

CARACTÉRISATION DE LA DIVERSITÉ DES MICROORGANISMES
SYMBIOTIQUES DE *PTEROCARPUS OFFICINALIS* DANS DES FORÊTS
MARÉCAGEUSES DE GUADELOUPE ET MARTINIQUE

A.M. BÂ¹, R. SAMBA², S.N. SYLLA³, C. LE ROUX⁴, M. NEYRA², A. ROUSTEAU¹,
D. IMBERT¹ & A. TORIBIO⁵

SUMMARY

We have isolated 17 strains of rhizobiums from nodules collected on roots of *Pterocarpus officinalis* in different sites of swamp forest in Guadeloupe and Martinique. The genotypic diversity of these strains were characterized by PCR-RFLP analysis of the IGS (intergenic spacer) region between 16S and 23S rRNA genes, by using two 4-base restriction endonucleases Hae III and Msp I. Results of IGS PCR-RFLP analysis showed that restriction patterns were similar for DNA extract from root nodules and cultures of rhizobium strains. The diversity of these strains varied from one site to another. They were grouped into 5 ribotypes by IGS PCR-RFLP analysis. Results of IGS sequence analysis showed that the 5 ribotypes are very close to the genus *Bradyrhizobium*. The symbiotic properties of the 5 ribotypes were evaluated on *Acacia seyal*, a plant test that is able to form nodules with several *Bradyrhizobium* species. One month and nineteen days after inoculation, the green colour of the leaves and the best growth of inoculated seedlings contrasting with the yellow colour of the leaves and the lowest growth of uninoculated seedlings, were the parameters indicating the level of nitrogen-fixing activity of the three *Bradyrhizobium* strains. Concurrently, the vesicular and arbuscular mycorrhizal status of *P. officinalis* was established. The two types of symbiotic microorganisms could contribute to mobilize available phosphorus and nitrogen for improving the growth of *P. officinalis* in degraded swamp forests.

RÉSUMÉ

Nous avons isolé 17 souches de rhizobiums à partir de nodules récoltés sur des racines de *Pterocarpus officinalis* dans différents sites de forêt marécageuse en Guadeloupe et Martinique. La diversité de ces souches a été caractérisée par PCR-RFLP de l'intergène IGS situé entre les gènes nucléaires codant pour les ARNr 16S et 23S en utilisant deux enzymes de restriction Hae III et Msp I. Des profils RFLP obtenus par digestion de l'IGS d'extraits d'ADN de nodules ou de cultures bactériennes sont comparables. L'analyse de ces profils RFLP a révélé une hétérogénéité génétique des souches qui varie suivant les sites. Les 17 souches de *P. officinalis* ont été groupées en 5 ribotypes par comparaison de leur profil RFLP. L'analyse phylogénétique de l'IGS a montré que ces ribotypes sont très proches du genre *Bradyrhizobium*. Les propriétés symbiotiques d'un représentant de chaque groupe de souches ont été testées sur *Acacia seyal*, espèce qui nodule avec un grand nombre d'espèces de *Bradyrhizobium*.

¹ Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales, UFR Sciences, UAG, BP. 592, F-97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe.

² Laboratoire de Microbiologie des Sols Tropicaux, IRD/UCAD/ISRA, BP. 1386, Dakar, Sénégal.

³ Département de Biologie Végétale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop, BP 5005 Dakar, Sénégal.

⁴ UMR 1063, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, IRD/CIRAD/INRA/ENSAM/UM2, TA10/J, Campus International de Baillarguet, F-34398 Montpellier Cedex.

⁵ Laboratoire de Mycologie-Flore Pathogène du Sol, Unité de Recherches en Productions Végétales, Domaine de Duclos, INRA centre Antilles-Guyane, F-97170 Petit-Bourg, Guadeloupe.

Un mois et dix neuf jours après inoculation, l'observation de la vigueur et de la couleur verte des parties aériennes des plantes inoculées, comparativement aux plantes témoins peu vigoureuses et de couleur jaune, ont été des paramètres indiquant le caractère fixateur de trois souches de *Bradyrhizobium*. Parallèlement, la présence de champignons mycorhiziens à vésicules et à arbuscules a été révélée sur des racines de *P. officinalis*. Ces deux types de symbiose pourraient agir en synergie sur la mobilisation du phosphore et de l'azote pour améliorer la croissance de *P. officinalis* dans des forêts marécageuses dégradées.

INTRODUCTION

La forêt marécageuse à *Pterocarpus officinalis* Jacq. est une formation remarquable de la Grande Caraïbe qui se développe sur des sols inondés ou temporairement inondés en arrière de la mangrove, en bordure de rivière et dans des dépressions humides en montagne (Eusse & Aide, 1999 ; Imbert *et al.*, 2000). En Guadeloupe, *P. officinalis* peut représenter jusqu'à 90 % de la strate arborée dans la forêt marécageuse de la réserve naturelle du Grand Cul-de-sac Marin (Bonhême *et al.*, 1998). Malgré le statut de protection dont bénéficie cette réserve naturelle, *P. officinalis* est actuellement en régression à cause des effets conjugués de l'extension des infrastructures urbaines et des activités agricoles (Bonhême *et al.*, 1998). L'intérêt de cette espèce réside dans sa capacité à produire de la gomme de couleur rouge qui a été utilisée pour ses propriétés hémostatiques et astringentes par la pharmacopée européenne de l'époque coloniale. Actuellement, le bois de cet arbre est exploité notamment par les Saramaca de Guyane qui l'ont adopté pour ses qualités esthétiques remarquables dans l'artisanat, ce qui nuance largement les informations de la littérature sur sa valeur insignifiante.

P. officinalis est une légumineuse arborescente qui développe des adaptations morphologiques sur des sols temporairement inondés. Il possède à cet effet de larges contreforts qui s'élèvent parfois jusqu'à 5 m sur le tronc et servent à assurer l'ancrage et la stabilité de l'arbre (Richards, 1996). Cet arbre présente des nodules en abondance sur les racines à la base des contreforts. Ces nodules sont induits par des bactéries du sol appelées rhizobiums capables de transformer l'azote de l'air en azote assimilable par la plante-hôte (Saur *et al.*, 1998). La capacité de *P. officinalis* à fixer l'azote de l'air pourrait être un avantage adaptatif dans les forêts marécageuses où les sols sont pauvres en azote. Comme la plupart des légumineuses, *P. officinalis* serait également associé à des champignons mycorhiziens dont le rôle est bien établi dans la mobilisation du phosphore assimilable (Bâ *et al.*, 2000, 2001). Tout effort de restauration des forêts marécageuses dégradées devrait associer cette espèce végétale à des microorganismes symbiotiques. L'objectif de ce présent travail était d'une part de caractériser la diversité et les propriétés symbiotiques des rhizobiums et d'autre part de vérifier la présence de mycorhizes chez *P. officinalis* afin de disposer ultérieurement de souches performantes pouvant être employées comme inoculum dans des opérations de revégétalisation en forêt marécageuse.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MISE EN ÉVIDENCE DES MYCORHIZES À VÉSICULES ET À ARBUSCULES

Des racines de *P. officinalis* ont été récoltées dans trois sites (Belle Plaine, Jarry et Port-Louis) en Guadeloupe et dans un site (Galion) en Martinique. Ces raci-

nes ont été conservées dans un fixateur constitué d'un mélange de formol 35 %, d'acide acétique 90 % et d'alcool à 70° (1 : 1 : 1 ; v/v/v). Elles ont été éclaircies avec du KOH à 10 %, colorées au bleu trypan et observées au microscope photonique selon la méthode décrite par Bâ & Guissou (1996).

RÉCOLTE ET CONSERVATION DES NODULES

Des prélèvements de nodules ont été réalisés sur des racines à la base des contreforts de *P. officinalis* dans les quatre sites. Dans chacun, une dizaine de nodules ont été prélevés sur trois arbres distants entre eux d'environ 5 mètres. Les nodules frais ont été conservés dans des tubes contenant un dessiccateur (silicagel).

ISOLEMENT ET PURIFICATION DES RHIZOBIUMS À PARTIR DES NODULES

Les nodules secs ont été humidifiés dans de l'eau distillée stérile pendant 30 minutes. Ils ont été désinfectés superficiellement d'abord avec de l'hypochlorite de calcium (36 %-38 % de chlore actif) saturé (10 g dans 300 ml d'eau) pendant 5 minutes, puis avec de l'éthanol 96° pendant 2 minutes. Des rinçages ont été effectués avec de l'eau distillée stérile après chaque traitement. Les nodules sont broyés dans 200 µl d'eau ultra pure et 50 µl de la suspension sont étalés sur des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture YMA (" Yeast Mannitol Agar ") de composition suivante : Mannitol 10 g ; K₂HPO₄ 0,5 g ; Glutamate de sodium 0,5 g ; NaCl 0,05 g ; MgSO₄, 7H₂O 10 g ; CaCl₂ 40 g ; FeCl₃ 4 g ; extrait de levure 1 g ; Agar 20 g ; H₂O qsp 1000 ml, pH 6,8 (Vincent, 1970). Les colonies bactériennes apparaissent après plusieurs jours d'incubation à 30°C. La pureté des colonies est vérifiée par des repiquages successifs sur milieu YMA et par contrôle au microscope. Les souches bactériennes sont conservées à - 80°C dans du milieu YM contenant 20 % (v/v) de glycérol.

EXTRACTION DE L'ADN TOTAL À PARTIR DE BROyat DE NODULE OU DE CULTURE BACTÉRIENNE

L'extraction de l'ADN est réalisée avec une suspension de 150 µl d'extraits de broyats de nodules ou de culture bactérienne selon le protocole décrit par Chaintruil *et al.* (2000).

AMPLIFICATION DE L'IGS PAR PCR

L'intergène IGS (pour " Intergenic Spacer "), situé entre les gènes nucléaires codant pour les ARNr 16S et 23S, a été amplifié par PCR (pour " Polymerase Chain Reaction ") en utilisant le couple d'amorces FGPS 1490-72 (5'-TGCGGCTG-GATCCCCTCCTT-3') et FGPL 132'-38 (5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3'). Ces amorces FGPS 1490-72 et FGPL 132'-38, définies par Normand *et al.* (1996), ont été utilisées pour amplifier l'IGS de tous les ADNr de Procaryotes testés jusqu'à présent. Pour chaque échantillon traité, la PCR est réalisée dans un microtube contenant un volume réactionnel de 25 µl. La *Taq* polymérase utilisée est sous forme de billes lyophilisées " *Taq* Ready-to-Go ", Pharmacia". Elle est constituée de 1 U de *Taq*, 10 mM de Tris-HCl (pH 9), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ et 20 µM de chaque dNTP. Dans chaque microtube, on a introduit : 2,5 µl d'amorce FGPS 1490-72 (1 µM), 2,5 µl d'amorce FGPL 132'-38 (1 µM), 18 µl de mixte et 2 µl d'ADN. Les réactions PCR ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur Gen Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Le programme d'amplification comprend un cycle de dénaturation de 5 minutes à 95 °C, suivi de 35 cycles comprenant une dénaturation de

30 secondes à 94 °C, une hybridation des amorces de 30 secondes à 55 °C et une extension de 1 minute à 72 °C, puis une extension finale d'un cycle de 7 minutes à 72 °C. Pour chaque amplification, un témoin sans ADN et un marqueur de poids moléculaire 1kb sont mis à migrer pour servir respectivement de contrôle de pureté du mixte et d'échelle moléculaire. Après chaque PCR, 5 µl du produit d'amplification sont prélevés et additionnés à 5 µl de bleu de charge (bleu de bromophénol 0,025 %, glycérol 3 %, EDTA 1mM) puis mis à migrer par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (SIGMA, type II). La migration est réalisée dans une cuve d'électrophorèse de type Hoeffer SE 600 ou LKB 2001 (gels horizontaux) contenant un tampon TBE (83 mM Tris base, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 80) sous tension électrique de 75 volts pendant 1 h. Les produits d'amplification ont été colorés au Bromure d'Etidium (BET) 1 mg^l⁻¹, puis visualisés et digitalisés sous lumière UV, à l'aide d'un appareil Gel Doc (BIO-RAD) connecté à l'ordinateur.

DIGESTION DES PRODUITS D'AMPLIFICATION

Des aliquots de 10 µl d'amplifiat des différents échantillons ont été digérés en utilisant deux endonucléases, *Hae*III et *Msp*I (Amersham Pharmacia Biotech) reconnaissant respectivement les sites de restriction spécifiques (GG/CC) et (C/CGG). Le volume réactionnel est de 15 µl, soit 7,5 à 10 µl de produit de PCR ; 1,5 µl de tampon 10X, 1 µl d'enzyme et de 5 µl à 2,5 µl d'eau stérile. Au bout de 5 heures d'incubation à 37 °C, la totalité du produit de digestion est mélangée avec 5 µl de bleu de charge et déposée sur gel horizontal (2,5 %) Metaphor R (FMC Bio-products, Rockland, Marine USA). La migration des fragments de restriction a été réalisée dans les conditions matérielles précédemment décrites, pendant 3 heures à une tension de 80 volts. Un marqueur de poids moléculaire " Ladder 100 " (Amersham Pharmacia) est mis à migrer parallèlement pour servir d'échelle moléculaire aux produits digérés. La coloration et la visualisation des profils RFLP sont réalisées comme pour la PCR.

SÉQUENÇAGE DE L'IGS

La préparation et la purification de la réaction de séquence de l'IGS ont été réalisées selon le protocole décrit par Chaintreuil *et al.* (2000). Les séquences obtenues ont été corrigées par le logiciel " Sequence Navigator " et comparées selon le logiciel " BLAST " à la banque de données GenBank par l'intermédiaire du serveur d'infobiogen.

TEST DE NODULATION ET D'EFFECTIVITÉ EN TUBE

Des graines d'*Acacia seyal* utilisées dans cette étude ont été scarifiées avec de l'acide sulfurique à 95 % pendant 30 minutes. Les graines sont ensuite rincées plusieurs fois avec de l'eau distillée, puis laissées à imbiber pendant une nuit. Elles sont incubées pour germer dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée (8 g/l) pendant 48 heures à 30 °C à l'obscurité. Les semis sont ensuite transférés dans des tubes (220 x 22 mm) contenant du milieu nutritif Jensen en gélose inclinée ayant la composition suivante : 10 ml d'une solution de K₂HPO₄ à 20 g/l et de MgSO₄ 7H₂O à 20g/l, 10 ml de NaCl à 20 g/l, 20 ml de CaHPO₄ à 50 g/l, 10 ml de FeCl₃ 6H₂O à 4 g/l et 1 ml d'oligoéléments de Jensen (H₃BO₃ à 2,86 g/l, MnSO₄ à 2,03 g/l, ZnSO₄ à 0,22 g/l, CuSO₄ 5H₂O à 0,08 g/l et Na₂MoO₄ H₂O à 0,09 g) dans 1 l de H₂O qsp ajusté à pH 6,7 et solidifié avec de l'agar à 15 g/l. L'inoculation des semis a été réalisée avec 1 ml de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance. Les semis ont été élevés dans des conditions de lumière continue (20 W/

m²) et à une température de 30 °C. La nodulation est observée 3 semaines après inoculation. Les effets de l'inoculation sont observés après 1 mois et 19 jours de croissance.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La coloration des racines de *P. officinalis* au bleu trypan a révélé la présence d'hyphes internes, de vésicules et d'arbuscules typiques. Le statut mycorhizien de *P. officinalis* ainsi établi permet d'envisager l'étude de la diversité des Glomales inféodés à cette espèce et leur rôle dans la mobilisation du P assimilable indispensable à la fixation d'azote de l'air en milieu inondable.

Par ailleurs, une collection de 17 souches de rhizobiums a été constituée à partir des nodules de *P. officinalis* dans des forêts marécageuses de Guadeloupe et Martinique. La méthode PCR-RFLP permet de caractériser et de faire un groupage préliminaire des souches du genre *Bradyrhizobium* (Doignon-Bourcier *et al.*, 2000). Elle a été utilisée pour caractériser les souches des nodules de *P. officinalis*, par comparaison du polymorphisme de l'intergène IGS d'extraits d'ADN de nodules ou de cultures. Les profils RFLP obtenus d'extraits de l'ADN de nodules ont été groupés en fonction de leur profil de restriction avec les enzymes Hae III et Msp I (Figs. 1 et 2).

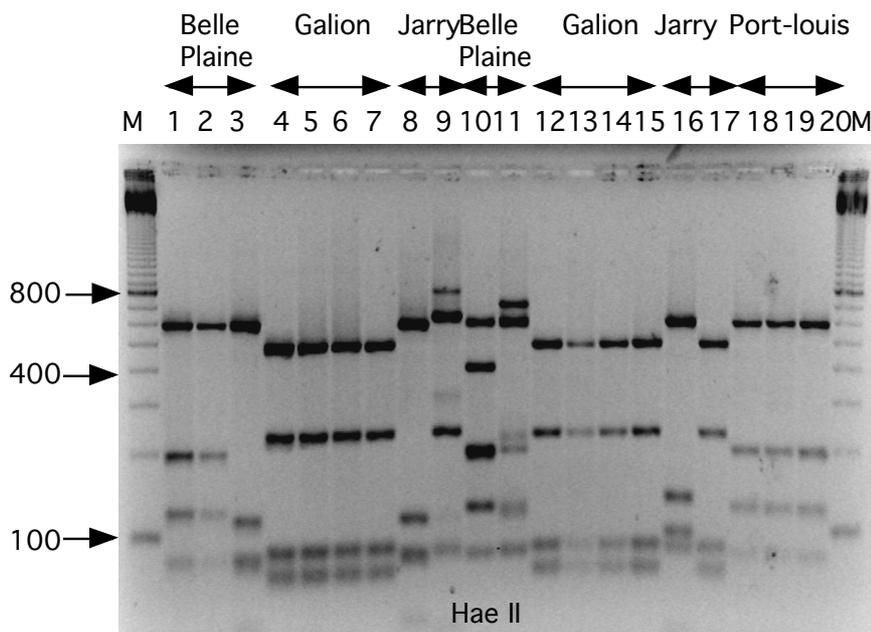


Figure 1. — Produits de digestion par Hae III de l'intergène IGS d'extraits de nodules de *Pterocarpus officinalis* (puit 1, UAG.1A ; puit 2, UAG.1B ; puit 4, UAG.3A ; puit 5, UAG.3B ; puit 6, UAG.4A ; puit 7, UAG.4B ; puit 10, UAG.6A ; puit 11, UAG.6B ; puit 12, UAG.7A ; puit 13, UAG.7B ; puit 14, UAG.8A ; puit 15, UAG.8B ; puit 16, UAG.9A ; puit 17, UAG.9B ; puit 18, UAG.10A ; puit 19, UAG.11A ; puit 20, UAG.11B) et *Dalbergia monetaria* (puit 3, UAG.2B ; puit 8, UAG.5A ; puit 9, UAG.5B) ; M, Marqueur de poids moléculaire (100 pb).

Chaque enzyme de restriction a donné un profil type dans chaque site mais aussi des profils comparables d'un site à un autre. Un seul profil RFLP a été obtenu dans le site de Galion en Martinique. Ceci suggère que *P. officinalis* n'est nodulé que par une souche de rhizobiums dans ce site. Il en va de même dans le site de Port-Louis qui présente aussi un seul profil RFLP. Il n'y a donc pas de diversité de rhizobiums dans ces deux sites. Par contre, on a observé quatre profils RFLP distincts dans le site de Belle Plaine et quatre autres dans le site de Jarry.

Ceci traduit une hétérogénéité génétique des rhizobiums dans ces deux sites. Il apparaît aussi que certains profils RFLP sont comparables d'un site à un autre. C'est le cas par exemple du profil RFLP de Jarry présent dans le site de Belle Plaine. Ces profils RFLP ont été groupés en cinq ribotypes désignés comme suit : le ribotype A regroupe des souches du site de Galion et Jarry, le ribotype B regroupe des souches de Belle Plaine et Port-Louis, les ribotypes C et D regroupent des souches de Belle Plaine, et le ribotype E regroupe une souche de Jarry. Parallèlement, des souches de rhizobiums ont été isolées de nodules de *P. officinalis*, purifiées et contrôlées en comparant leurs profils RFLP avec ceux d'extraits de nodules. Les résultats montrent que les profils RFLP des broyats de nodules et des cultures de rhizobium sont identiques (résultats non présentés ici). Les cinq ribotypes obtenus traduisent un polymorphisme des fragments de restriction dans les différents sites forestiers prospectés, montrant ainsi une hétérogénéité génétique de ces groupes de souches. A titre de comparaison, ces ribotypes sont différents de ceux de *Dalbergia monetaria*, légumineuse lianescente des forêts marécageuses (Fig. 1 et 2).

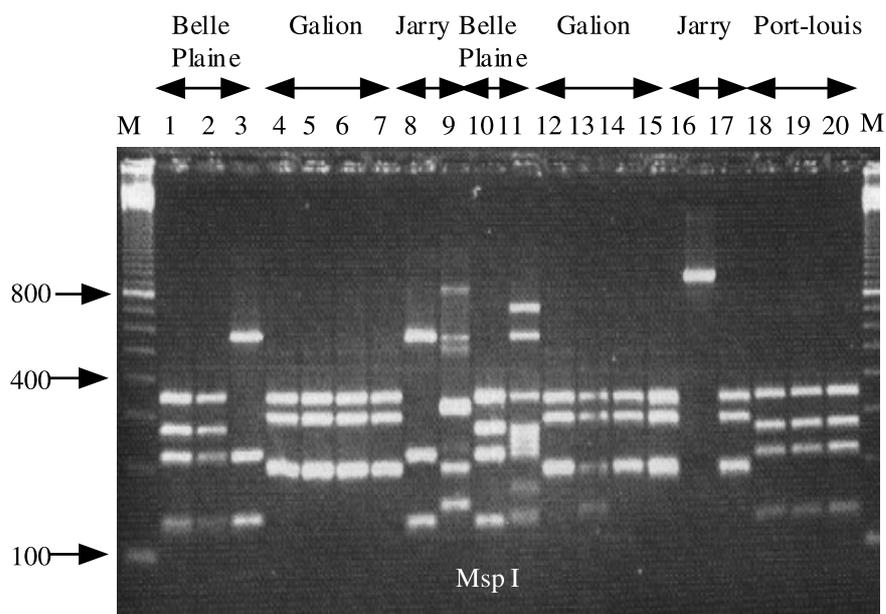


Figure 2. — Produits de digestion par *Msp I* de l'intergène IGS d'extraits de nodules de *Pterocarpus officinalis* (puit 1, UAG.1A ; puit 2, UAG.1B ; puit 4, UAG.3A ; puit 5, UAG.3B ; puit 6, UAG.4A ; puit 7, UAG.4B ; puit 10, UAG.6A ; puit 11, UAG.6B ; puit 12, UAG.7A ; puit 13, UAG.7B ; puit 14, UAG.8A ; puit 15, UAG.8B ; puit 16, UAG.9A ; puit 17, UAG.9B ; puit 18, UAG.10A ; puit 19, UAG.11A ; puit 20, UAG.11B) et *Dalbergia monetaria* (puit 3, UAG.2B ; puit 8, UAG.5A ; puit 9, UAG.5B) ; M, Marqueur de poids moléculaire (100 pb).

Le séquençage de l'IGS d'un représentant de chaque ribotype a été réalisé afin de déterminer la position taxinomique des souches de rhizobiums. La comparaison de séquences avec le logiciel BLAST, montre que ces souches sont phylogénétiquement proches du genre *Bradyrhizobium*, avec au moins 98 % de similarité.

Les propriétés symbiotiques d'un représentant de chaque ribotype ont été évaluées sur *Acacia seyal*, espèce végétale réputée pour sa capacité à noduler avec un grand nombre d'espèces de *Bradyrhizobium*. Les résultats des tests de nodulation sont présentés dans le tableau I. Ils montrent que les représentants de chaque ribotype nodulent *A. seyal* trois semaines après inoculation. Pour évaluer la capacité fixatrice des nodules, des analyses visuelles ont été faites après inoculation des racines d'*A. seyal*, par comparaison aux plantes non inoculées (Tab. I). Un mois et dix neuf jours après inoculation, l'observation de la vigueur et de la couleur verte des parties aériennes des plantes inoculées, comparativement aux plantes témoins peu vigoureuses et de couleur jaune, ont été des paramètres indiquant le caractère fixateur des souches. Parmi les cinq représentants de souches de *Bradyrhizobium* provenant de nodules de *P. officinalis*, seules trois souches sont effectives sur *A. seyal*. Une souche isolée de nodules de *D. monetaria*, n'est pas effective sur *A. seyal*. Il en est de même de la souche ORS.206 pourtant effective sur sa plante d'isolement *Pterocarpus erinaceus*. Il faut donc rester prudent dans l'interprétation de ces résultats car *A. seyal* n'est pas la plante d'isolement des souches testées.

TABLEAU I

Test d'effectivité de souches de Bradyrhizobium sur la croissance de jeunes plants d'Acacia seyal un mois et dix neuf jours après inoculation en tube

Souches	Plantes d'isolement	Sites forestiers	Effectivité
UAG 6A	<i>Pterocarpus officinalis</i>	Belle Plaine	e
UAG 6B	“	“	E
UAG 3A	“	Galion	e
UAG 9A	“	Jarry	E
UAG 11A	“	Port-Louis	E
UAG 5B	<i>Dalbergia monetaria</i>	Jarry	e
ORS 204	<i>Pterocarpus erinaceus</i>	Niokolokoba	E
ORS 206	“	“	e
Non inoculé			o

o, pas de nodulation (plantes peu vigoureuses à feuilles de couleur jaune) ; e, nodulation inefficace (plantes peu vigoureuses à feuilles de couleur jaune) ; E, nodulation efficace (plantes vigoureuses à feuilles de couleur verte). Observations réalisées sur cinq plants par traitement. Belle Plaine, Jarry et Port-Louis sont des sites de Guadeloupe ; Galion est un site de Martinique ; Niokolokoba est un site du Sénégal Oriental. Abréviations et désignations : UAG, collection de souches de l'Université des Antilles et de la Guyane ; ORS, collection de souches de l'Institut de Recherche pour le Développement.

Des études complémentaires sont à envisager pour confirmer les groupements de souches obtenus par PCR-RFLP de l'IGS, en utilisant d'autres techniques géno-

miques (ex. : AFLP, pour “ Amplified Fragment Length Polymorphism ”) qui permettent d’analyser de façon reproductible et rapide un grand nombre de souches de *Bradyrhizobium* (Doignon-Bourcier *et al.*, 2000). Pour identifier éventuellement de nouvelles espèces de *Bradyrhizobium*, une analyse phylogénétique sera réalisée par comparaison des séquences totales de l’ADN 16S et couplée avec des hybridations ADN/ADN dans le cas de souches très proches. Des tests de nodulation et de mycorhization seront réalisés pour sélectionner des souches efficaces sur *P. officinalis* en vue de réintroduire cette espèce dans les forêts marécageuses dégradées de Guadeloupe et Martinique.

RÉFÉRENCES

- BÂ, A.M. & GUISSOU, T. (1996). — Rock phosphate and mycorrhizas effects on growth and nutrient uptake of *Faidherbia albida* (Del.) in an alkaline sandy soil. *Agrofor. Syst.*, 34: 129-137.
- BÂ, A.M., PLENCHETTE, C., DANTHU, P., DUPONNOIS, R. & GUISSOU, T. (2000). — Functional compatibility of two arbuscular mycorrhizae with thirteen fruit trees in Senegal. *Agrofor. Syst.*, 50: 95-105.
- BÂ, A.M., GUISSOU, T., DUPONNOIS, R., PLENCHETTE, C., SACKO, O., SIDIBÉ, D., KONDE, S. & BABA, V. (2001). — Mycorhization contrôlée et fertilisation phosphatée : applications à la domestication du jujubier. *Fruits*, 56: 261-269.
- BONHÊME, I., ROUSTEAU, A., IMBERT, D. & SAUR, E. (1998). — La forêt marécageuse à *Pterocarpus officinalis*. Sa situation en Guadeloupe. *Bois For. Trop.*, 258: 59-68.
- CHAINTREUIL, C., GIRAUD, E., PRIN, Y., LORQUIN, J., BÂ, A.M., DE LAJUDIE, P., GILLIS, M. & DREYFUS, B. (2000). — Photosynthetic *Bradyrhizobia* are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 537-547.
- EUSSE, A.M. & AIDE, T.M. (1999). — Patterns of litter production across a salinity gradient in a *Pterocarpus officinalis* tropical wetland. *Plant Ecology*, 145: 307-315.
- DOIGNON-BOURCIER, F., WILLEMS, A., COOPMAN, R., LAGUERRE, G., GILLIS, M. & DE LAJUDIE, P. (2000). — Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating senegalese legumes by 16S-23S rRNA intergenic gene spacers and amplified fragment length polymorphism fingerprint analyses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 3987-3997.
- DOMMERGUES, Y., DUHOUX, E. & DIEM, H.G. (1999). — *Les arbres fixateurs d’azote*. Editions Espaces 34.
- IMBERT, D., BONHÊME, I., SAUR, E. & BOUCHON, C. (2000). — Floristics and structure of *Pterocarpus officinalis* swamp forest in Guadeloupe, Lesser Antilles. *J. Trop. Ecol.*, 16: 55-68.
- NORMAND, P., ORSO, S., COURNOYER, B., JEANNIN, P., CHAPELON, C., DAWSON, J., EVTUSHENDRO, L., MISRA, A. K. (1996). — Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of the Family *Frankiaceae*. *Int. J. Syst. Bact.*, 46: 1-9.
- SAUR, E., BONHÊME, I., NYGEN, P. & IMBERT, D. (1998). — Nodulation of *Pterocarpus officinalis* in the swamp forest of Guadeloupe (Lesser Antilles). *J. Trop. Ecol.*, 14: 761-770.
- VINCENT, J.M. (1970). — *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, United Kingdom.