

Effet du sel sur des isolats de *Sinorhizobium* sp. de Tunisie *in vitro* ou en association avec *Medicago* sp.

Moez Jebara, Mohamed Elarbi Aouani, Ridha Mhamdi, Rachid Ghrir, Mohamed Mars

La salinité et la sécheresse constituent des contraintes majeures limitant considérablement la productivité végétale sur 40 % de la surface terrestre, notamment en régions méditerranéennes [1]. La tolérance des végétaux aux sels est un phénomène complexe qui implique des particularités morphologiques et développementales avec des mécanismes physiologiques et biochimiques variés. La salinité et la sécheresse ont des effets délétères sur la croissance et la survie des populations rhizobiennes dans le sol [2], sur le développement et le fonctionnement des nodosités et, donc, sur la capacité fixatrice de l'association symbiotique. La survie et la croissance des légumineuses en condition de contrainte hydrique ou saline est liée à des processus adaptatifs liés au transport et à la compartimentation des ions, à la biosynthèse et l'accumulation d'osmolytes organiques qui participent à l'ajustement osmotique et à des remaniements protéiques nécessaires au maintien de l'intégrité cellulaire.

En Tunisie, où les zones semi-arides et arides représentent 90 % de la surface totale, la culture des *Medicago* spp. endémiques reste aléatoire suite à la sécheresse et à la salinité. Ces *Medicago* spp.

fournissent un fourrage de qualité et participent à l'amélioration des parcours ; leur association avec les bactéries symbiotiques du genre *Sinorhizobium* enrichit le sol en composés azotés y compris au profit des cultures subséquentes [3]. Bien que les *Rhizobium* soient utilisés en agriculture depuis près d'un siècle et que de nombreux travaux aient été consacrés à leur étude dans les sols, les résultats acquis sont le plus souvent difficiles à interpréter et fréquemment contradictoires. À l'état libre ou associés aux légumineuses, les *Rhizobium* sont en effet influencés par l'environnement (pH, température, oxygène dissous, humidité du sol) [4, 5].

Le métabolisme azoté et la synthèse protéique sont très affectés par le stress salin qui affecte à la fois les populations rhizobiennes, la légumineuse hôte et la relation symbiotique. L'initiation nodulaire est extrêmement sensible au NaCl par réduction des sites d'infection de la racine, du nombre des poils radiculaires et de la proportion de ceux qui portent les cordons d'infection [6]. Lors d'un stress salin chez la luzerne, un épaississement important des cortex nodulaires externe et interne est observé. Parallèlement, les cellules non infectées contiennent de très nombreux amyloplastes, alors que ceux-ci sont quasiment absents des nodules en présence de NaCl [7].

L'étude de la tolérance à NaCl d'une collection de *Sinorhizobium* nodulant les *Medicago* spp. et de la symbiose de différentes souches de *Sinorhizobium* avec *Medicago sativa* cv Gabes fait l'objet du présent travail.

Matériels et méthodes

Les *Sinorhizobium* nodulant les *Medicago*

Une collection locale de *Sinorhizobium* a été réalisée à partir de 60 échantillons de sol provenant de sites couvrant différents étages bioclimatiques de la Tunisie (figure 1). *Medicago sativa* cv Gabes, *M. scutellata* cv Kelson, *M. truncatula* et *M. ciliaris* sont cultivées en pots de plastique contenant du sol à raison de quatre pots par espèce et trois plantes par pot. Après huit semaines de culture à 25 °C le jour, 18 °C la nuit et sous 80 % d'humidité relative, 720 nodules ont été prélevés et utilisés pour l'isolement des bactéries à raison de trois nodules par plante [8]. L'identification des rhizobia a été faite par un test de nodulation sur *Medicago sativa* cv Gabes.

Caractéristiques des souches de *Sinorhizobium*

L'analyse du profil de résistance au sel des *Sinorhizobium in vitro* est menée sur milieu solide en boîte de Petri par l'utilisation d'un répliqueur manuel à partir d'une pré-culture sur milieu liquide YEM [9] aux concentrations de 0,15 ; 0,3 ; 0,5 et 0,7 mole de NaCl. Après trois jours d'incubation à 28 °C, la croissance bactérienne est comparée au

M. Jebara, M.E. Aouani, R. Mhamdi, R. Ghrir, M. Mars : Laboratoire de biochimie végétale et symbiotes (LAF 310), Institut national de recherche scientifique et technique, BP 95 – CP 2050 Hammam-lif, Tunisie.

Tirés à part : M. Jebara

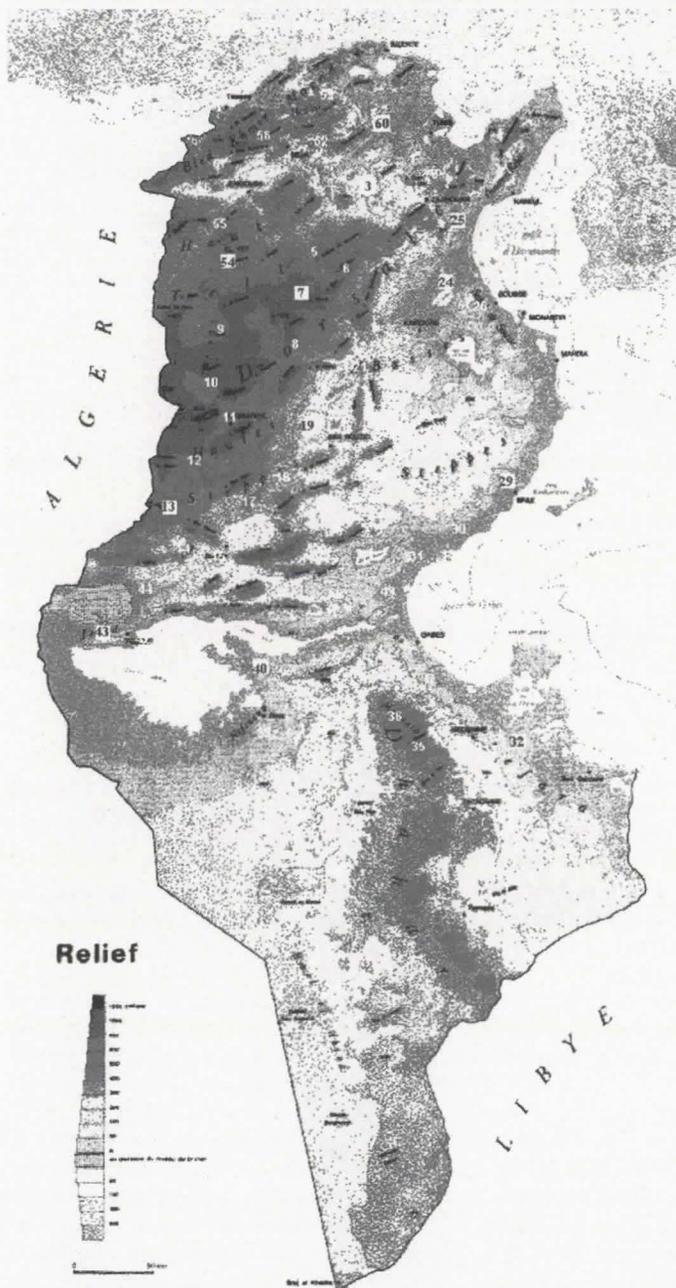


Figure 1. Origine géographique des isolats de *Sinorhizobium* de Tunisie.

Figure 1. Geographical location of *Sinorhizobium* isolates from Tunisia.

témoin sans NaCl. L'étude a été poursuivie avec 12 isolats choisis parmi les différentes classes de tolérance. Des cellules bactériennes (10^9) sont inoculées en Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de milieu puis maintenues à 28 °C sous agitation à 150 tr/min. La croissance bactérienne est suivie par mesure périodique de la densité optique à 600 nm. L'analyse de la composition plasmidique a été effectuée d'après la méthode d'Eckhardt [10] à partir d'isolats cultivés en milieu TY [11]. La séparation est faite en

gel d'agarose à 0,6 % pendant 5 heures (5V/cm) en utilisant des plasmides de *Sinorhizobium meliloti* SU47 et *Agrobacterium tumefaciens* PD67 comme standard de poids moléculaire. Chaque isolat a été testé dans quatre gels séparés avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,985.

L'ADN total bactérien est extrait selon la méthode de Laguerre *et al.* [12]. Dix microgrammes d'ADN sont digérés avec 20 unités d'enzyme de restriction (*Bam*HI et *Eco*RI) par incubation à

37 °C pendant une nuit. La migration est effectuée sur gel d'acrylamide 7,5 % (w/v) à 5 mA pendant 19 h. La coloration au nitrate d'argent est effectuée selon Luciana *et al.* [13].

L'étude de l'efficacité symbiotique des isolats de *Sinorhizobium* a été effectuée en pots de plastiques avec un support gravier/vermiculite (4/1) en condition d'asepsie totale. L'irrigation est effectuée avec une solution nutritive stérile dépourvue d'azote [14]. Trois témoins sont inclus dans cet essai : un témoin azoté (70 ppm N-NO₃), un témoin non inoculé et un témoin inoculé avec la souche de référence SU47. L'effet du NaCl sur l'association plante-*Rhizobium* a été étudié aux concentrations de 0,09 et 0,18 mole.

Résultats et discussion

Collection locale de *Sinorhizobium* et analyse de l'effet du NaCl

Les tests de nodulation ont permis de constituer une collection de 462 isolats de *Sinorhizobium* : 123 à partir de nodules de *Medicago sativa* cv Gabes, 113 isolats de *M. scutellata* cv Kelson, 123 isolats provenant de *M. truncatula* et 103 isolés de *M. ciliaris*.

Sur le plan de la tolérance au NaCl, trois grands groupes d'isolats ont pu être distingués : huit isolats sensibles ne tolérant pas plus de 0,15 mole de NaCl ; quatre isolats résistants capables de supporter des concentrations supérieures à 0,7 mole ; les isolats restants, de tolérance intermédiaire, dont 72 % tolèrent des concentrations supérieures ou égales à 0,5 mole de NaCl.

Caractéristiques des isolats

Un échantillon de 12 isolats (4 tolérants, 4 sensibles et 4 intermédiaires) a servi à l'étude de la cinétique de croissance sur milieu liquide YEM (*figure 2*). Les isolats tolérants à NaCl croissent plus rapidement, les sensibles ont la croissance la plus lente [15]. Les 12 isolats analysés possèdent des plasmides géants avec des profils à une, deux ou trois bandes

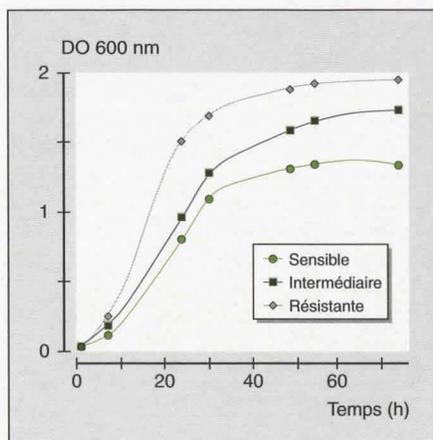


Figure 2. Cinétique de croissance *in vitro* de *Sinorhizobium* sp. présentant des tolérances différentes vis-à-vis de NaCl.

Figure 2. Growth of isolates of *Sinorhizobium* sp. with different salt tolerance.

(figure 3), constituant 8 types plasmidiques avec au moins un mégaplasme ($> 1\ 500\text{ kb}$), souvent caractéristique de *Sinorhizobium meliloti*. En dépit de l'implication des plasmides dans nombre de caractéristiques phénotypiques chez *Sinorhizobium* [15], on n'observe pas de corrélation avec la tolérance au NaCl.



Figure 3. Profil plasmidique d'isolats de *Sinorhizobium* sp. (marqueur de PM : a = SU47, b = CFN 42) après électrophorèse en gel d'agarose.

Figure 3. Plasmid profiles of *Sinorhizobium* sp. isolates after agarose gel electrophoresis (MW markers of a = SU47, b = CFN 42).

L'analyse comparative du profil de restriction de l'ADN total (figure 4) montre qu'il s'agit de 12 souches différentes du genre *Sinorhizobium*.

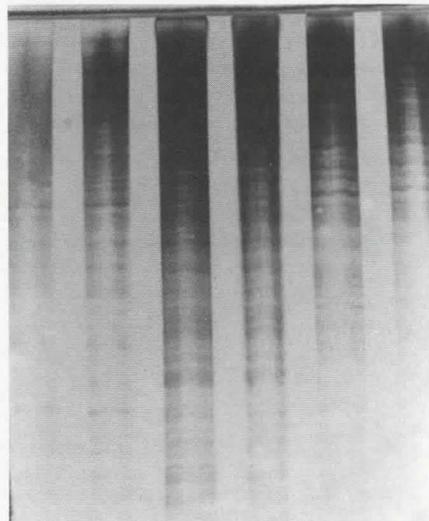


Figure 4. Profil de restriction de l'ADN total d'isolats de *Sinorhizobium*.

Figure 4. Restriction pattern of total DNA of *Sinorhizobium* isolates.

Effet du NaCl sur l'association *Sinorhizobium-Medicago*

L'étude a été conduite sur l'association de *Medicago sativa* cv Gabes avec 6 souches de *Sinorhizobium* issues des trois groupes de tolérance à NaCl en comparaison avec la souche de référence SU47. L'étude a porté sur le nombre de nodules et le poids de matière sèche des parties aériennes.

Les souches locales ont été moins nodulantes que la souche de référence SU47 (figure 5), aussi bien chez les témoins que chez les plantes traitées au sel. Parmi les bactéries locales les souches E et F (les plus sensibles à l'état libre) ainsi que la souche tolérante D sont les plus affectées avec une réduction du nombre de nodules de 30 à 60 % aux concentrations 0,09 et 0,18 mole de NaCl.

La matière sèche (MS) des plantes entières (figure 6) n'est pas corrélée avec le nombre de nodules. La souche locale F est la plus performante tandis que SU47 est équivalente à la plupart des autres souches locales. Le traitement salin entraîne (dès 0,09 mole de NaCl) une chute de MS

Summary

Effect of salt on *Sinorhizobium* sp. isolates from Tunisia either *in vitro* or in association with *Medicago* sp.

M. Jebara, *et al.*

In Tunisia, forage production, particularly in marginal zones, is limited by drought and salinity which affects more than 10% of soils. Because of their symbiotic nitrogen fixation in association with rhizobia, legumes like medics, are important in forage production and soil fertility. An evaluation of the impact of salt on such symbiotic association was performed.

*We collected 462 local isolates of *Sinorhizobium* and studied their salt tolerance in vitro and the effect of NaCl on their interactions with *Medicago sativa* cv Gabes.*

*Three groups (salt tolerant, salt sensitive and intermediate) were identified, among which 4 isolates were tolerant in vitro to 0.7 M NaCl. The plasmid profile analysis of 12 isolates representing different sites and degrees of in vitro salt tolerance showed patterns with one, two or three bands. All isolates had at least one 1,500 Kb megaplasmid characteristic of *Sinorhizobium meliloti* (figure 3). Salt tolerance of the 12 isolates did not correlate with their plasmid profiles.*

*Restriction patterns of total DNA (figure 4) showed differences between strains of *Sinorhizobium*, and were more discriminant in this respect.*

*Salt effect on associated *Medicago sativa* cv Gabes and 6 strains of *Sinorhizobium* was analysed (figure 5).*

*Inoculation with a local *Sinorhizobium* isolate gave a better vegetative growth of *Medicago* than the reference strain SU47 (figure 6). Salt decreased plant growth and nodulation for all associations.*

Salt effect on the yield of dry matter or on the nodulation was not correlated with in vitro tolerance of nodulating rhizobia neither with their plasmid profiles or DNA pattern.

Cahiers Agriculture 2000 ; 9 : 99-102.

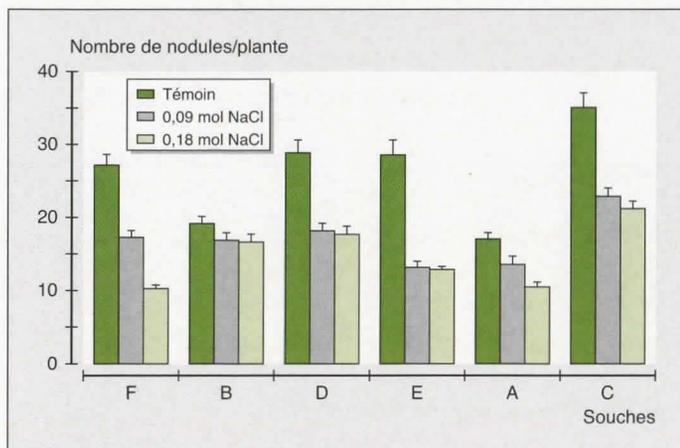


Figure 5. Effet du NaCl sur la nodulation de *Medicago sativa* par des isolats locaux de *Sinorhizobium*. B : souche intermédiaire ; E, F : souches sensibles ; A, D : souches tolérantes ; C : souche de référence SU47.

Figure 5. Effect of salt on nodulation of *Medicago sativa* by local isolates of *Sinorhizobium*.

pour toutes les symbioses, qui varie entre les souches sans être associée à la diversité génétique ni à la tolérance de la salinité des bactéries *in vitro* contrairement à ce qui est observé pour d'autres espèces végétales [1].

Conclusion

L'association de *Sinorhizobium* avec *M. sativa* cv Gabes a montré une différence de réponse à la salinité (aussi bien au niveau du nombre de nodules que du poids en MS) qui n'est pas corrélée avec la tolérance des souches *in vitro*, ni avec les paramètres biochimiques des souches bactériennes. En conditions naturelles, les souches pourraient présenter une différence de comportement liée à leurs interactions avec les facteurs physico-chimiques ■

Remerciements

Les auteurs remercient le Secrétariat d'État à la Recherche scientifique et à la Technologie de Tunisie PNM (P96BAP25) et l'Agence universitaire de la francophonie (laboratoire associé francophone : 310) pour leur apport financier.

Références

1. FAO. Programme de coopération technique. Programme de développement des productions fourragères et de l'élevage. Rapport de synthèse, 1988 ; 45 p.

2. Singleton PW, El Swaify SA, Bohlool BB. Effect of salinity on the *Rhizobium* growth and survival. *Appl Environ Microbiol* 1982 ; 44 : 884-90.

3. Long SR. *Rhizobium*-legume nodulation : life together in the underground. *Cell* 1989 ; 56 : 203-14.

4. Bekki A, Trinchant JC, Rigaud J. Nitrogen Fixation (C_2H_2 reduction) by *Medicago* nodules and bacteroids under sodium chloride stress. *Physiol Plantarum* 1987 ; 71 : 61-7.

5. Fougère F, Le Rudulier D, Streeter JG. Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* 1991 ; 96 : 1228-36.

6. Zahran HH, Sprent JI. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* 1986 ; 167 : 303-9.

7. Le Rudulier D, Gloux K, Poggi MC, Noël JP. Accumulation, biosynthesis and fate of proline betaine in nodulated alfalfa plants (*Medicago sativa* L.) subjected to salinity stress. In : Leigh RA, Blake-Kalff MMA, eds. *Proceedings of the 2nd Stress Net Conference, Salsomaggiore*. European Commission VI, 1995 ; 257-62.

8. Beck DP, Materon LA, Afandi F. *Practical Rhizobium-Legume Technology Manual*. Aleppo, Syria : ICARDA Box 5466, 1993 ; 170 p.

9. Vincent JM (1970). *A manual for practical study of root-nodule bacteria*. Oxford, IBP handbook 15, Blackwell scientific publications, 1970 ; 164 p.

10. Eckhardt TA. Rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1978 ; 1 : 584-8.

11. Beringer JE. R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 1974 ; 84 : 188-98.

12. Laguerre G, Mazurier SI, Amarger N. Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. *FEMS Microbiol Ecol* 1992 ; 101 : 17-26.

13. Luciana G, Stefano V, Bazzicalupo M, Fani R, Materassi R. DNA restriction fingerprint analysis of the soil bacterium *Azospirillum*. *J Gen Microbiol* 1990 ; 136 : 1161-6.

14. Broughton WJ, Dilworth MJ. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J* 1971 ; 125 : 1075-80.

15. Velazquez E, Mateos PF, Pedrero P, Dazzo FB, Martinez-Molina E. Attenuation of symbiotic effectiveness by *Rhizobium meliloti* SAF22 related to the presence of a cryptic plasmid. *Appl Environ Microbiol* 1995 ; 61 : 2033-6.

Résumé

Une collection locale de 462 isolats de *Sinorhizobium* prélevés dans 60 sites couvrant différents étages bioclimatiques de la Tunisie a été établie. L'effet du NaCl sur la croissance bactérienne *in vitro* distingue 8 isolats ne tolérant pas plus de 0,15 mole de NaCl, 4 isolats tolérants se multipliant à des concentrations supérieures à 0,7 mole et des isolats à résistance intermédiaire. La cinétique de croissance, le profil plasmidique et le profil de restriction de l'ADN total de 12 isolats ont permis de conclure qu'il s'agissait de souches distinctes. La nodulation sur *Medicago sativa* cv Gabes est variable et différemment affectée par NaCl. Le comportement des plantes nodulées n'est corrélé ni avec la tolérance des bactéries à NaCl *in vitro* ni avec leurs caractéristiques plasmidiales ou génomiques.