

Analyse de la diversité des rhizobiums nodulant trois morphotypes Nigériens de Voandzou (*Vigna Subterranea* (L.) Verdc.) par la technique de PCR-RFLP

[Diversity analysis of rhizobia nodulating three Nigerien morphotypes of Bambara groundnut (*Vigna Subterranea* (L.) Verdc.) By the PCR-RFLP technique]

Amadou HAROUNA ISSA¹, Hadjara AMADOU HASSANE¹, Agali ALHASSANE¹, Mansour ABDU MAMAN², and Zoubeirou ALZOU MAAYAKI¹

¹Département de Biologie, Faculté des Sciences et Techniques, Université Abdou Moumouni, BP 10662 Niamey, Niger

²Département de Production Durable des Cultures, Université de Tillabéri, Niger

Copyright © 2018 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: Bambara groundnut [*Vigna Subterranea* (L.) Verdc.], plays an important role in increasing the bioavailability of phosphorus even in ferrolsoils through its ability to fix atmospheric nitrogen and gives an average yields ranging from 350 to 800 kg / ha in areas where soil is poor and rainfall is low. This ability to bind atmospheric nitrogen by legumes such as Bambara groundnut [*Vigna subterranea* (L.)] is due to the presence of root nodules harboring colonies of Rhizobium, symbiotic bacteria. Indeed, it has been showed some diversity in the isolated nodules from the same legume and proved that, apart from the genetic difference, some strains are more efficient, more competitive than others. The objective of this study is to evaluate the diversity of the nodulating rhizobia of Bambara groundnut morphotypes of Niger. For that, the PCR / RFLP technique was used to identify the polymorphism between rhizobium strains isolated from the root nodules of three (3) morphotypes (Ne-01, Ne-09 and Ne-10) cultivated at two sites (Tara and Kollo) of two different agro-ecological areas. The analysis revealed a high diversity within populations of rhizobia nodulating of *Vigna Subterranea* L. A total of twenty five (25) types of IGS profiles were identified from the 68 samples analyzed with 4 dominant types (II, XI, XIV and XVI). In general, the same types of IGS for the same morphotype at both sites were observed. It also appeared that the growing area has an impact on rhizobia diversity. Thus, it has been shown that the genetic diversity of rhizobia populations is much higher in Tara (20/25 types identified) compared to Kollo (12/25 types). The distribution of rhizobia populations capable of nodulating the *Vigna Subterranea* L. was depended not only at the morphotype but also at the growing area.

KEYWORDS: Bambara groundnut, diversity, rhizobium, PCR / RFLP, Niger.

RÉSUMÉ: Le voandzou joue un rôle important sur l'augmentation de la biodisponibilité du phosphore même dans les ferralsols par le biais de sa capacité de fixation de l'azote atmosphérique et donne des rendements moyens allant de 350 à 800 kg/ha dans les régions où le sol est pauvre et la pluviométrie faible. Cette faculté de fixation de l'azote atmosphérique par les légumineuses comme le Voandzou [*Vigna subterranea* (L.)], est due à la présence de nodosités racinaires hébergeant des colonies de Rhizobium, bactéries symbiotiques. En effet, il a été démontré une diversité au sein de nodules isolés provenant de la même légumineuse et prouvé que, hormis la différence génétique, certaines souches sont plus efficaces, plus compétitives que d'autres. L'objectif de cette étude est d'évaluer la diversité des Rhizobiums nodulants des morphotypes de voandzou du Niger. Pour ce faire la technique PCR/RFLP a été utilisée afin d'identifier le polymorphisme existant entre souches de rhizobium isolés à partir des nodules racinaires de trois (3) morphotypes (Ne-01, Ne-09 et Ne-10) de voandzou cultivés sur deux sites (Tara et Kollo) de deux zones agro-écologiques différentes. L'analyse a révélé une diversité élevée au sein des populations de rhizobia nodulant de voandzou. A total vingt-cinq (25) types de profils IGS ont été identifiés sur les 68 échantillons analysés avec 4 types (II, XI, XIV et XVI) dominants. De façon générale, les mêmes types d'IGS pour le même

morphotype sur les deux sites ont été observés. Il ressort également que la zone de culture a un impact sur la diversité des rhizobia. Ainsi, elle a montré que la diversité génétique des populations de rhizobia est beaucoup plus élevée à Tara (20/25 types identifiés) comparativement à Kollo (12/25 types). La distribution des populations de rhizobia capables de noduler le voandzou dépende non seulement du morphotype également du site de culture.

MOTS-CLEFS: Voandzou, diversité, rhizobium, PCR/RFLP, Niger.

1 INTRODUCTION

En Afrique, le voandzou est la troisième légumineuse alimentaire la plus importante en terme de production et de consommation après l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) et le niébé (*Vigna unguiculata* L Walp.) (Yaya et al, 2013). C'est une plante hautement calorique (387 kcal/100 g), riche en vitamines, en éléments minéraux et en protéines (Minka et Bruneteau, 2000 ; Amarteifio et al. 2006 ; Onwubiko et al., 2011).

Les protéines contenues dans les graines de voandzou ont une teneur élevée en lysine et leur association avec les céréales dans l'alimentation, constitue un complément nutritionnel pour de nombreuses populations locales qui ne peuvent faire face aux coûts élevés des protéines animales (Massawe et al., 2005, Ndiang et al., 2012). Il possède également des vertus thérapeutiques bien connues des populations locales (Sévérin et Yao, 2011). Le voandzou joue un rôle sur l'augmentation de la biodisponibilité du phosphore même dans les ferralsols par le biais de sa capacité de fixation de l'azote atmosphérique (Andriamananjara, 2011) et donne des rendements moyens allant de 350 à 800 kg/ha dans les régions où le sol est pauvre et la pluviométrie faible (Sévérin et Yao, 2011; Yaya et al. 2013 ; Harouna et al., 2014). Cette faculté de fixation de l'azote atmosphérique par les légumineuses telles que le niébé [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], et le Voandzou [*Vigna subterranea* (L.) Verds.], est due à la présence de nodosités racinaires hébergeant des colonies de Rhizobium, bactéries symbiotiques (Alzouma et al., 2012). En effet, il existe une relation de symbiose, où la plante fournit une alcôve protectrice et de l'énergie aux bactéries qui, à leur tour, synthétisent de l'ammoniac en azote utilisable par la plante l'hôte et cette symbiose présente donc un intérêt pour les agriculteurs (Galibert et al. 2001, Alzouma et al., 2012).

Des études antérieures (Zang et al. 1991, Sy, 1995, Alzouma et al., 2012) ont montré une diversité au sein de nodules isolés provenant de la même légumineuse. Il a été prouvé que, hormis la différence génétique (Séguin et al. 2001), certaines souches sont plus efficaces, plus compétitives que d'autres (Amarger et Lobreau, 1982, Triplett et Sadowsky, 1992). Une maîtrise de la diversité des rhizobiums spécifiques au voandzou, permet non seulement d'optimiser le rendement du voandzou, mais aussi de fertiliser les sols hôtes en azote réduit ou assimilable pour les cultures à venir. L'objectif de cette étude est d'évaluer la diversité des Rhizobiums nodulants les morphotypes de voandzou du Niger.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL

Le matériel végétal est constitué de nodules racinaires provenant de trois (3) morphotypes nigériens de voandzou (*Vigna subterranea*) qui sont les Ne-01, Ne-09 et Ne-10 (Harouna et al. 2014). Ces morphotypes diffèrent par leurs morphologies, leurs importances et leurs distributions (Figures 1, 2 et 3). Les souches de rhizobiums ont été isolées à partir des nodules de chacun de ces morphotypes.

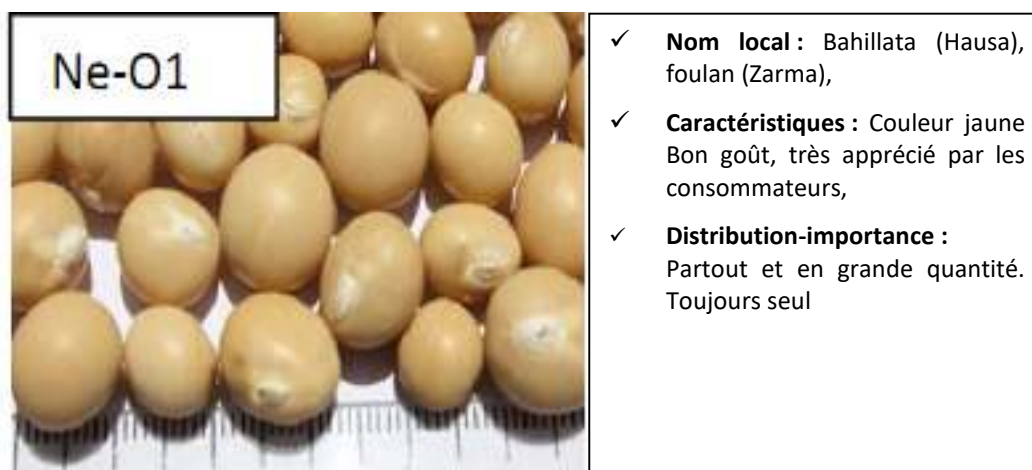


Fig. 1. Morphotype : Ne-01

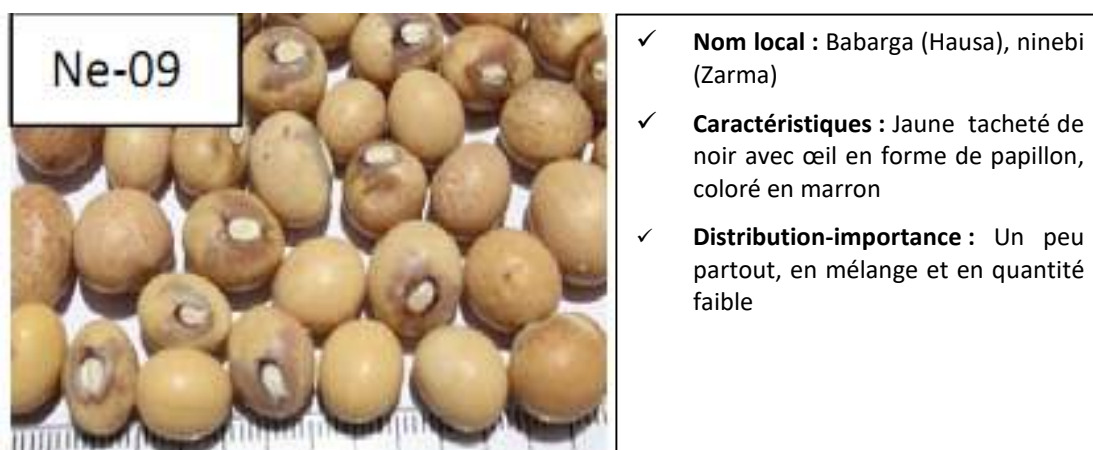


Fig. 2. Morphotype Ne-09

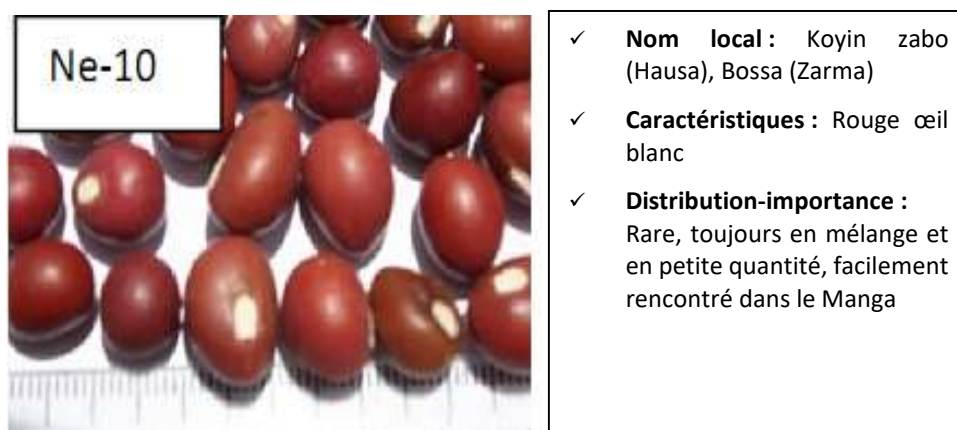


Fig. 3. Morphotype Ne-10

2.2 PRÉSENTATION DES SITES D'EXPÉRIMENTATION

Deux sites d'expérimentation ont été utilisés : le site de N'Dounga-Kollo situé à 30 km de Niamey sur la rive gauche du fleuve Niger. Le climat de la zone d'étude est de type Sahélien, avec en moyenne 400-600 mm de pluie par an.

Le second site est celui de Tara, situé dans le département de Gaya (région de Dosso) à 300 km de Niamey. Le climat de la zone d'étude est de type soudanien avec une moyenne pluviométrique de 600-900 mm de pluie par an.

Le dispositif expérimental est un bloc randomisé. Le semis a été effectué le 11 juillet 2014 à N'Dounga (Kollo) et le 22 juillet à Tara (Gaya). Les graines des 3 morphotypes de voandzou (*Vigna subterranea* (L.)) sont semées en ligne en raison de 7 poquets/morphotype et une graine par poquet. Les poquets sont distants de 50 cm et les lignes distantes de 80 cm.

2.3 MÉTHODES

RÉCOLTE DES NODOSITÉS

Les semis et les récoltes ont été effectués à des périodes différentes sur les deux sites :

- Pour le site de N'Dounga-Kollo, les nodosités ont été récoltées le 08 août 2014, soit 28 jours après semis.
- Pour le site de Tara-Gaya, les nodosités ont été récoltées le 04 septembre 2014, soit 44 jours après le semis.

La récolte consiste en l'arrachage aléatoire de 3 pieds de chaque morphotype suivant un diamètre d'environ 30 cm et à une profondeur d'environ 20 cm du sol à l'aide d'une pioche de façon à recueillir toute la rhizosphère. Chaque pied est soigneusement lavé à l'eau courante, puis les nodosités sont détachées et placées dans des enveloppes marquées par des lettres attribuées à chaque morphotype (figure 4).

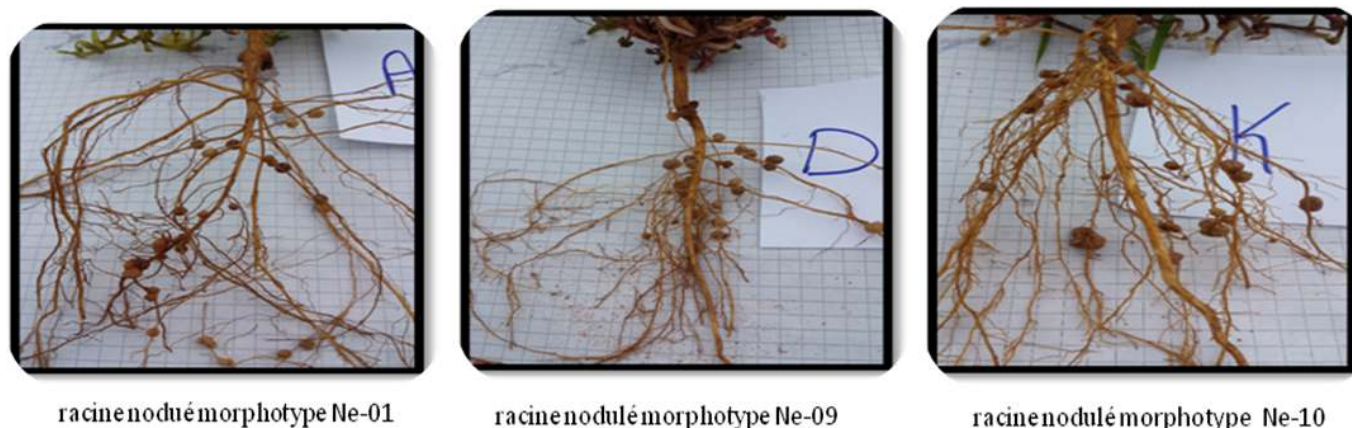


Fig. 4. Racines nodulées des 3 morphotypes

TRAITEMENT ET CONSERVATION DES NODOSITÉS

Les nodules récoltés sont séchés au laboratoire à température ambiante pendant deux jours. Puis on procède à 3 lavages successifs pour stériliser :

- un 1^{er} lavage dans de l'eau stérilisée (répété 2 fois) ;
- un 2^{ème} lavage dans de l'alcool à 70°C pendant 2 minutes (répété 2 fois) ;
- enfin un 3^{ème} lavage, dans de l'eau stérilisée (répété 2 fois).

Après ce lavage, chaque groupe de nodosités recueilli par morphotype et par paquet est placé dans des tubes stérilisés, auquel on ajoute quelques gouttes de glycérol qu'on range au réfrigérateur pour la conservation.

2.3.1 ANALYSE DES DONNÉES

2.3.1.1 DIVERSITÉ ALPHA

L'indice de diversité a été calculé en appliquant la formule de Shannon Wiener :

$$H' = - \sum_{i=1}^s P_i \log P_i$$

Où :

P_i = abondance proportionnelle ou pourcentage d'importance de l'espèce (souche) : $P_i = N_i/N$;

S = nombre total d'espèces (souches);

N_i = nombre d'individus d'une espèce (Fréquence du type IGS ou souche) dans l'échantillon;

N = nombre total d'individus de toutes les espèces dans l'échantillon.

L'indice de Shannon permet d'exprimer la diversité en prenant en compte le nombre d'espèces (souches dans notre étude) et l'abondance des individus au sein de chacune de ces espèces. La valeur de l'indice varie de 0 (une seule espèce, ou bien une espèce dominant très largement toutes les autres) à $\log S$ (lorsque toutes les espèces ont même abondance).

ISOLEMENT DES RHIZOBIUMS ET RÉVÉLATION DE LA DIVERSITÉ PAR PCR/RFLP

MÉTHODE D'ISOLEMENT DES RHIZOBIUMS ET D'EXTRACTION D'ADN BACTÉRIEN

L'isolement est réalisé selon la méthode de Vincent (1970). Les nodules stériles sont écrasés individuellement dans une goutte d'eau distillée stérile. L'opération est réalisée dans des conditions d'asepsie totale (hotte à flux laminaire, pince flambée, ...). A l'aide d'une anse de platine, flambée au bec Bunsen, le jus de nodule est étalé sur boîte de Pétri contenant un milieu spécifique, le milieu Yeast Mannitol Agar (YMA).

La pureté des isolats a été vérifiée par des stries répétées en boîtes de Pétri. Les cultures authentifiées ont été conservées à -80°C dans des cryotubes contenant la culture liquide de l'isolat sur milieu YEM et du glycérol ajusté à 20% (v/v) (Bakhoum, 2012). L'ADN génomique total a été extrait par la méthode d'éclatement cellulaire.

CONDITIONS PCR/RFLP

• AMPLIFICATION PAR PCR DE L'ESPACE INTERGENIQUE 16S-23S DE L'ADNR DES RHIZOBIA

Les isolats purifiés ont été cultivés dans du milieu YM pendant 24 h. La région IGS 16S-23S de la région codante de l'ARNr de 68 isolats de rhizobium a été amplifiée en utilisant $2\ \mu\text{l}$ d'isolat. Les amorces FGPS 1490-72 ; 5'-TGC-GGC-TGG-ATC-CCC-TCC-TT-3' (Normand et al. 1996) et FGPL 132'-38 ; 5'-CCG-GGT-TTC-CCC-ATT-CGG-3' (Ponsonnet & Nesme, 1994) ont été utilisées pour l'amplification. Une unité de Taq polymérase ainsi que les dNTPs (200 μM de chaque dNTP), le MgCl_2 (1,5 mm) et le tampon (10 mm Tris-HCl pH 9) et 50 mm KCl étaient déjà présents sous forme de billes lyophilisées (Ready-To-Go TM PCR beads, Pharmacia Biotech). Un témoin négatif sans ADN a été introduit. L'amplification a été réalisée grâce à un thermocycleur GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) selon le programme suivant: dénaturation initiale pendant 5 min à 94°C , suivie de 35 cycles de dénaturation (30 s à 94°C), d'hybridation des amorces (30 s à 55°C) et d'élongation (1 min à 72°C) et enfin une élongation finale (7 min à 72°C).

Après la PCR, $3\ \mu\text{l}$ de chaque amplifiat ont été prélevés et additionnés à $3\ \mu\text{l}$ de bleu de charge (bleu de bromophénol 0,25% (v/v), glycérol 30% (v/v), EDTA 10 mm, à pH 8,0). Le mélange a été déposé dans des puits d'un gel horizontal d'agarose (Sigma, La Verpillère, France) à 1% (p/v). La migration du gel a été réalisée dans une cuve d'électrophorèse (Easy Cast, modèle B2) contenant du tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) 1X, sous une tension de 100 V/cm et une intensité de 35 mA pendant 15 à 20 min. Le marqueur de taille moléculaire de 1 kb (Pharmacia Biotech) avait permis à la fois de vérifier la taille du fragment amplifié mais également de déterminer sa concentration. Le gel a été coloré dans du bromure d'éthidium (BET) à $1\ \text{mg ml}^{-1}$, lavé à l'eau puis photographié sous UV avec le Gel Doc, version 1000 (Bio-Rad laboratories).

• RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP) DE L'ESPACE INTERGENIQUE (IGS) 16S-23S DE L'ADNR DES RHIZOBIA

Un aliquote de 8 µl du produits PCR a été digéré dans un volume final de 20 µl avec des endonucléases de restriction à 37°C pendant au moins 3 h à raison de 5 U par réaction. Les enzymes *MspI* (5'-C/CGG-3') et *HaeIII* (5'-GG/CC-3') ont été utilisées. Les fragments d'ADN digérés ont été séparés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose 2,5% (p/v) Métaphore (FMC Bioproduct, Rocland, Maine) un dans tampon TBE (Tris-Borate EDTA). Les profils de restriction des deux enzymes ont été comparés par pair pour tous les isolats. Enfin, les isolats présentant des profils identiques ont été regroupés en profils IGS-RFLP.

3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 RÉSULTAT

3.1.1 RÉSULTATS DE L'ANALYSE PCR/RFLP DE L'IGS 16S-23S DE L'ADNR

Les figures 5, 6, 7 et 8 montrent les résultats de la digestion enzymatique de l'IGS 16S-23S des isolats par les enzymes de restriction *HaeIII* et *MspI* en migration électrophorétique sur gel d'agarose. Les différences de vitesse de migration en fonction du poids moléculaire et de la répartition des séquences de bandes a permis de révéler le polymorphisme existant. Ainsi, vingt-cinq (25) types de profil IGS ont été identifiés.

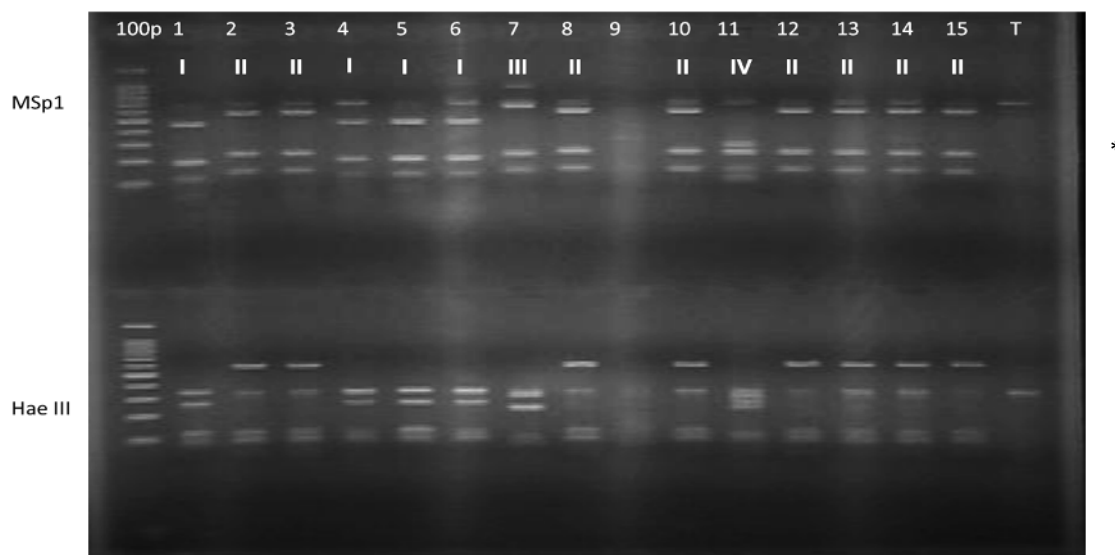


Fig. 5. migration sur gel des isolats 1 à 15

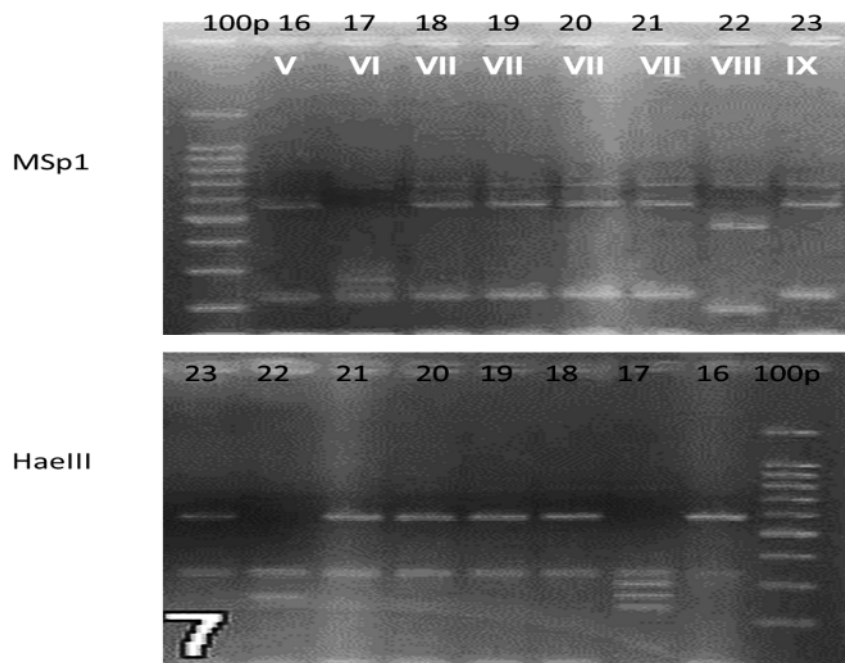


Fig. 6. migration sur gel des isolats 16 à 23

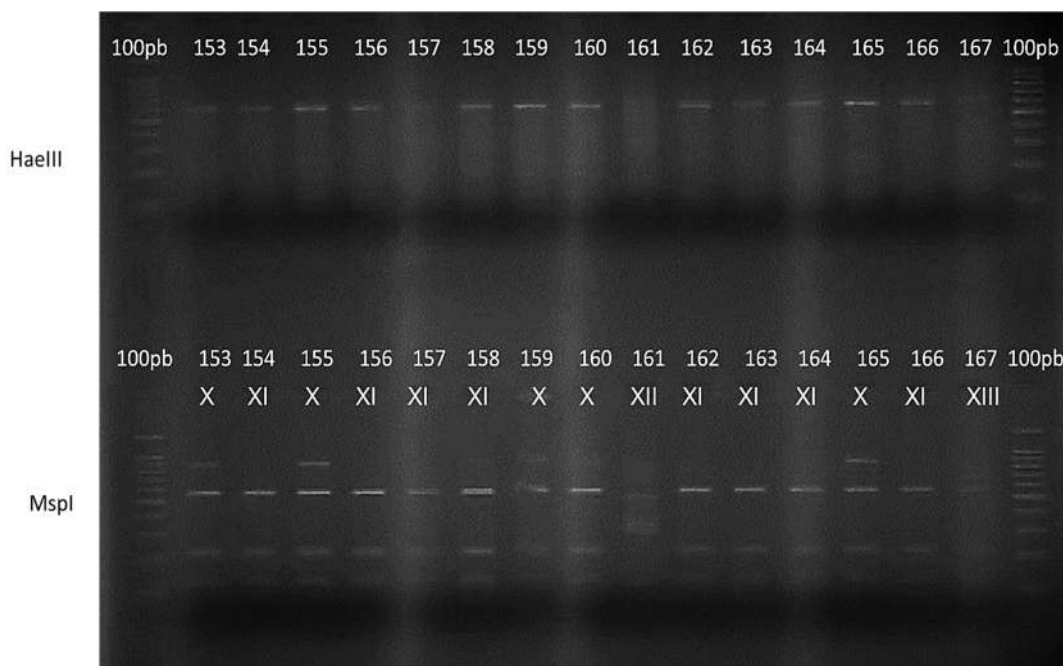


Fig. 7. migration sur gel des isolats 153 à 167

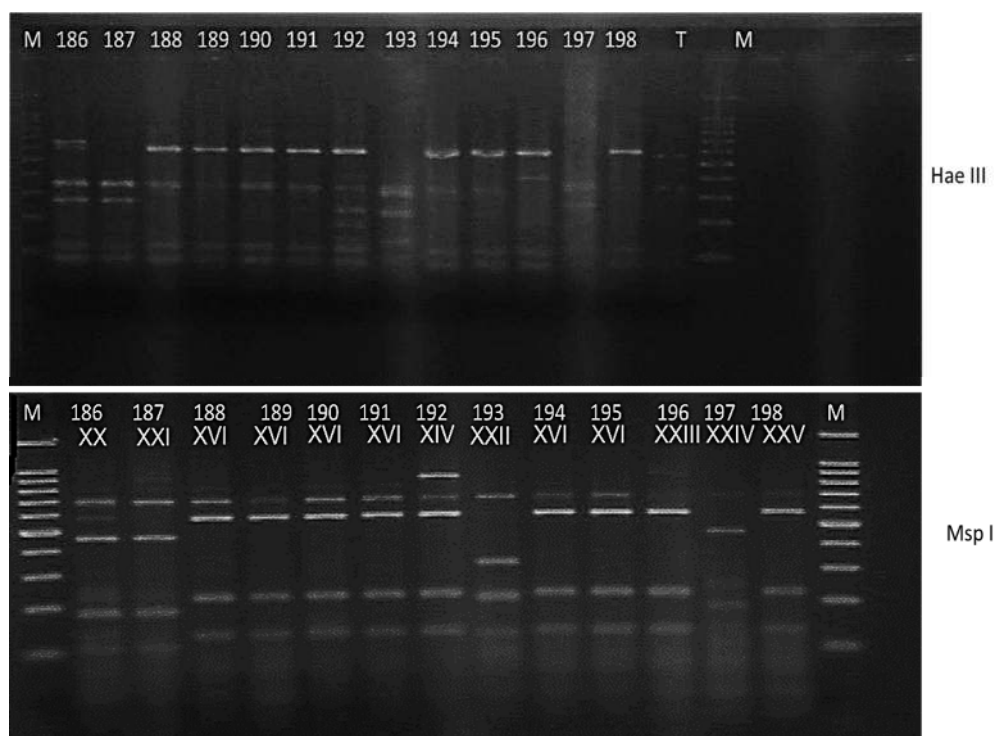


Fig. 8. migration sur gel des isolats 186 à 198

3.1.2 DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES SOUCHES DE RHIZOBIA NODULANT DU VOANDZOU (*VIGNA.SUBTERRANEA L.*)

L'analyse du polymorphisme de l'IGS 16S-23S de l'ADNr par les enzymes *Msp1* et *HaeIII* a révélé une grande diversité de souches nodulant du voandzou (*V.subterranea (L.)* au Niger. Au total 25 types de profil IGS (de I à XXV) identifiés sur 68 échantillons analysés (Tableau 1). L'indice de Shannon a varié de 0,11 pour le morphotype Ne-01₍₁₎ et Ne-10₍₂₎ dans la localité de Kollo (IGS II, XVI, XXV) à 0,141 pour le morphotype Ne-09₍₃₎, Ne-10₍₂₎ dans la localité de Tara (Tableau 1).

Tableau 1. Indices de Shannon, fréquence de type IGS en fonction de la localité et du prélèvement par morphotype.

Morphotype	localité	Type IGS	Fréquence	Indice de Shannon
Ne-01 ₍₁₎	KOLLO	I	3	0,116
		II	2	
	TARA	I	1	
		II	2	
Ne-01 ₍₂₎	KOLLO	III	1	0,11
		II	4	
		IV	1	
	TARA	V	1	
		VI	1	
Ne-09 ₍₁₎	KOLLO	VII	3	0,127
		X	2	
	TARA	XI	3	
		XI	2	
Ne-09 ₍₂₎	KOLLO	X	2	0,131
		XII	1	
		XI	3	
Ne-09 ₍₃₎	KOLLO	X	1	0,127
		XIII	1	
		XIII	1	

		XIV	2	
	TARA	XV	1	0.111
		XVI	1	
		XIV	1	
Ne-09 ₍₃₎	TARA	XV	1	0.141
		XVI	2	
		XVII	1	
	KOLLO	XVI	4	0,140
		XIV	4	
		XVIII	1	
Ne-10 ₍₁₎	TARA	XIX	1	0,121
		XX	1	
		XXI	1	
	KOLLO	XVI	4	0,11
		XIV	1	
		XXII	1	
Ne-10 ₍₂₎	TARA	XVI	2	0,141
		XXIII	1	
		XXIV	1	
Ne-10 ₍₃₎	KOLLO	XXV	1	0,11

Les chiffres **1, 2, 3** en indice indiquent les numéros du prélèvement des nodules.

Les résultats montrent une diversité plus importante chez les morphotypes Ne-09 et Ne-10 avec 51 et 35% à Tara, respectivement. Contrairement à Tara, la diversité reste toujours la plus importante au niveau des morphotypes Ne-09 et Ne-10 à Kollo avec 30 et 43% respectivement (figure 9). Cette diversité est plus importante à Tara qu'à Kollo.

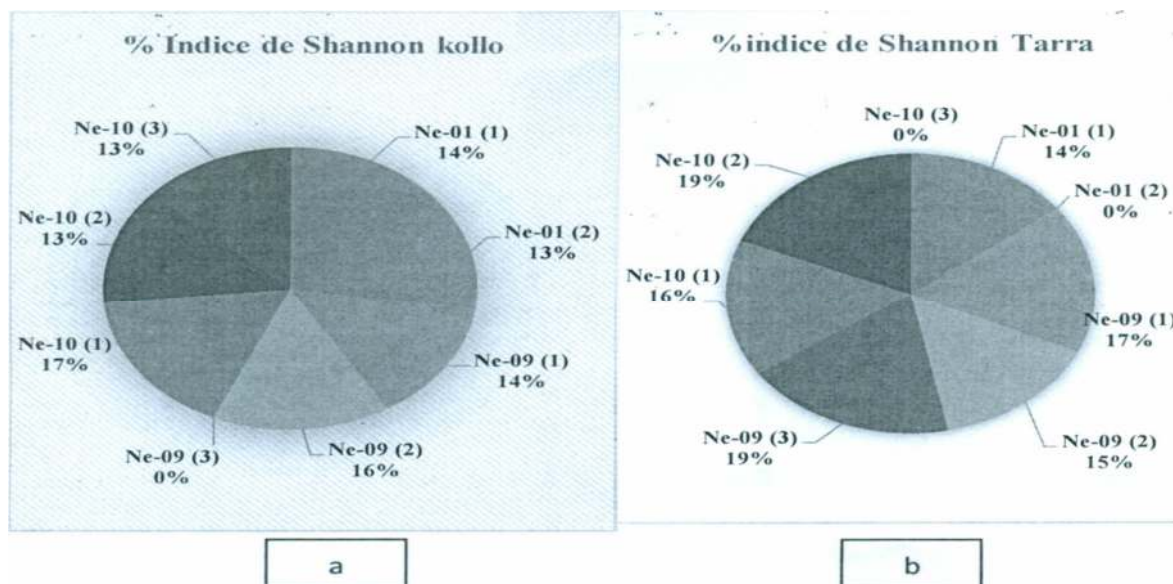


Fig. 9. Répartition en pourcentage de la diversité de Shannon par site (a -Kollo et b-Tara) en fonction du morphotype

La comparaison des indices de diversité Shannon en fonction du site et du morphotype est présentée à la figure 10. Pour le morphotype **Ne-09**, la diversité est plus élevée à Tara qu'à Kollo de même que pour le morphotype **Ne-10**. Par contre pour le morphotype **Ne-01**, la diversité est plus élevée à Kollo qu'à Tara.

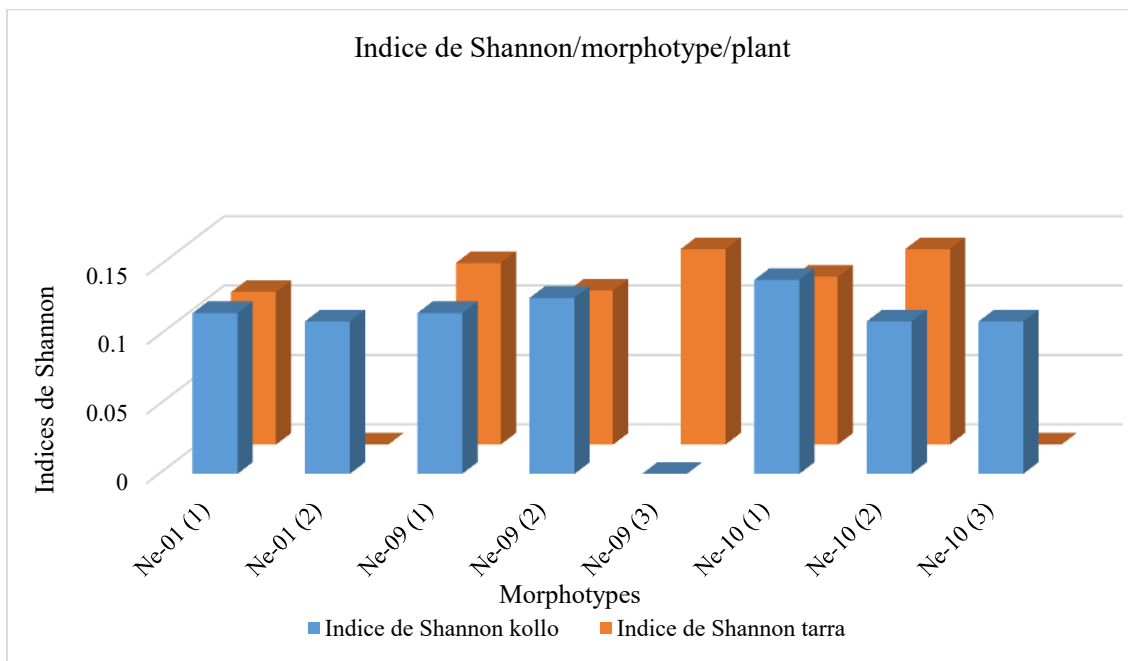


Fig. 10. Indice de diversité en fonction du morphotype/site

3.2 RÉPARTITION DES SOUCHES DE RHIZOBIA EN FONCTION DU MORPHOTYPE ET DU SITE

La grande majorité des souches nodulant *V.subterranea* (L.) Verdc sont spécifiques aux morphotypes. On retrouve de façon générale les mêmes types d'IGS pour le même morphotype sur les deux sites. Cependant, il existe des types IGS qui se retrouvent sur deux morphotypes. C'est le cas des types XIV et XVI qui ont nodulé les morphotypes **Ne-09** et **Ne-10**. La figure 11 montres la répartition des types IGS en fonction du morphotype et de la zone d'étude.

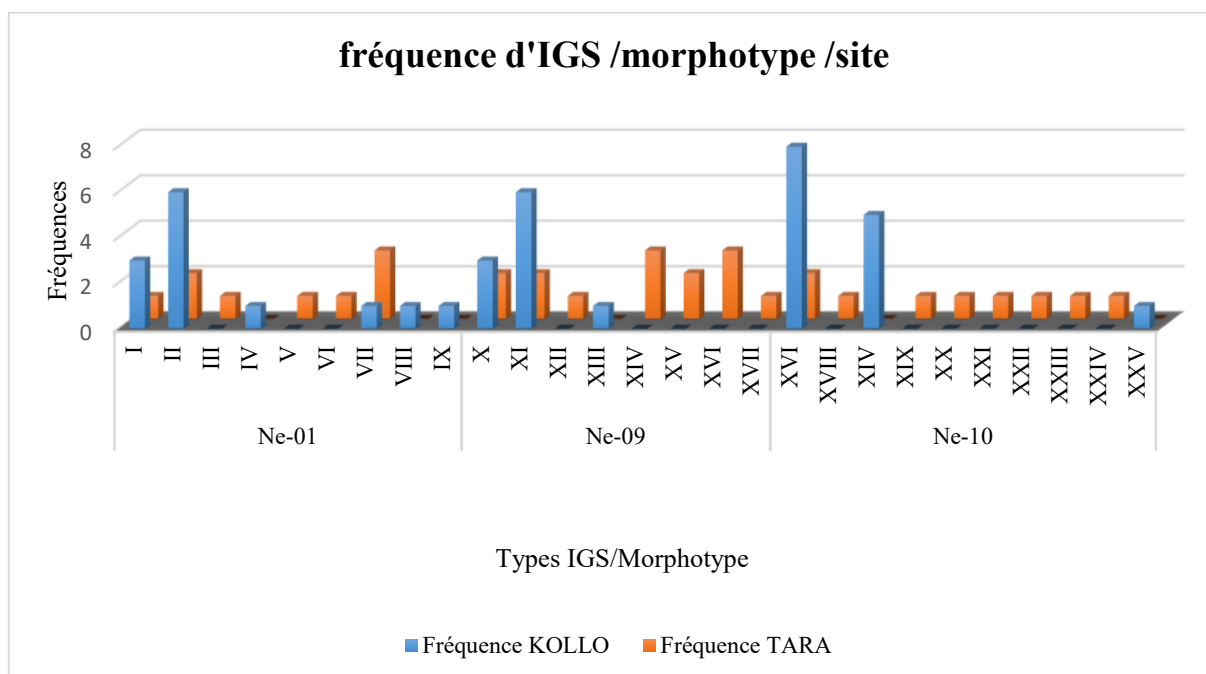


Fig. 11. Fréquence des types IGS par morphotype et par site

On remarque qu'en faisant la somme des fréquences par type (figure 12), les types IGS/RFLP II, XI, XIV et XVI sont dominants. On en déduit que ces types IGS présentent une grande affinité avec l'espèce *V.subterranea* (L.) Verdc, notamment XIV et XVI

et plus particulièrement le XVI avec une fréquence de 13 et sa présence simultanée sur les deux morphotypes (Ne-09 et Ne-10) et sur les deux sites (Tara et Kollo).

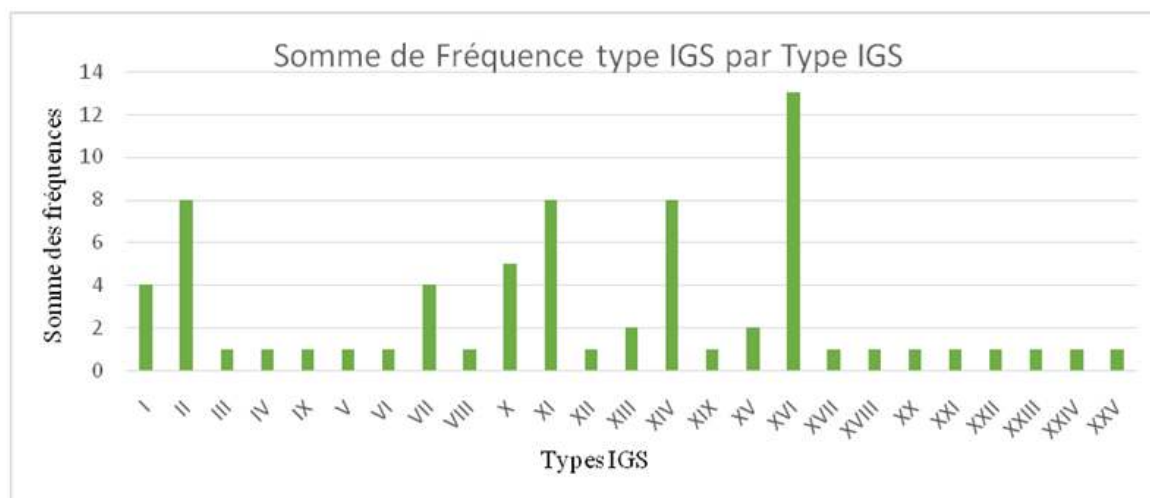


Fig. 12. Somme des fréquences de type IGS/Type IGS

4 DISCUSSION

La technique PCR-RFLP est l'association entre les techniques d'amplification et d'observation du polymorphisme sur des fragments digérés par des enzymes de restriction. D'un point de vue technique, la méthode RFLP est utilisée pour refléter directement des variations dans la séquence primaire de l'ADN. Cette technique a permis d'observer de nombreuses variations à différentes échelles taxonomiques de la population à l'espèce. Elle est facilitée par la possibilité d'obtenir un nombre considérable de copies d'une séquence cible d'ADN grâce à la technique de PCR (Dufourg, 1998). C'est une technique largement utilisée dans le domaine de la fixation biologique d'azote pour la caractérisation et pour l'étude de la diversité des rhizobiums (Thiao, 2005). Elle a permis en effet de mettre en évidence une grande diversité de BNL (Bactéries Nodulant les Légumineuses) dans deux pays méditerranéens (Zakhia, 2004) et beaucoup d'autres études (Krasova, et al., 2003 ; Ba et al., 2004 ; Thiao, 2005 ; EL-Hillali, 2006; Romdhane et al., 2006; Lazrek, 2008; Sebihi, 2008 ; Bakhoum et al., 2014) relatives à l'étude de la diversité des micro-organismes en générale et ceux des bactéries symbiotiques en particulier. Leurs études ont montrées que l'IGS 16S-23S présente une grande variabilité et peut constituer une méthode de typage d'isolats bactériens génétiquement proches.

Dans cette étude, la diversité des souches de rhizobia a été caractérisée par PCR-RFLP de l'inter gène IGS situé entre les gènes nucléaires 16S et 23S codant pour les ADNr en utilisant deux enzymes de restriction HaeIII et Msp1 (Neyra et al. 1998).

L'analyse des profils IGS 16S-23S de 68 échantillons par ces enzymes (Msp1 et HaeIII) a permis de révéler une grande diversité de souches (25 types de profil IGS) nodulant le voandzou (*V.subterranea* (L.) Verdc.) au Niger. La grande majorité de ces souches nodulant sont spécifiques au morphotype. On retrouve de façon générale les mêmes types d'IGS pour le même morphotype sur les deux sites. Ces résultats corroborent avec ceux de Rékiatou et al. (2008) qui ont révélé que la nodulation de certains types est spécifique à la variété de niébé du Niger. Cependant, il faut noter que certains types d'IGS (XVI et XIV) peuvent noduler deux morphotypes (Ne-09 et Ne-10) suivant la zone d'étude alors que la majorité des types d'IGS (III, V, VI, VIII, IX, XII, XIII, XV, XVIII, XIX, XX, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV) se retrouvent uniquement sur un seul site. Alors, il faut donc noter de l'existence d'une spécificité de souches nodulants liées à la zone d'étude. Ces résultats sont soutenus par ceux de Ba et al. (2004) qui ont révélés qu'avec la même technique, une hétérogénéité génétique variante des souches suivant les sites. Certains auteurs (Graham, 1992, Alzouma et al. 2012) pensent que cette hétérogénéité des souches est probablement liée à la composition physicochimique des différents sols des sites. Il ressort également que les types IGS (II, XI, XIV et XVI) sont dominants. Ce qui suppose une grande affinité de ces types avec l'espèce *V. subterranea* (L.)Verdc., et plus particulièrement le XVI avec une fréquence de 13 et une présence simultanée sur deux morphotypes (Ne-09 et Ne-10) et sur les deux sites.

5 CONCLUSION

L'étude de la diversité génétique des rhizobia nodulant de trois (3) morphotypes Nigériens de voandzou (*V.subterranea* (L.) par la technique PCR/RFLP de l'IGS sur deux sites avec des conditions pédoclimatiques différentes a révélée une diversité élevée dans les populations de rhizobia nodulant de voandzou (*V.subterranea* (L.) Verdc.). A total vingt cinq (25) types de profils IGS ont été identifiés sur les 68 échantillons analysés avec 4 types (II, XI, XIV et XVI) dominants. De façon générale, les mêmes types d'IGS pour le même morphotype sur les deux sites ont été observés. Il ressort de cette analyse que la zone de culture (conditions environnementales) a un impact sur la diversité des rhizobia. Ainsi, elle a montré que la diversité génétique des populations de rhizobia est beaucoup plus élevée à Tara (20/25 types identifiés) comparativement à Kollo (12/25 types). La distribution des populations de rhizobia capables de noduler *V.subterranea* (L.) Verdc dépende non seulement du morphotype également du site de culture.

REMERCIEMENTS

Nous remercions très sincèrement l'autorité rectorale de l'Université Abdou Moumouni, pour le financement du projet Voandzou et le Directeur du Laboratoire Commun de Microbiologie (LCM) IRD/ISRA/UCAD du Centre de Recherche Bel-Air à Dakar au Sénégal, laboratoire au sein duquel a eu lieu l'analyse génétique des échantillons collectés.

REFERENCES

- [1] T. Yaya, M. Koné, S. Silué, J. Yatty,. Prospection, collecte et caractérisation agromorphologique des morphotypes de voandzou de la zone savanicole en Côte d'Ivoire, European scientific journal edition vol.9, No 24 ISSN:1857-7881, 2013
- [2] S.R. Minka, M. Bruneteau, Partial chemical composition of bambara pea (*Vigna Subterranea* (L.) Verdc). Food Chemistry, 68: 273-276; 2000.
- [3] J.O. Amarteifio, O.Tibe, and R.M. Njogu, The mineral composition of Bambara groundnut [*Vigna subterranea* (L.) Verdc.] grown in Southern Africa. *African Journal of Biotechnology* 5(23): 2408-2411, 2006.
- [4] N.I.C. Onwubiko, O.B. Odum, C.O. Utazi And P.C. Poly-Mbah. Studies on the adaptation of Bambara Groundnut [*Vigna Subterranea* (L.) Verdc] in Owerri Southeastern Nigeria. *New York Science Journal*, 4(2):60-67, 2011
- [5] F.J. Massawe, S.S. Mwale, S.N. Azam-Ali, J.A. Roberts, Breeding in Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc.): strategic considerations. *African Journal of Biotechnology* 4(6): 463-471, 2005
- [6] Z. Ndiang, J. M., Bell, A. D. Missoup, P. E. Fokam, & A. Amougou. Étude de la variabilité morphologique de quelques variétés de voandzou [*Vigna subterranea* (L.) Verdc] au Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*(60), 4410– 4420, 2012
- [7] B. Sévérin and D. Yao, Variabilité morphologique et agronomique des variétés traditionnelles de voandzou (*Vigna subterranea* l. verdc.) de Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 41 :2820-2835 ISSN 1997-5902, 2011
- [8] A. Andriamananjara. Système de culture à rotation voandzou-riz pluvial sur les hautes terres de Madagascar. Rôle du voandzou (*Vigna subterranea*) sur la biodisponibilité de P dans les ferralsols. Résumé Thèse de Doctorat, Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, Université d'Antananarivo, Madagascar. 2011
- [9] H. I. Amadou, Y. Bakasso, , A. Z. Mayaki, A. Doumma & I. Mai Boucar. Diagnostic participatif de la diversité de morphotypes et des connaissances locales en matière de culture du Voandzou (*Vigna Subterranea* L.) au Niger. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 9 (4), 1915-1925, 2014
- [10] A. M. Zoubeirou, H. I. Amadou, A. Sanoussi, S. Ramatoulaye, T. Fatou, M. Neyra. A sampling strategy for efficiently studying the diversity of rhizobia associated with cowpea in a small area. *Annales de l'Université Abdou Moumouni* Tome XIII-A, 2012.
- [11] F. Galibert, T.M. Finan, S.R. Long, A. P. Puhler, P. Abola. Scarcity of usable frequently limits plant growth; *Science*, 293(5530) 668-72, 2001
- [12] X. Zang, R. Harper, M. Karsisto, K. Lindstrom. Diversity of *Rhizobium* Bacteria Isolated from the root nodules of leguminous trees; *International Journal of Systematic Bacteriology*; 41(1); 104 –113, 1991
- [13] A. Sy ; Etude de trente quatre légumineuses herbacées du Sénégal: germination des Graines et caractérisation de leurs microorganismes symbiotiques. Mémoire de DEA, Université C. A. Diop, Dakar, Sénégal, 35-36 ; 123 p, 1995
- [14] P. Séguin, S. Craig, E. Nancy, R. Michael, H. G. Peter. Nitrogen Fertilization and Rhizobial Inoculation Effects on Kura Clover Growth; *Agronomy Journal* Vol; (93); 1262-1268, 2001.
- [15] N. Amarger, J.P. Lobreau. Quantitative study of nodulation competitiveness in *Rhizobium* strains; *Appl. Environ. Microbiol.* 44; 583-588, 1982
- [16] E.W. Triplett, M.J. Sandowsky. Genetics of competition for nodulation of legumes; *Ann. Rev Microbiol*; 46;399-428; 1992

- [17] J. M. Vincent. A Manual for the practical study of root-nodule bacteria In: Programme IB. *International Biological Programme. Blackwell, Oxford: Handbook no. 15.* , (1970).
- [18] N. Bakhom. Relations entre *Acacia senegal* (L.) Willd. et les communautés microbiennes du sol: effets sur la fertilité des sols et la durabilité de la production de gomme arabique. Thèse de doctorat, Dakar-Sénégal. 2012
- [19] P. Normand, C. Ponsonnet, X. Nesme, M. Neyra, & P. Simonet. ITS analysis of prokaryotes. *Molecular Microbiology and Ecology Management*, 3, 5–12. 1996
- [20] C. Dufourg. Application des techniques moléculaires de PCR" -RFLP" et de PCR-RFLP-SSCP" dans l'étude de la différenciation génétique de deux Huîtres creuses: *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata*. Rapport de stage, Université de Pau et des pays de l'Adour, Laboratoire Génétique, Aquaculture et Pathologie de la station IFREMER de Ronce-les-Bains , 1998.
- [21] M. Thiao. Caractérisation et étude de la survie et de la compétitivité en pépinière et au champ des souches de *rhizobium innoculées chez Gliricidia sepium (Jacq.) Steud.* thèse de doctorat de 3ème cycle, UCAD, FAST/Département de Biologie végétale, Dakar , 2005.
- [22] F. Zakhia. Diversité des bactéries hôtes de légumineuses méditerranéennes en Tunisie et au Liban. Thèse de doctorat, UNIVERSITE MONTPELLIER II., 2004.
- [23] C. Ponsonnet, & X. Nesme. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. *Arch Microbiol*, 161, 300-309. 1994.
- [24] T. Krasova-Wade, I. N. N'doye, S. Braconnier, B. Sarr, P. d. Lajudie, & M. Neyra). Diversity of indigeneous bradyrhizobia associated with three cowpea cultivars (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) grow under limited and favourable water conditions in Senegal (West Africa). *Afr. J. Biotech*, 2(1), 13-22. 2003.
- [25] A. M. Ba, R. Samba, S. Sylla, C. Le Roux, M., Neyra, A. Rousteau, A. Toribio. Caractérisation de la diversité des microorganismes symbiotiques de *Pterocarpus officinalis* dans les forêts marécageuses de Guadeloupe et Martinique. *Revue d'Ecologie*, 59(1-2), 163-170, 2004.
- [26] I. EL-Hilali. *Symbiose rhizobium-lupin: Biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez Lupinus luteus.* thèse de doctorat, Université Mohamed V AGADAL, Faculté des Sciences, Rabat, 2006.
- [27] S. B. Romdhane, H. Nasr, R. Samba-Mbaye, , M. Neyra, M. Ghorbal, & P. De Lajudie, Genetic diversity of *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* rhizobia in Tunisia assessed by 16S and 16S-23S rDNA genes analysis. *Journal of Applied Microbiology*(100), 436-445.
- [28] F. Lazrek-Ben Friha,. *Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de Medicago truncatula et recherche de QTL liés au stress salin.* thèse de doctorat, Université Toulouse III Paul Sabatier, Ecole doctorale Biologie-Santé-Biotechnologies/département de Biologie, 2008
- [29] F. Z. Sebihi *Les bactéries nodulant les légumineuses(B.N.L): Caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse fourragère , Hedysarum perrauderianum.* thèse de doctorat, Université Mentouri de Constantine, 2008.
- [30] N. Bakhom, C. Le Roux, D. Diouf, A. Kane, F. N'doye, D. Fall, A. Galiana. Distribution and Diversity of Rhizobial Populations Associated with *Acacia senegal* (L.) Willd. Provenances in Senegalese Arid and Semiarid Regions. *Open Journal of Forestry*, 4(2), 136-143, 2014.
- [31] M. Neyra, B. Khbaya, P. DE Lajudie, B. Dreyfus, P. Normand. Computer-assisted selection of restriction enzymes for *rrs* genes PCR-RFLP discrimination of rhizobial species. *Genet. Sel. Evol*; 30; 297-309 ; 1998
- [32] H. Rékiatou, A. M. Zoubeyrou, T. Krassova & T. Adam. Etude de la diversité des Rhizobium SPP nodulant trois variétés de niébé (*Vigna Unguiculata* (L.) Walp.) au Niger par la technique de PCR - RFLP. *Annales de l'Université Abdou Moumouni, Tome IX-A* , 31-39, 2008.
- [33] P.H. Graham. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions; *Can J Microbiol.* (1992) 38; 475-484.