [5]- Dazzo F.B. (1982). Leguminous root nodules, pp. 431-446. *In*: Experimental Microbial Ecology (R. Burns, J. Slater, eds.) Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- [6]- Gage D.J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol.Rev.* **68** (2): 280-300.
- [7]- Gloux K ., Le Rudulier D. (1989). Transport and catabolism of proline betaine in salt stressed *Rhizobium meliloti*. *Arch.microbial.***151** : 143-148.
- [8]- Hannachi-Salhi A., Combes D., Baatout H., Figier J., Boussaid M., Marrakchi M., Trifi-farah N. (2004). Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen. IPGRI – FAO, **130**: 65 - 72.

- [9]- Hofer A. V. (1941). A characterization of *Bacterium radiobacter* (Beijerinck and Van Delden). *J. Bacteriol.* **41**(2): 193-224.
- [10]- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- [11]- Marchesi J.R., Sato T., Weightman A. J., Martin T.A., Fry J.C., Hiom, S.J., Wade, W.G. (1998) - Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 795-799.
- [12]- Moulin L., Munive A., Dreyfus B & Boivin-Masson C.(2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature.* **411**: 948-950.
- [13]- Osborn A.M., Moore E.R.B., Timmis K.N. (2000) - An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* **2**: 39-50.
- [14]- Quezel P., Santa S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Ed. Paris, France.
- [15]- Somasegaran P., Hoben H.J. (1994). Handbook for *Rhizobia*. Springer verlage New York. Inc p.450
- [16]- Struffi, P.; Corich, V.; Giacomini, A.; Benguedouar, A.; Squartini, A.; Casella, S.; Nuti, M.P.(1998) – Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *J. Appl. Microbiol.* **84** : 81-89
- [17]- Vincent J. M. (1970). The manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford, United Kingdom.
- [18]- Vincent J. M. (1982). Nitrogen fixation in legumes. Academic Press Australia.

