

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE LA FIXATION D'AZOTE
CHEZ SESBANIA ROSTRATA

Rapport d'élève - O.R.S.T.O.M. - 2ème année

Août 83

MOUDIONGUI Adako

I. INTRODUCTION

II. MATERIELS ET METHODES

1. Le Rhizobium

1.1. Isolement des souches de Rhizobium

1.2. Le milieu de culture pour Rhizobium

2. La plante

2.1. Germination des graines

2.2. Milieu de culture des plantes

2.3. Dispositif de Gibson

2.4. Modification du dispositif de Gibson

2.5. Etude de l'inhibition de la fixation de N_2 par l'azote combiné

2.6. Culture sur sol

2.6.1. Culture en cylindre

2.6.2. Culture en parcelle de 10 m^2

3. Estimation de la fixation d'azote par la méthode de réduction de l'acétylène en éthylène

3.1. Principe

3.2. Incubation sous acétylène

3.3. Mode de calcul

4. Dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldhal (Rinaudo, 1970)

4.1. Préparation des échantillons

4.2. Minéralisation

4.3. Distillation et dosage

4.4. Calcul de la teneur en azote.

III. RESULTATS

1. Etude in situ de la fixation d'azote caulinaire par Sesbania rostrata au cours de cycles végétatifs initiés à différentes époques de l'année.

1.1. Evolution de la température et de l'humidité de l'air au cours de l'année 1983.

1.2. Evolution de la fixation d'azote caulinaire.

1.3. Contribution de différentes portions de tige inoculées successivement à la fixation globale de la plante.

1.4. ARA spécifique des nodules de tige.

1.5. Evolution de la hauteur du poids sec et de la teneur en azote des plantes.

2. Effet de l'azote combiné (NH_4NO_3) sur de jeunes plantes de S. rostrata cultivées en tube.

IV. CONCLUSIONS

V. PERSPECTIVES

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

Résumé

Nous avons étudié la fixation d'azote caulinaire chez Sesbania rostrata au cours de cycles végétatifs initiés à différentes époques de l'année.

Cette étude a mis en évidence l'incidence des conditions climatiques sur l'efficacité de la symbiose Rhizobium - S. rostrata.

D'autre part, l'étude de l'effet de l'azote combiné (NH_4NO_3) sur la fixation d'azote par de jeunes plantes de S. rostrata cultivées sur milieu liquide, a montré que les nodules caulinaires sont beaucoup plus sensibles à l'azote combiné que les nodules racinaires.

On observe une stimulation de la fixation d'azote pour des concentrations en (NH_4NO_3) inférieures à 3 mM.

INTRODUCTION

L'azote utilisé par les plantes a trois origines essentielles : les réserves en azote du sol (azote de la matière organique, et azote minéral), les engrais et la fixation biologique d'azote.

La fixation biologique de l'azote c'est la réduction enzymatique de l'azote moléculaire (N_2) en ammoniac. Elle est à l'origine de la majeure partie de l'azote combiné produit dans la nature environ 10^9 tonnes par an (Postgate, 1976).

L'azote combiné est la seule forme d'azote assimilable par les plantes. Un groupe limité de procaryote est capable de fixer l'azote :

- Les fixateurs libres non associés aux plantes comprenant les espèces appartenant à des genres très variés azotobacter, Clostridium, Enterobacter, Azospirillum, Pseudomonas etc...) ainsi que de nombreuses cyanobactéries.

- Le groupe des bactéries symbiotiques qui en général ne fixent l'azote qu'en association avec les plantes. C'est notamment le cas de Rhizobium pour les légumineuses et de Frankia pour les non légumineuses.

La symbiose Rhizobium-légumineuse est une interaction complexe, entre la bactérie et la plante, qui conduit à la formation et au développement de nodules fixateur d'azote.

En principe chaque souche de Rhizobium ne peut former de nodules (souche infective) et fixer l'azote (souche effective) que

sur un nombre limité d'espèces de légumineuses.

On distingue en général :

- Les Rhizobium à croissance rapide qui ont un temps de génération de 2-4 h qui forment des colonies de 2 à 4 mm de diamètre en 3-4 jours sur milieu gélosé.

- Les Rhizobium à croissance lente qui ont un temps de génération de 6-8 h et dont les colonies ne dépassent pas 1 mm même après 7-10 jours d'incubation sur milieu gélosé.

La nitrogénase est l'enzyme qui catalyse la réduction de N_2 chez tous les systèmes biologiques fixateurs de N_2 .

La léghémoglobine, qui est une chromoprotéine est responsable de la coloration en rouge de nodules actifs de légumineuses et de l'approvisionnement en oxygène des bactéroïdes. Elle est composée de deux parties : la partie protéine contrôlée génétiquement par l'hôte tandis que l'hème du pigment est contrôlé par le Rhizobium.

Après l'infection des poils absorbants il y a formation de cordons d'infection, ensuite libéralisation des bactéries hors du cordon. Les bactéries se multiplient et se transforment en bactéroïdes fixateurs d'azote dans les cellules des nodules ainsi formés.

Une glycoprotéine de l'hôte, la lectine, semble intervenir dans le processus de reconnaissance et de liaison spécifique avec le Rhizobium.

Sesbania rostrata est une légumineuse. C'est une plante herbacée annuelle haute de 1 m à 2m50 où d'avantage (J. Berhaut, 1976).

C'est une plante sauvage qui n'a encore fait l'objet d'aucune sélection. Elle pousse dans le Nord du Sénégal, dans la région du Fleuve pendant la saison chaude (de Juin à Septembre). Elle pousse bien dans des sols submergés où abondamment irrigués.

La caractéristique principale de cette plante, réside dans la présence de sites de nodulations qui ressemblent à des pointes à l'oeil nu. Ils sont disposés régulièrement suivant trois ou quatre génératrices sur toute la longueur de la tige.

La formation de ces sites est indépendante de l'infection par les Rhizobium. Ces sites sont en fait des ébauches racinaires qui demeurent latentes sur la tige jusqu'à ce qu'elles soient infectées par des Rhizobium spécifiques donnant naissance à des nodules fixateurs d'azote.

Les sites de nodulation sont préformés et l'on connaît donc à l'avance l'emplacement précis où les nodules vont apparaître. Les sites sont continuellement formés lors de la croissance de la plante ; et restent sensibles à l'infection durant toute la vie de la plante.

Sesbania rostrata peut porter des nodules sur la tige (nodules caulinaires) sur les racines (nodules racinaires).

Dans la nature on observe souvent une nodulation caulinaire spontanée, sur toute la hauteur de la plante ; cependant, la distribution des nodules est souvent irrégulière. La pluie et la poussière

semblent être les principales causes de cette nodulation spontanée.

On a isolé deux types de souches : "les souches de tige " qui sont capables de noduler à la fois les tiges et les racines, et "les souches de racine " qui nodulent exclusivement les racines.

Les souches de tige (dont le type est ORS 571 Dreyfus, 1982) sont distinctes des autres Rhizobium à croissance lente. L'étude physiologique a montré que la souche de tige ORS 571 était capable de croître en culture libre aux dépens de l'azote moléculaire, comme seule source d'azote (Dreyfus et Coll., 1983).

Compte tenu de l'irrégularité de la nodulation spontanée des tiges, il est toujours nécessaire de procéder à l'inoculation des tiges.

La capacité fixatrice d'azote de Sesbania rostrata est importante : environ 600 nmoles C_2H_4 /h/plante, ce qui est une forte activité comparée à celle du Soja 14 à 120 nmoles C_2H_4 /h/plante (Sloger et Coll., 1975).

En utilisant la méthode de la différence et la méthode des bilans, la quantité d'azote fixée par S. rostrata correspond à environ 200 kg d'azote/ha en 50 jours (Rinaudo et Coll., 1983).

S. rostrata est capable de noduler et fixer l'azote en présence de doses élevées d'azote combiné (200 kg/ha) dans le sol.

Cette plante peut simultanément assimiler l'azote minéral du sol et l'azote moléculaire. S. rostra a été utilisée comme engrais vert en riziculture.

Les essais conduits à la Station ORSTOM Bel-Air sur micro-parcelles 1 m² et à l'ISRA sur des parcelles de 25 m² font apparaître un doublement des rendements en riz (Rinaudo et Coll., 1982).

Notre travail a consisté d'isoler des nouvelles souches de Rhizobium nodulant S. rostrata. Nous avons également étudié la fixation d'azote in situ par la plante entière, au cours des cycles végétatifs initiés à différentes époques de l'année.

Le but de cette étude qui se déroulera tout au long de l'année 1983, est de préciser l'effet des principaux paramètres qui conditionnent le développement de S. rostrata.

Enfin nous avons entrepris l'étude de l'effet de l'azote combiné (NH₄NO₃) sur la nodulation et la fixation d'azote chez de jeunes plantes de S. rostrata cultivées en tube sur milieu liquide.

II. MATERIELS ET METHODES

1. Le Rhizobium

Les souches de Rhizobium utilisées, sont la souche de référence ORS 571 (isolée par B. Dreyfus) ainsi que diverses autres souches que nous avons isolé à Gnith. (Lac de Guiers). Parmi ces dernières nous avons utilisé plus particulièrement la souche GN 20.

1.1. Isolement des souches de Rhizobium

L'isolement de souches de Rhizobium s'est fait à partir de nodules de tiges et de racines de jeunes plantes, cultivées sur milieu liquide en tube Gibson.

Les nodules ont été obtenus après inoculation des tiges et des racines, par un extrait de broyat de nodules secs prélevés sur des tiges de plantes sèches, dans la région de Gnith ; ainsi qu'à partir de nodules de *S. rostrata* planté dans la terre de Gnith.

L'isolement peut se faire selon deux techniques :

- La première consiste à stériliser superficiellement le nodule par immersion rapide dans l'éthanol à 90 % puis tremper 5 minutes dans une solution à 0,1 % d' HgCl_2 .

Le nodule est rincé abondamment à l'eau distillée stérile, puis broyé dans 3 ml d'eau physiologique à l'aide d'une baguette de verre stérile. A l'aide d'une pipette Pasteur stérile on place une goutte de la suspension diluée dans une boîte de Pétri YL et on étale aseptiquement la goutte avec un étaloir.

- La seconde technique consiste à ouvrir le nodule au moyen d'un scalpel stérile, à piquer le centre du nodule avec un fil de platine, puis à étaler sur boîte de Pétri.

l'opération lorsque les graines sont suffisamment abrasées.

Dans le cas de cultures stériles, on utilise le traitement à l'acide sulfurique les graines sont déposées sur boîte de Pétri contenant de l'eau gélosée à 9 % .

Quand la radicule atteint 1 à 2 cm de long (après environ 24 h) on les introduit aseptiquement dans les tubes de culture.

Dans le cas de cultures non stériles, on utilise l'un ou l'autre traitement, puis les graines sont mises à germer sur papier filtre humide, ou directement sur sol humide.

2.2. Milieu de culture des plantes

La composition de milieu de Jensen (Vincent 1970) que nous avons utilisée est la suivante : (en g/litre) K_2HPO_4 : 0,2, NaCl : 0,2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,2, $CaHPO_4$: 1, $FeCl_3 (6H_2O)$: 0,14, H_3BO_3 : 2,86 mg, $MnSO_4(4H_2O)$: 2,03 mg, $2nSO_4(7H_2O)$: 0,22 mg, $CuSO_4(5H_2O)$: 0,80 mg, $NO_2MoO_4(H_2O)$: 0,09 mg.

Le pH est ajusté à 6,8 avec HCl M/10 le milieu est autoclavé à 120°C pendant 20 mn.

Ce milieu est utilisé sans azote (milieu JO) ou avec différents apports de nitrate d'ammoniaque 3, 5, 10 et 15 mM NH_4NO_3).

2.3. Dispositif de Gibson (Vincent 1970) Fig. 1

Ce dispositif se compose d'un tube de 30 x 70 mm contenant une solution nutritive. La plantule est déposée de manière à avoir la racine sur la pente du milieu gélosé.

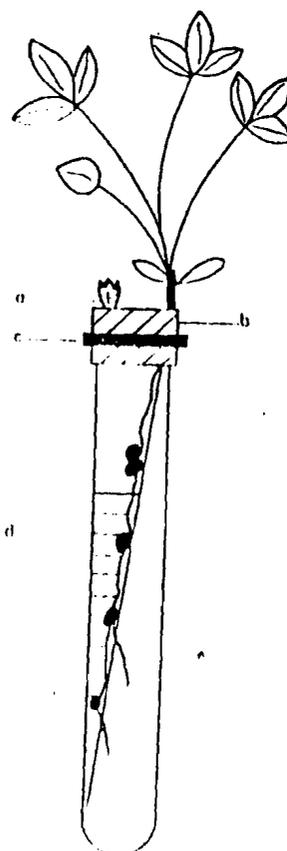


Fig. 1

Dispositif de Gibson pour tester l'infectivité (aptitude à noduler) et l'effectivité (aptitude à fixer N_2) des souches de Rhizobium

a: bouchon pour arrosage;

b: feuille d'aluminium

c: bracelet caoutchouc

d: solution nutritive pour la plante (solution sans N)

e: gélose inclinée

(Vincent, 1970)

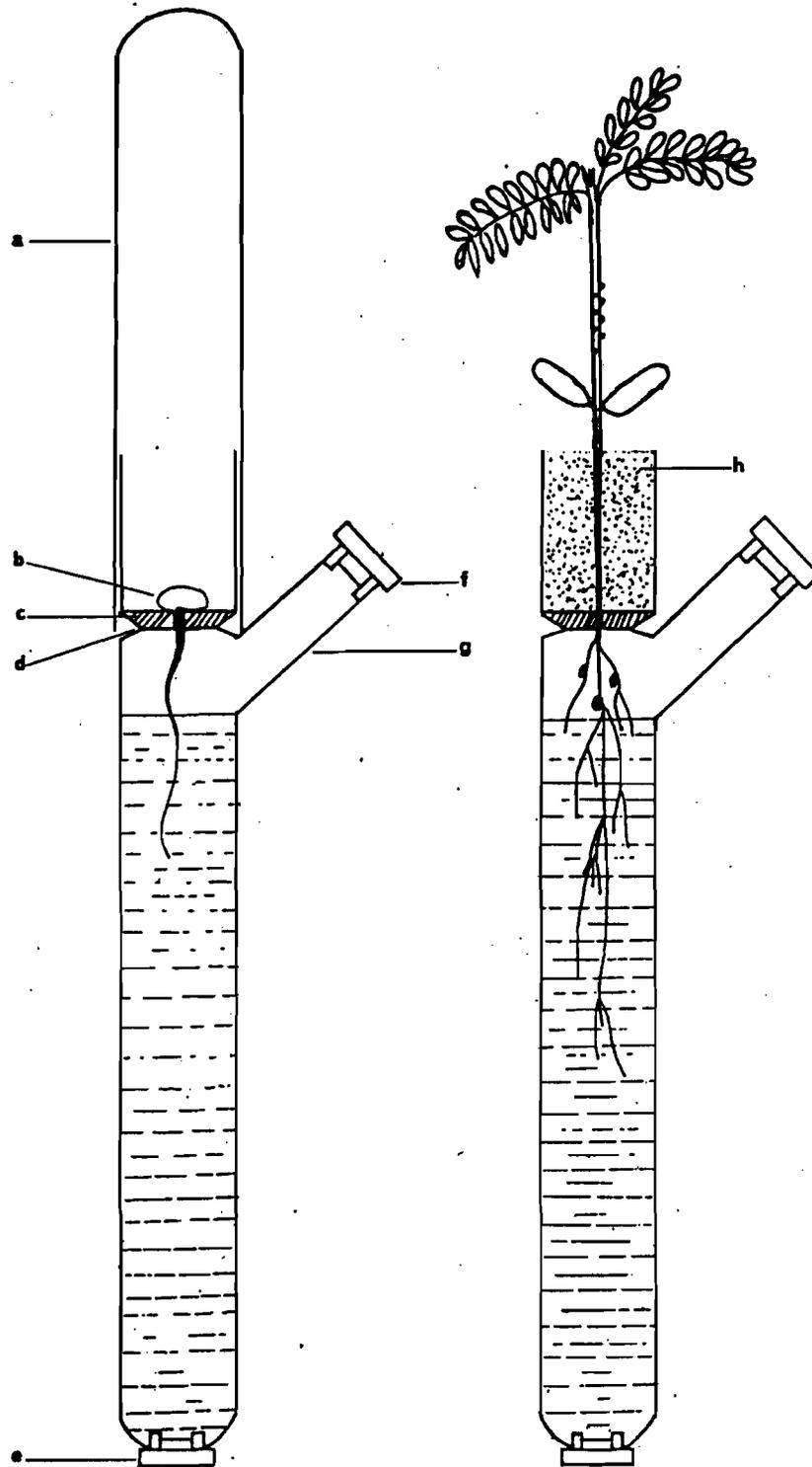


Fig. 2. Dispositif de culture des plantes.

- a : tube en pyrex 25 x 150 mm
- b : graine prégermée
- c : laine de verre
- d : point de Vigreux
- e : orifice d'évacuation obturé par un bouchon Vacutainer
- f : orifice d'arrosage " " " " "
- g : tubulure latérale
- h : sable hydrofugé

2.4. Modification du dispositif de Gibson Fig. 2.

Les modifications apportées ont eu pour but d'améliorer l'aseptie du système et d'en faciliter la manipulation.

Le dispositif utilisé est constitué d'un tube Pyrex de 22x220 mm comportant un orifice à sa partie inférieure obturé par un bouchon vacutainer (B.D. Mérieux) permettant l'évacuation, et d'une tubulure latérale dans sa partie supérieure (tube de 12 mm) également obturée par un bouchon vacutainer, destinée à l'apport du milieu neuf. Une couche de laine de verre reposant sur quatre points de Vigreux sert de support à la plantule.

Pour éviter le dessèchement de l'enveloppement cotyledonnaire, et permettre aux cotyledons de se libérer facilement de l'enveloppe de la graine, une atmosphère humide est nécessaire. Pour cela on place un tube Pyrex de 25 x 150 mm à la partie supérieure du tube de 22 x 220 mm. (Fig. 2).

L'ensemble du dispositif est autoclavé 20 mn à 120°C.

2.5. Etude de l'inhibition de la fixation de N₂ par l'azote combiné

Lorsque la plante atteint 3 cm environ un joint de sable hydrofugé est coulé au niveau du collet.

Celui-ci est obtenu de la manière suivante (pour 1 kg de sable on dissout 6 g de paraffine solide dans 100 ml de Benzène, le mélange obtenu est mis à sécher à l'étuve 60°C avant utilisation). Ceci permet de maintenir les racines en conditions aseptiques, alors que les feuilles sont à l'air libre.

Afin d'étudier l'effet de l'azote combiné sur la nodulation caulinaire et racinaire, les plantes sont maintenues 14 jours sur milieu de Jensen additionné de 3 mM NH_4NO_3 .

On remplace alors par un milieu sans azote (JO) ou comportant différentes concentrations en NH_4NO_3 ; et on procède à l'inoculation.

- L'inoculation des racines se fait en introduisant par la tubulure latérale 0,1 ml de culture de Rhizobium en phase exponentielle de croissance sur milieu YL.
- L'inoculation des tiges se fait en badigeonnant les sites de nodulation avec un pinceau préalablement trempé dans une culture de Rhizobium. Cette opération est renouvelée chaque semaine.

Les plantes sont placées en serre, la mesure de fixation d'azote par la méthode de réduction à l'acétylène, le dosage de l'azote total et la mesure du poids sec des plantes sont effectués quand les plantes sont âgées de 5 semaines.

2.6. Culture sur sol

6.1. Culture en cylindre (Legg et Sloger 1975)

Les plantes sont cultivées dans des cylindres de 30 cm de diamètre et 60 cm de hauteur hermétiquement fermés à leur partie inférieure enfoncés dans le sol en place, jusqu'à 10 cm du bord supérieur et remplis de sol soigneusement homogénéisé.

On sème huit graines par cylindre. Lorsque les plantes atteignent 10-15 cm de hauteur on procède à un démariage de façon à

laisser quatre plantes par cylindre. Cinq cylindres sont ainsi traités à chaque semis. Les semis sont effectués toutes les quatre semaines de Février à Novembre 1983. Chaque cylindre reçoit 0,5 g K_2HPO_4 . Le sol est d'abord simplement maintenu humide puis quand les plantes ont atteint 10 à 15 cm, le sol est inondé et maintenu sous lame d'eau.

L'inoculation des tiges est effectuée trois semaines après le semis par pulvérisation d'une suspension de la souche ORS 571 puis à intervalles de deux semaines.

Les portions successives de tiges inoculées sont délimitées au marqueur.

6.2. Culture en parcelle de 10 m²

Les plantes sont cultivées dans des parcelles de 10 m² et 50 cm de profondeur contenant du sol sableux (sol Dior)

Les plantes sont cultivées à raison de 25, 50 et 100 plantes au m².

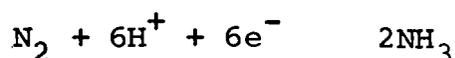
Comme précédemment, le sol est d'abord maintenu humide, puis inondé quand les plantes ont atteint 10 à 15 cm.

L'inoculation des tiges est effectuée 3, 5, 7, 11 semaines après le semis.

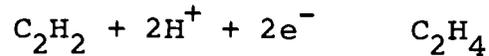
3. ESTIMATION DE LA FIXATION D'AZOTE PAR LA METHODE DE REDUCTION DE L'ACETYLENE EN ETHYLENE

3.1. Principe

La nitrogénase réduit la triple liaison de la molécule d'azote en ammoniac



La nitrogénase est également capable de transférer les électrons à de nombreux autres composés, notamment l'acétylène qui est réduit en éthylène.



La méthode de réduction de l'acétylène consiste à incuber le système fixateur étudié dans un flacon étanche en présence de 10 % d'acétylène, et à mesurer l'éthylène produit par chromatographie en phase gazeuse.

Ce test est d'une très grande sensibilité (environ 1000 fois plus grande que la détection de ^{15}N).

La réduction d'une molécule d'azote nécessite 6 électrons, alors que la réduction d'une molécule d'acétylène n'en nécessite que 2 ; le rapport molaire théorique N_2 réduit : C_2H_4 formé est donc de 3.

3.2. Incubation sous acétylène

L'activité nitrogénase des nodules est mesurée par la méthode de la réduction de l'acétylène en éthylène.

La partie de la plante portant des nodules (système racinaire ou tige) est enfermée de façon étanche dans un flacon serum. On y introduit environ 11 % d'acétylène en supression puis on rétablit la pression atmosphérique dans le flacon et on incube à 30°C. Le prélèvement de gaz est effectué 30 mn exactement après l'injection d'acétylène à l'aide d'un tube vacutainer dans lequel on a réalisé au préalable le vide et que l'on relie au flacon serum à l'aide d'une aiguille double vacutainer.

Remarque.

1. Dans le cas de plantes de grande taille les portions de tiges portant des nodules sont découpées en fragment de 5 à 7 cm, afin d'être introduit dans les flacons serum.
2. L'activité fixatrice étant susceptible de variation importante au cours de la journée, les mesures sont toujours effectuées à la même heure (11 h).

Le chromatographe que nous avons utilisé est un "varian aérograph" série 1400, équipé d'un détecteur d'ionisation de flamme est muni d'une colonne en acier inoxydable de 150 x 0,3 cm rempli de 10 % Na_3PO_4 sur spherosil X 013 075, 80-100 mesh (Péchiney Saint Gobain).

Les gaz apparaissent au niveau du détecteur dans l'ordre suivant: méthane, éthylène, propane et acétylène. Les débits et températures sont ajustés de manière à obtenir une séparation correcte des constituants du mélange gazeux injecté, avec un temps de retention minimal :

Températures :	injecteur	: 40°C
	Four-colonne	: 50°C ou 70°C
	Détecteur	: 150°C
Débits :	Azote	: 40 ml/mn
	Hydrogène	: 30 ml/mn
	Air	: 360 ml/mn.

Dans ces conditions les pics d'éthylène et d'acétylène apparaissent après 40 et 50 secondes après l'injection.

3.3. Mode de calcul

La transformation des hauteurs de pics d'éthylène en nmoles C_2H_4 se fait par référence à un étalon. Une dilution étalon d'éthylène est préparée par introduction de 0,57 ml d'éthylène dans un flacon serum de 570 ml (dilution 10^{-3}) la concentration de cette dilution étalon est de $\frac{10^6}{22400}$ nmoles C_2H_4 /ml. L'injection au chromatographe de 0,5 ml de cette dilution donne un pic de hauteur

$$h \times A \text{ cm (A = facteur d'atténuation).}$$

Supposons que l'injection de 0,5 ml d'un mélange gazeux de volume V ml renfermant X nmoles C_2H_4 donne un pic de 1 cm. Les hauteurs de pic étant proportionnelles aux quantités injectées, on peut écrire :

$$\frac{X}{V} : \frac{10^6}{22400} = \frac{1}{h \times A} \quad \text{soit} \quad X = \frac{44.64}{A} \times \frac{V}{h}$$

Dans le cas présent, le facteur d'atténuation A est 128 l'égalité précédente devient :

$$X = 0,35 \frac{V}{h}$$

La conversion des pics d'éthylène en nmoles C_2H_4 , s'obtient donc en multipliant leur hauteur (en cm) par cette valeur X.

4. DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL PAR LA METHODE DE KJELDHAL (RINAUDO 1970)

Le matériel végétal à analyser (système racinaire ou parties aériennes) est préalablement séché et réduit en poudre. On procède alors à la minéralisation puis à la distillation après déplacement de l'ammoniac par la soude.

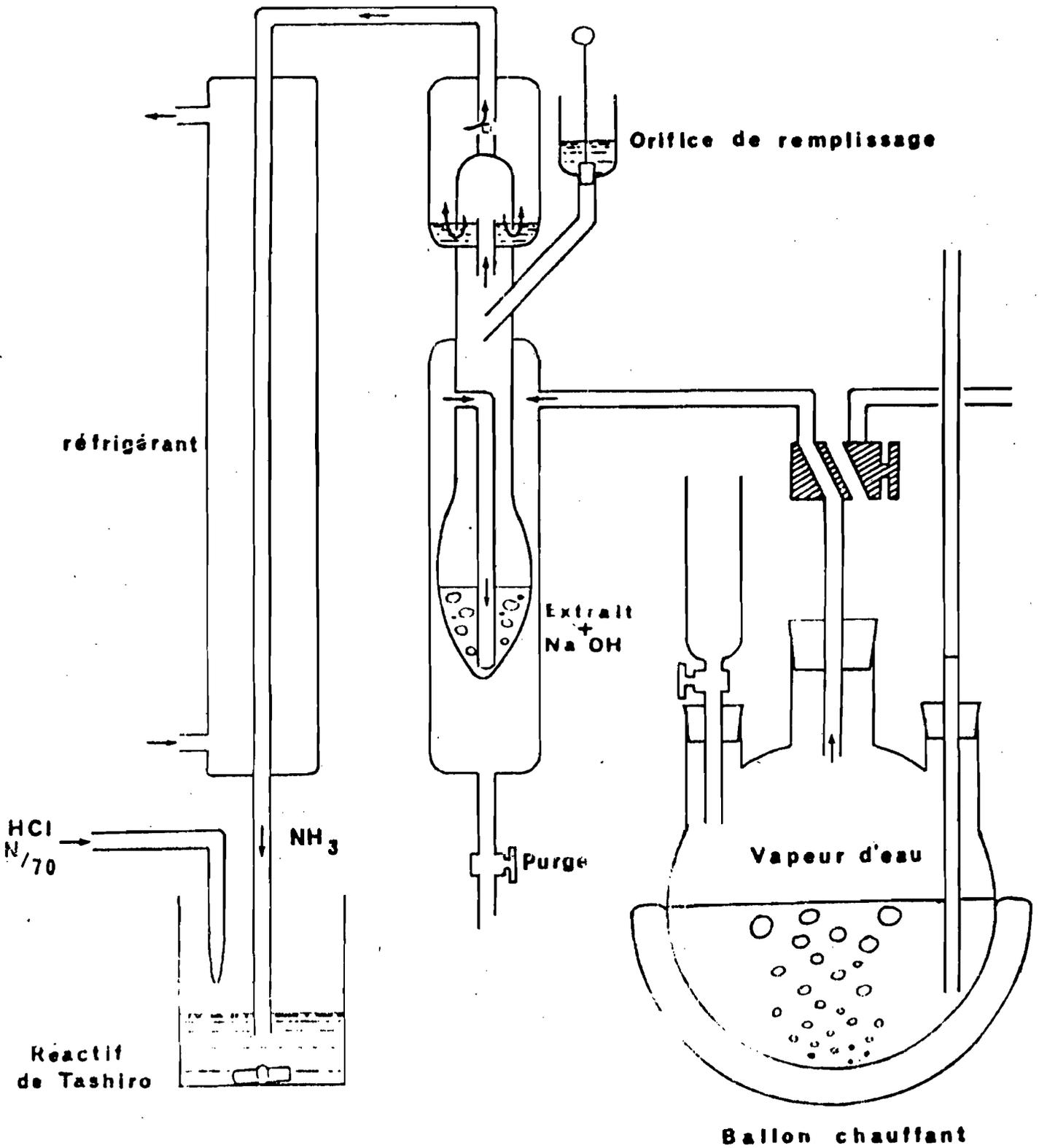


Fig. 3. Schéma de l'appareil de PARNAS-WAGNER.

4.1. Préparation des échantillons

Chaque plante est séchée (48 h dans une étuve à 60°C) puis pesée (on pèse séparément racine, feuille et nodules) chacune de ces composante est ensuite réduite en poudre par un passage au broyeur (Réf Thomas Wiley model EDJ).

Avec chaque échantillon on fait 3 analyses sur 50 mg de poudre qu'on porte dans des matras en vue de la minéralisation.

4.2. Minéralisation

Elle est réalisée en présence d'acide sulfurique concentré. 1 ml d'acide sulfurique est ajouté à chaque matras. On chauffe sur des rampes de minéralisation munis de six brûlures (Thermostat au maximum). Il apparait d'abondantes fumées blanches. On arrête le chauffage quand l'émission de fumées cesse.

On ajoute alors quelques gouttes d' H_2O_2 (110 volume) et on chauffe à nouveau jusqu'à décoloration du milieu. L'eau oxygénée permet d'achever la minéralisation par augmentation brusque de la température (360°C).

4.3. Distillation et dosage

Le minéralisat est introduit dans un appareil de Parnass Wagner (Fig. 3). L'ammoniac est déplacé par 5 ml de lessive de soude (NaOH 10 N) puis entraîné par la vapeur.

Le distillat est recueilli dans un bécher contenant de l'eau distillée et quelques gouttes du réactif de Tashiro (1 volume de bleu de méthylène à 70 % dans l'alcool à 95° 5 volumes de rouge de méthyle à 0,15 % dans l'alcool à 95°).

La coloration provoquée par le réactif de Tashiro est verte en milieu alcalin est mauve en milieu acide.

L'ammoniac est neutralisé au fur et à mesure de sa distillation par de l'acide chlorhydrique N/70. On apporte l'acide au moyen d'une microburette de façon à ramener constamment la solution contenue dans le bécher à sa teinte initiale gris-bleue. La durée moyenne de la distillation est de 3 mn.

4.4. Calcul de la teneur en azote

La masse atomique de l'azote étant 14 à 1 ml de HCl N/70 correspond 0,2 mg d'azote.

Concentration en N de l'échantillon :

$$N \% = 0,2 \times V \times \frac{100}{P}$$

V = volume HCl N/70 (en ml)

P = poids de l'échantillon (en mg)

Pour une prise d'essai de 50 mg, il vient

$$N \% = 0,4 \times V$$

III. RESULTATS

1. Etude in situ de la fixation d'azote caulinaire par Sesbania rostrata au cours de cycles végétatifs initiés à différentes époques de l'année.

Les semis successifs auront été effectués tout au long de l'année 1983, à intervalles de 4 semaines à compter du mois de Février.

Pour chaque cycle végétatif, les inoculations ont lieu 3 semaines après le semis puis à intervalle de 2 semaines (3, 5, 7, 9 et 11 semaines). Les différentes mesures sont effectuées à 5, 7, 9, 11 et 13 semaines.

L'analyse complète de l'ensemble des résultats obtenus ne pourra être effectuée qu'au début de l'année 1984.

Nous ne donnerons ici qu'une analyse relativement sommaire des résultats concernant les 4 premiers cycles végétatifs.

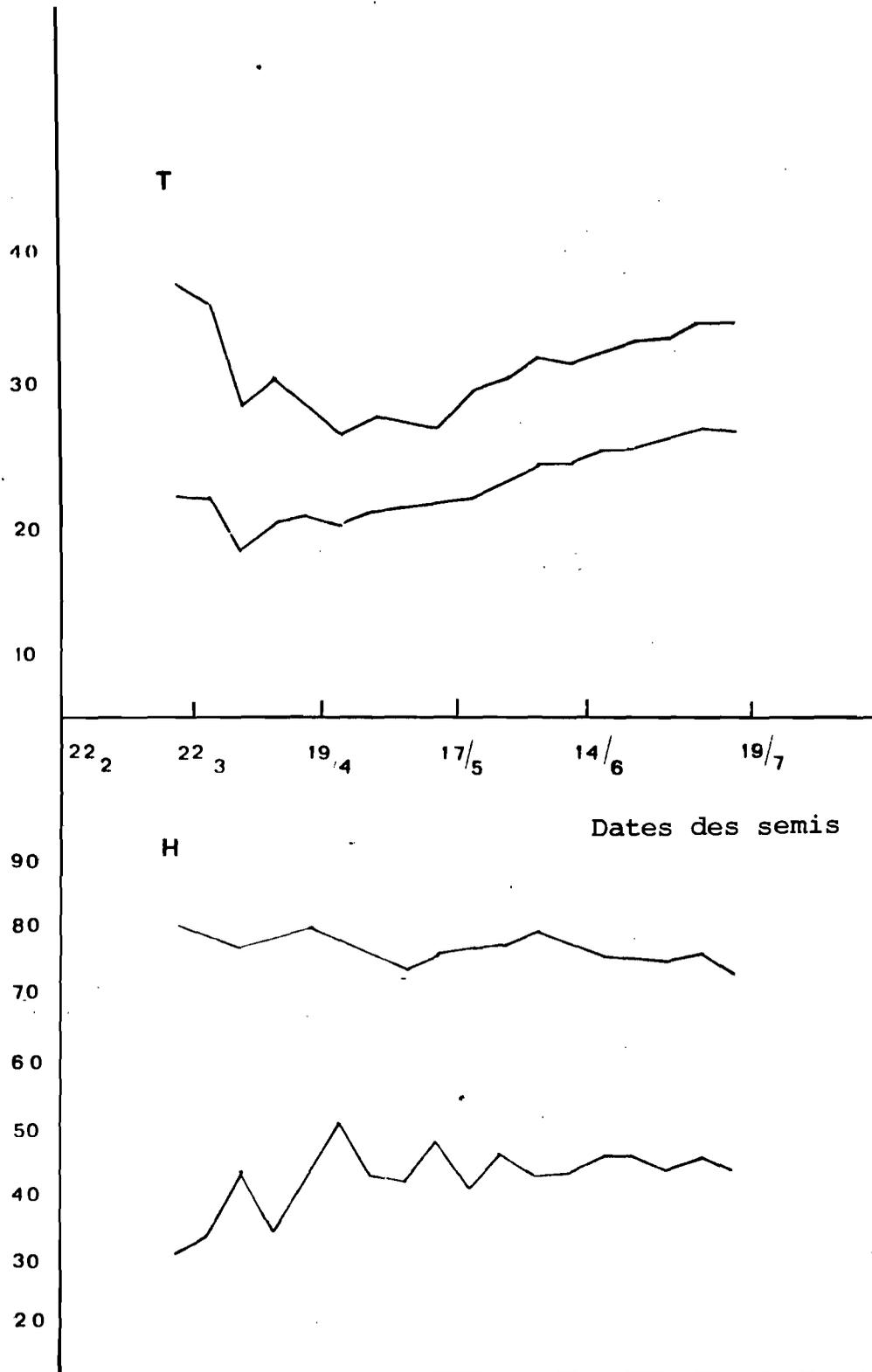
1.1. Evolution de la température et de l'humidité de l'air au cours de l'année 1983.

Nous avons représenté à la Fig. 4 l'évolution des valeurs maximales et minimales de ces deux paramètres.

- Exceptionnellement élevée au début du mois de Mars (38-22°C) la température décroît rapidement jusqu'à la fin du mois de Mars, puis croît à nouveau régulièrement (35-28°C fin Juillet).

- En ce qui concerne l'humidité de l'air, les variations sont moins marquées. L'humidité maximale est comprise entre 70 et 80 %

Fig. 4. Relevé de température et d'humidité



de Mars à Juillet, l'humidité minimale augmente d'abord de 30 à 40 % en Mars-Avril puis se stabilise à 40 - 45 % jusqu'en Juillet.

1.2. Evolution de la fixation d'azote caulinaire

Nous avons rapporté à la Fig. 5 les résultats concernant les 4 premiers cycles végétatifs de S. rostrata.

Il apparaît que l'activité réductrice d'acétylène (ARA) augmente régulièrement du cycle S_1 au cycle S_2 .

Si l'on considère maintenant les ARA mesurées à 5 et 7 semaines, on observe que l'activité décroît de S_1 à S_2 puis augmente de S_2 à S_3 puis S_4 .

Des observations analogues peuvent être faites en ce qui concerne le nombre et le poids sec de nodules qui passe de 300 au semis S_1 à plus de 800 au semis S_3 Fig. 6 et Fig. 7.

Ces variations s'expliquent manifestement par les variations de température (diminution rapide en Février, Mars puis augmentation d'Avril à Juillet). La température apparaît donc comme l'un des principaux paramètres qui conditionnent la nodulation et la fixation d'azote caulinaire.

1.3. Contribution des différentes portions de tige inoculées successivement à la fixation globale de la plante

Aux inoculations (IA, IB etc...) effectuées à 3, 5, 7, 9 et 11 semaines, correspond la formation de nodules sur des portions successives de tige (a, b, c, d, et e) (cf Fig. 8).

Fig. 5. Evolution de l'ARA par plante.

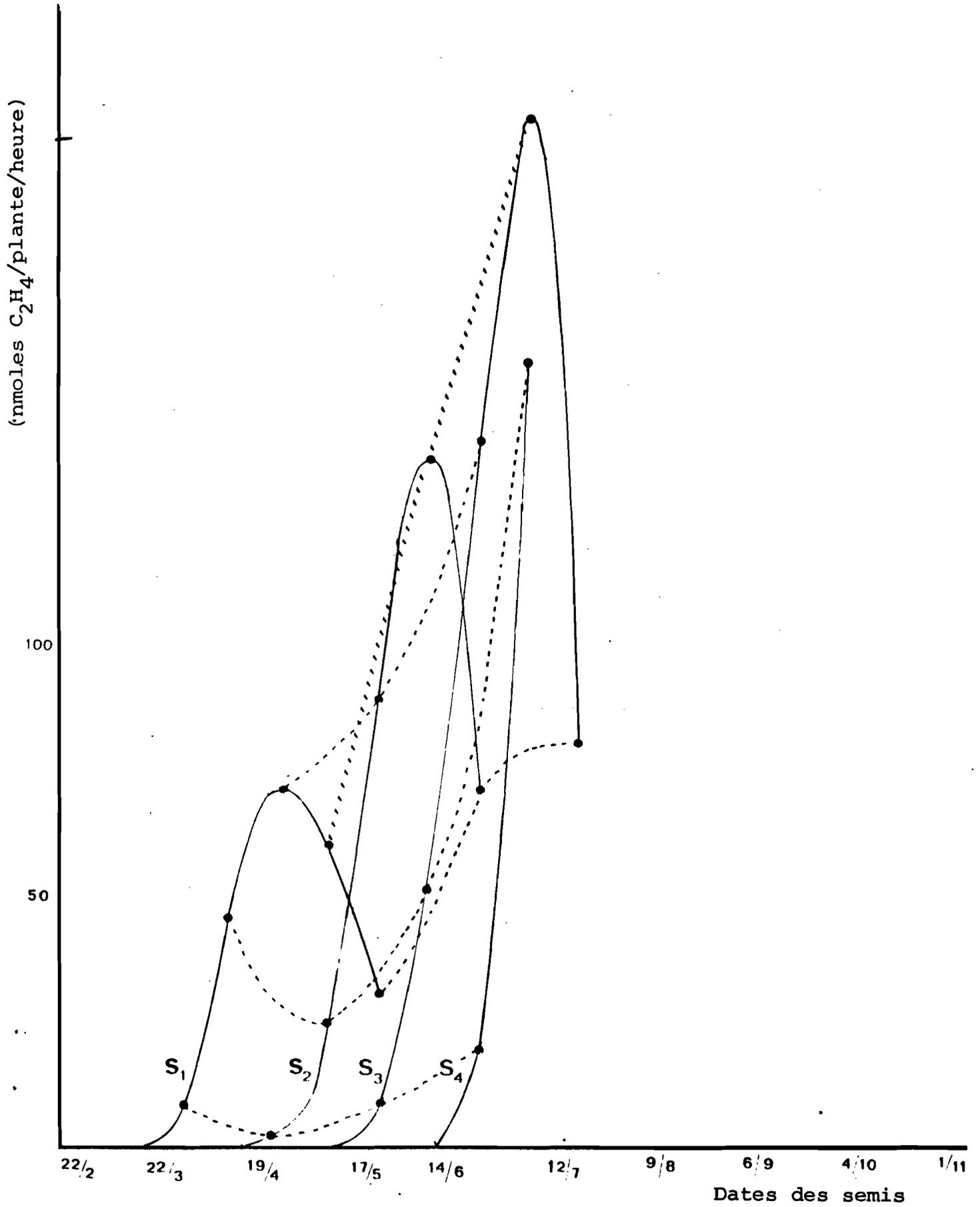


Fig. 6. Evolution du nombre de nodules

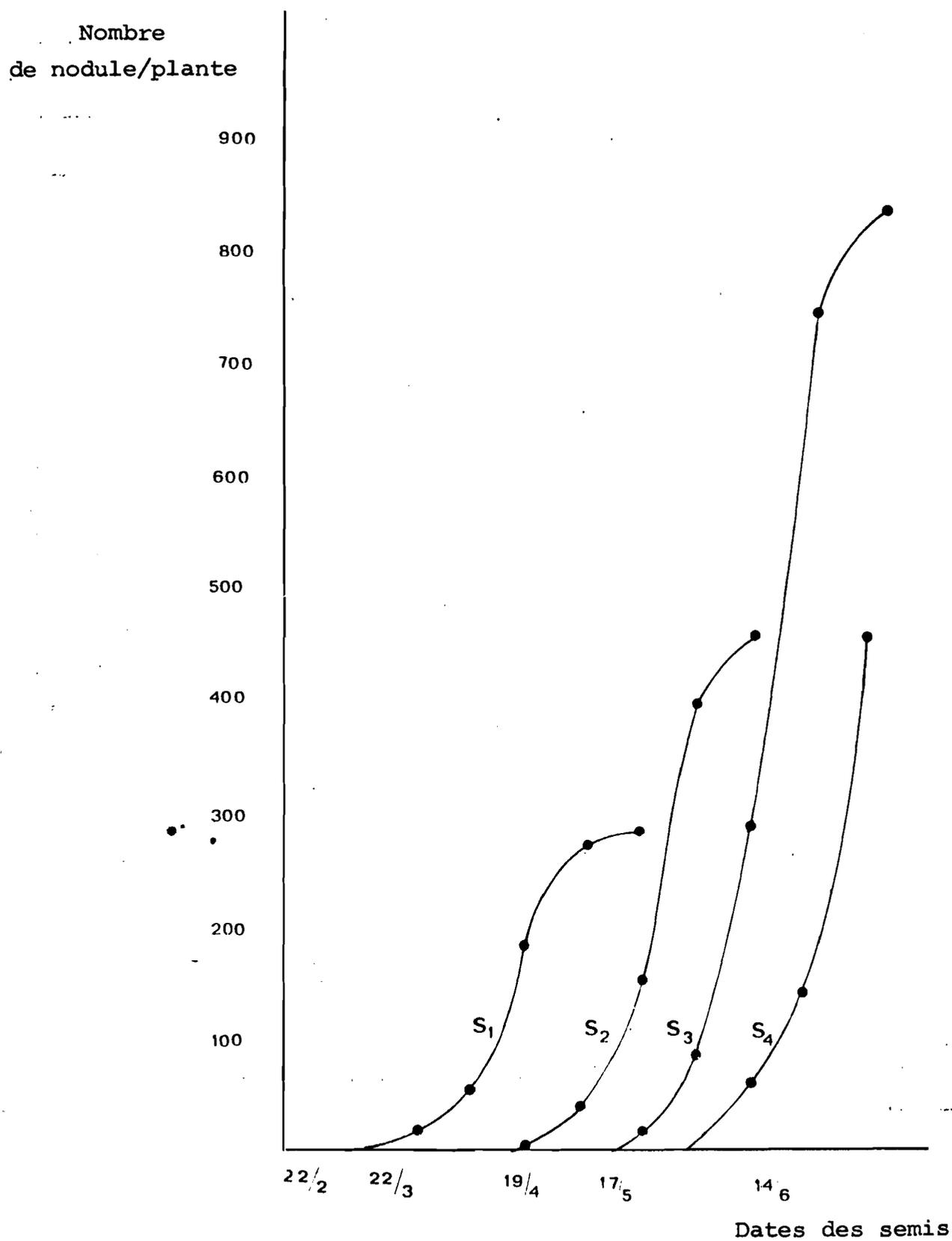


Fig. 7. Evolution du poids sec des nodules

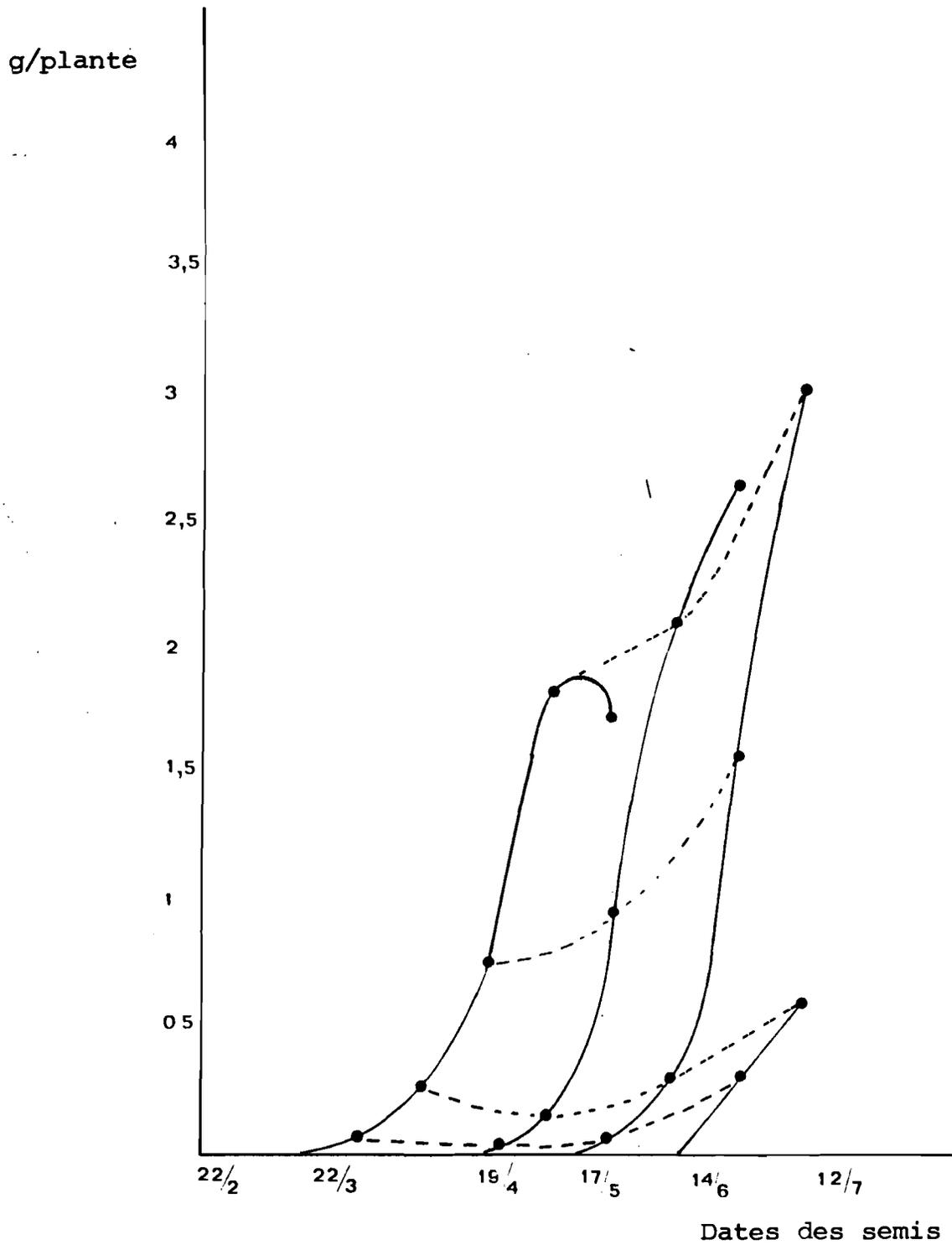
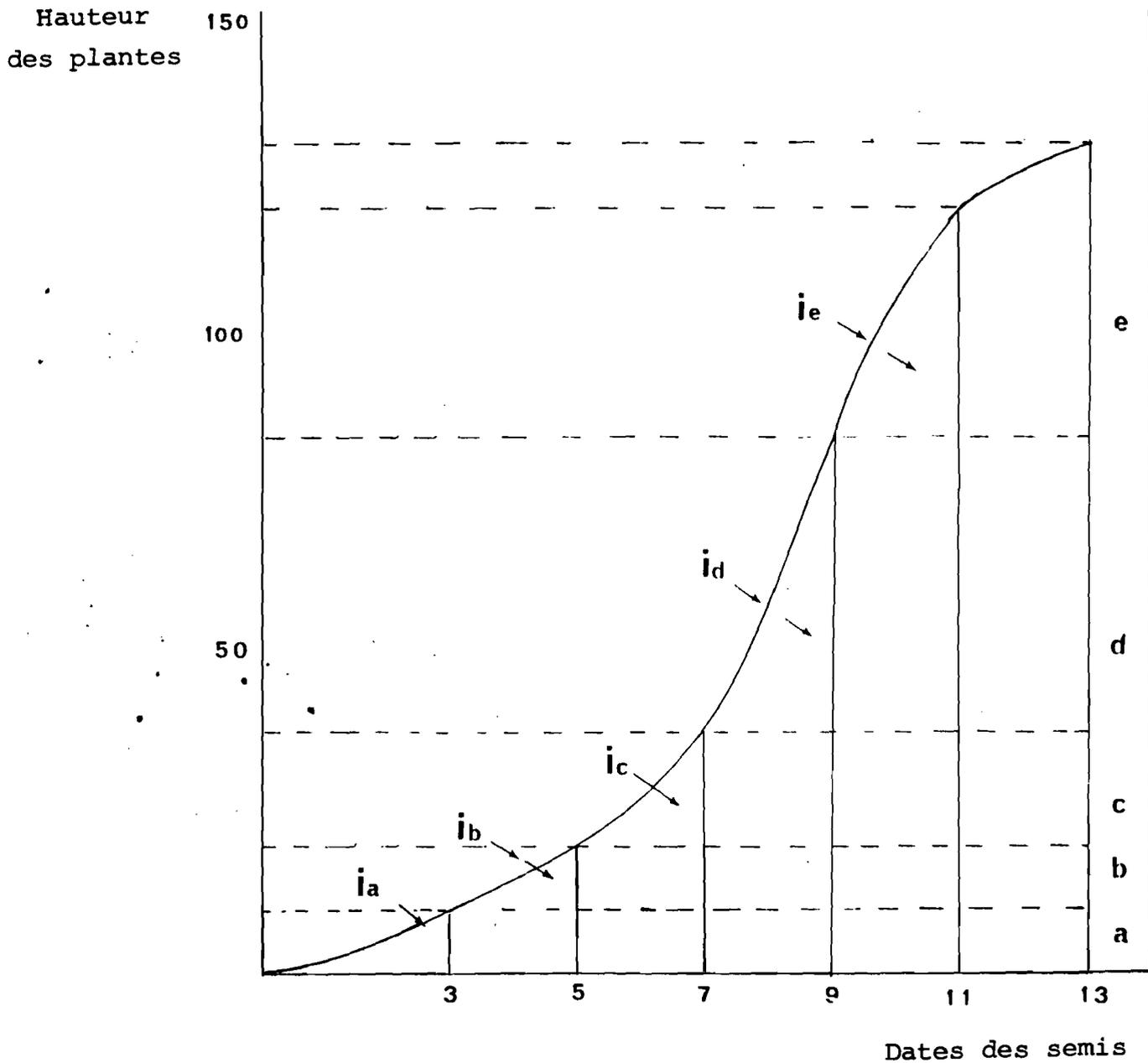


Fig. 8. Inoculations successives des tiges de S. rostrata au cours de sa croissance.



La première inoculation (i_a) a lieu 3 semaines après le semis. Les inoculations suivantes (i_b , i_c) ont lieu à intervalles de 2 semaines (portions de tiges b, c....).

Il nous a paru intéressant de mesurer l'activité de ces différentes portions de tige afin d'estimer leurs contributions respectives. On observe (Fig. 9) que celle-ci varie en fonction du cycle végétatif ; on obtient par activité décroissante le classement suivant :

$$S_1 : a, b, c, d, e,$$

$$S_2 : c b, a, d e$$

Une telle analyse devrait nous permettre ultérieurement, de déterminer en fonction des conditions climatiques les dates optimales d'inoculation.

1.4. ARA spécifique des nodules de tige (Fig. 10).

Nous avons représenté à la Fig. 9 les variations de l'ARA spécifique globale des nodules de tige de S. rostrata. L'activité optimale est obtenue à 5 semaines (les nodules ont alors 2 semaines), et passent de 200 nmoles $C_2H_4/h/g$ nodules secs (cycle S_1) à 300 nmoles $C_2H_4/h/g$ nodules secs (cycle S_4). Elle décroît ensuite très rapidement.

Ultérieurement nous effectuerons une étude plus fine de ce phénomène, consistant à analyser l'ARA spécifique des nodules portés par les différentes portions de tige.

1.5. Evolution de la hauteur, du poids sec et de la teneur en azote des plantes

Nous avons montré que le taux de croissance maximum de S. ros-trata se situait entre la 9e et la 11e semaine.

Fig. 9. Evolution de l'ARA par plante.

On a figuré la contribution des différentes portions de tige.

T : activité cumulative par plante.

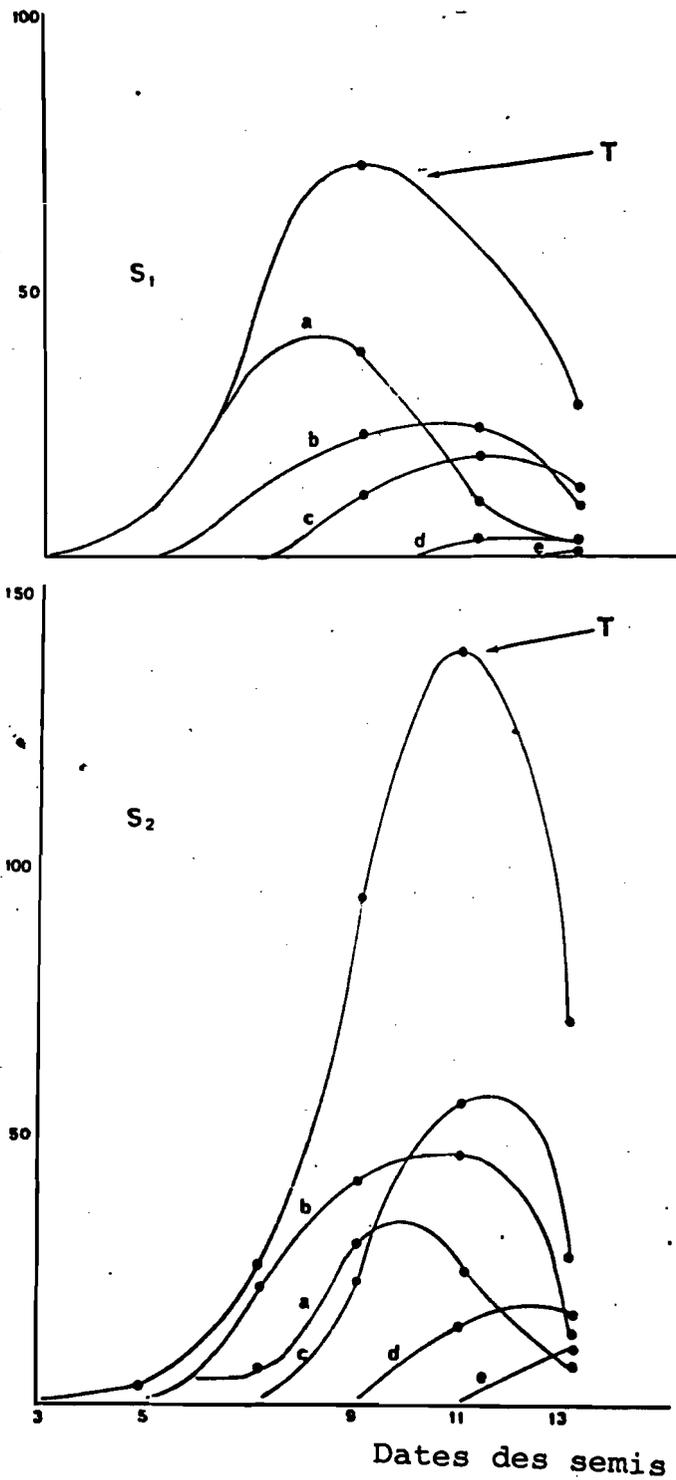
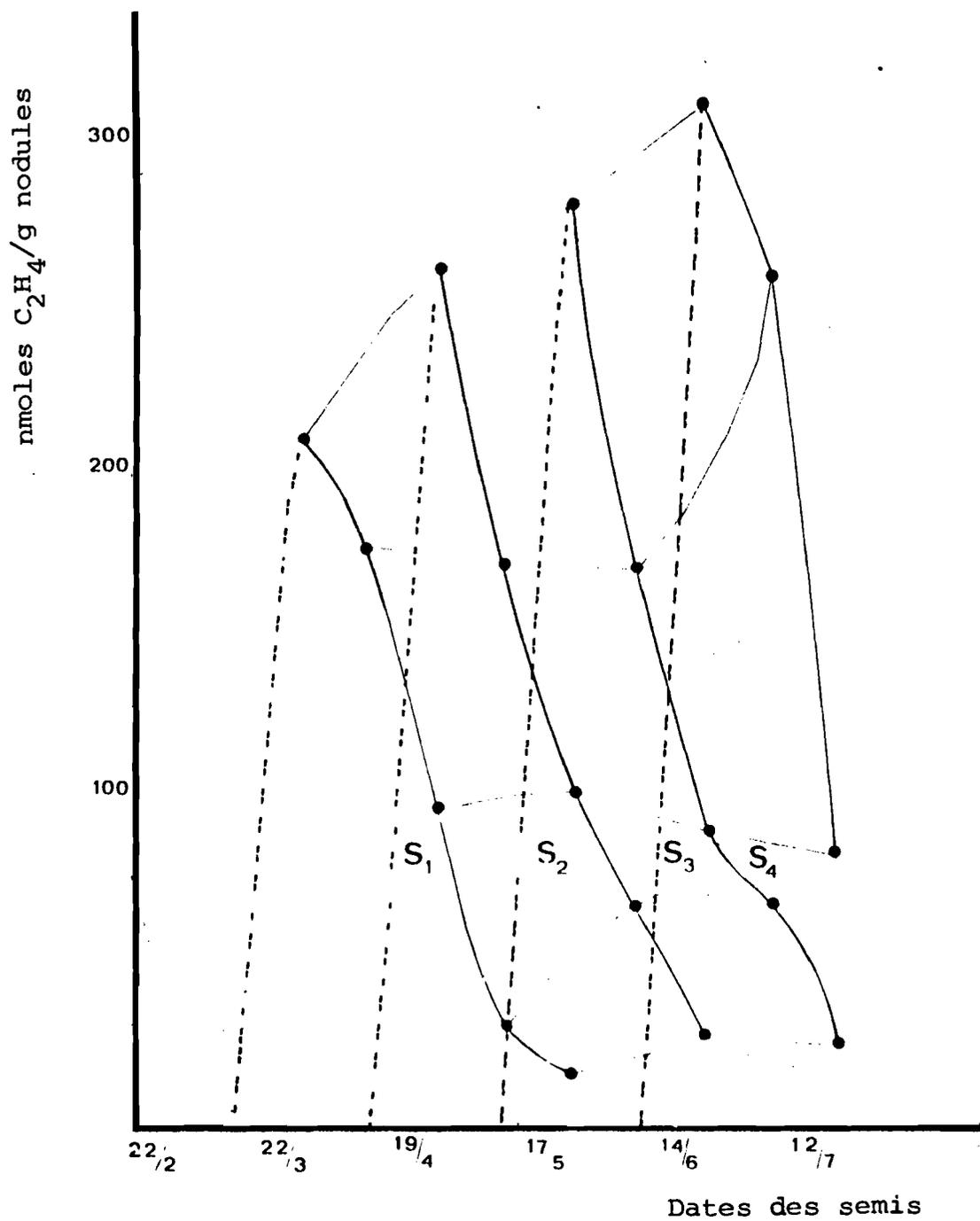


Fig. 10. Evolution de l'ARA spécifique



Le relevé des températures et de l'humidité ambiante de Février à Juillet 1983 Fig. 3 fait apparaître une décroissance de la température au mois de Mars (38-22°C). Celle-ci croît de nouveau (28-35°C fin Juillet). Tandis que l'humidité reste relativement stable.

L'augmentation de la température coïncide avec l'amélioration de la symbiose Rhizobium - S. rostrata, aux cycles S₂ et S₃. Cette amélioration se traduit par une augmentation de la hauteur des plantes du poids sec et de la teneur en azote des plantes. Par contre le cycle végétatif S₁ couvrant la période froide (Mars-Avril) ne présente pas une symbiose optimale. Fig. 11, Fig. 12 A et Fig. 12 B.

3.2. Effet de l'azote combiné (NH₄NO₃) sur de jeunes plantes de S. rostrata cultivées en tube

Les expériences ont consisté à comparer la nodulation et la fixation d'azote de jeunes plantes de S. rostrata, comportant des nodules racinaires ou caulinaires où les deux types de nodules.

Les plantes sont d'abord cultivées sur un milieu contenant 3 mM NH₄NO₃. A 3 semaines, ce milieu est remplacé par un milieu contenant des quantités variables de NH₄NO₃ de (0 à 15 mM) et on procède à l'inoculation (tiges ou racines). Le milieu sera alors renouvelé (ou complété) fréquemment en raison de l'évapotranspiration.

Deux séries d'expériences ont été réalisées :

- Expérience A: le milieu est renouvelé 2 fois par semaine par du milieu neuf ; entre deux apports successifs le milieu est complété par de l'eau stérile quand nécessaire.

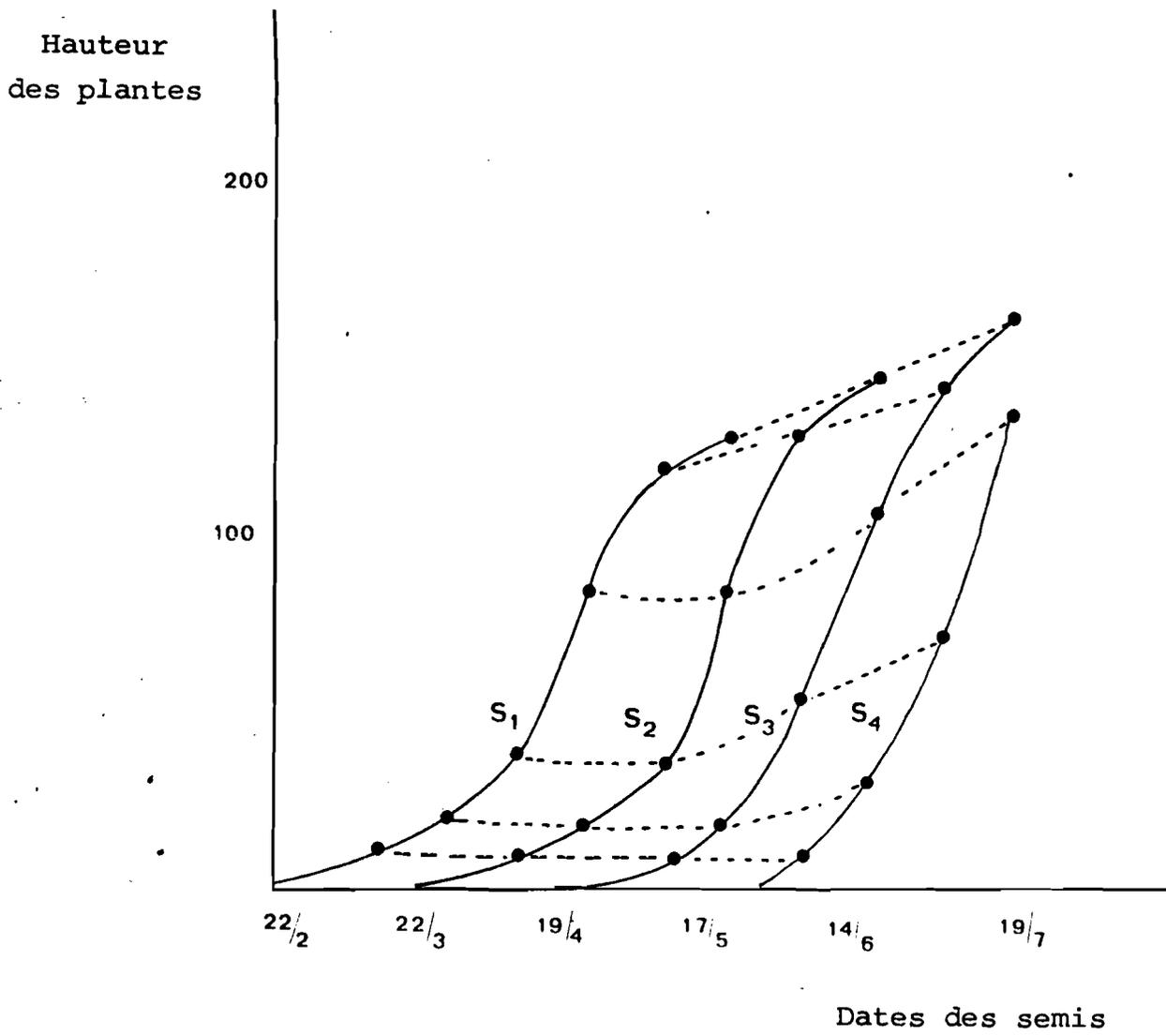
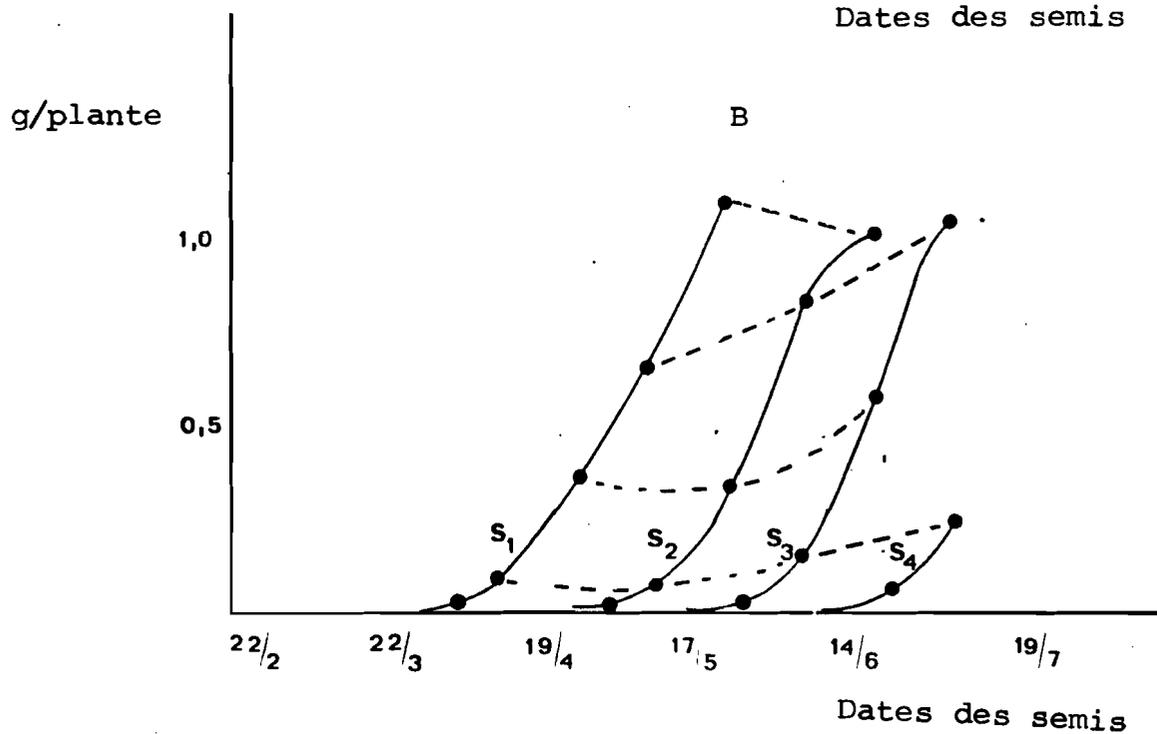
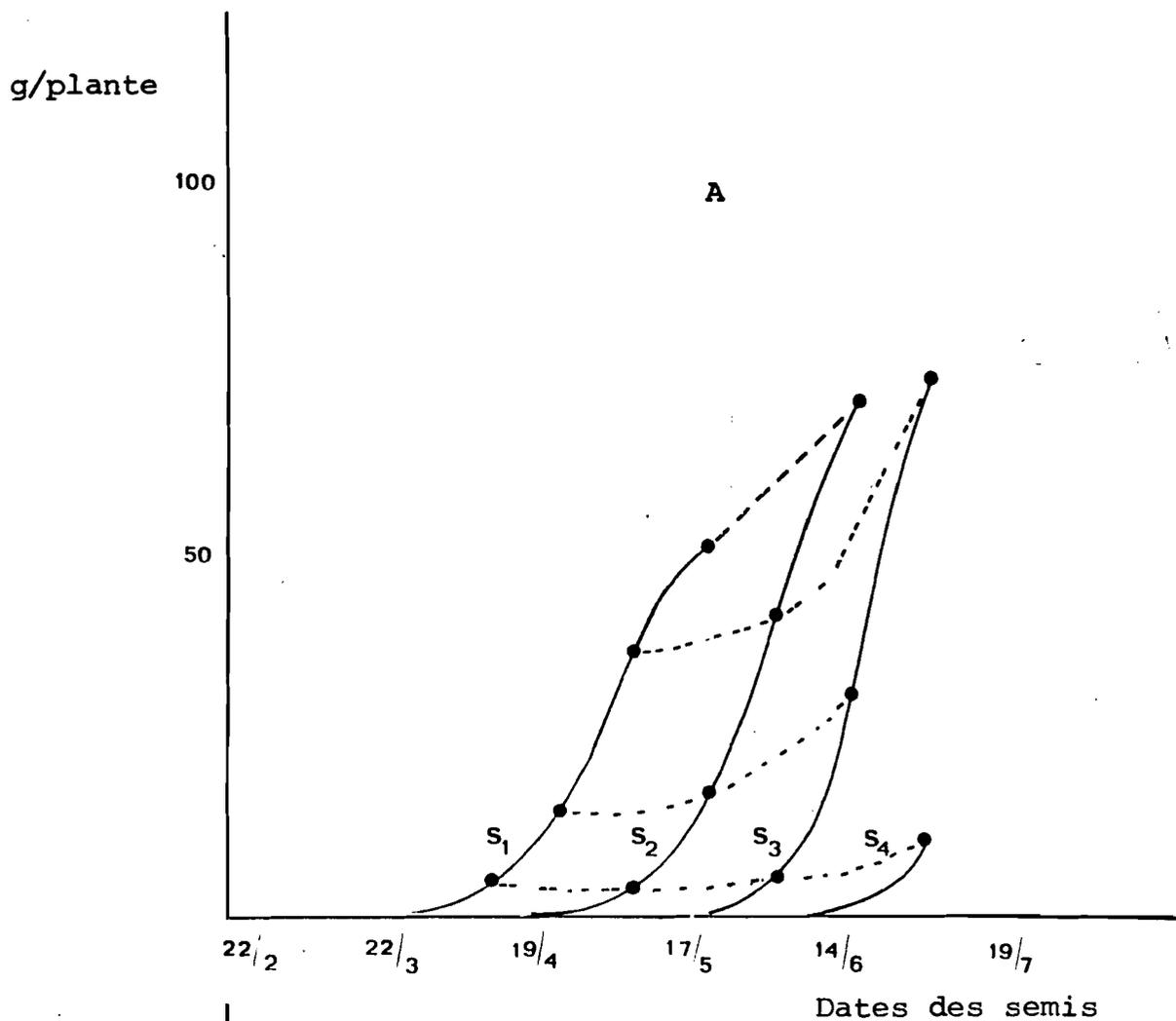
Fig. 11. Evolution de la croissance de *Sesbania rostrata*.

Fig. 12. A. Evolution du poids sec des plantes.

B. Evolution de la teneur en azote des plantes.



- Expérience B : le milieu est complété par du milieu neuf au fur et à mesure de l'évapotranspiration.

Les résultats obtenus sont illustrés par la Fig. 13.

Expérience A : la nodulation caulinaire et l'activité réductrice d'acétylène sont maximales pour une concentration de 3 mM NH_4NO_3 . Elles ne diminuent significativement que pour des concentrations supérieures à 5 mM NH_4NO_3 .

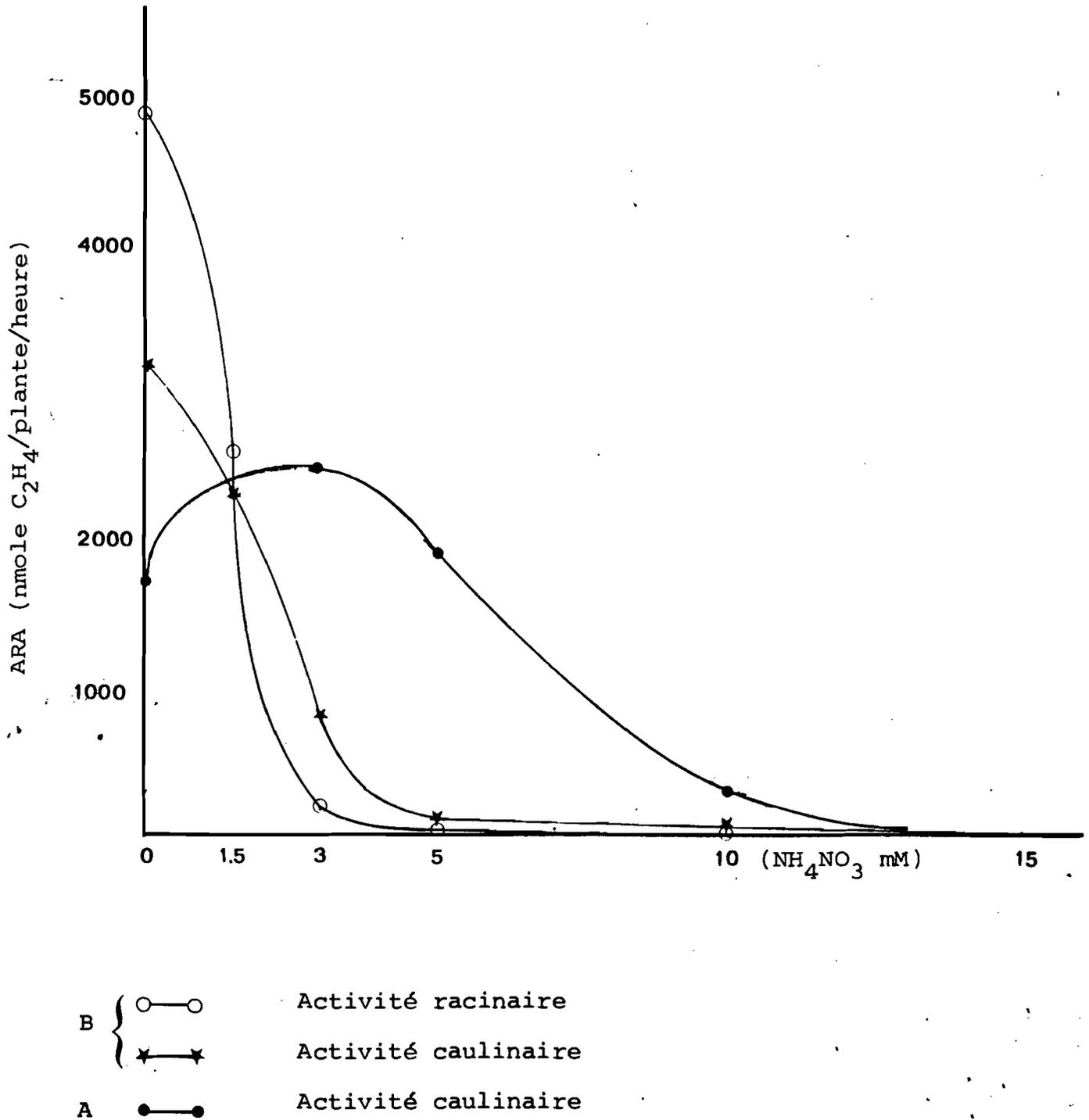
Expérience B : on constate que l'azote combiné exerce un effet inhibiteur marqué sur l'activité réductrice d'acétylène (racinaire ou caulinaire) même à la concentration de 1,5 mM NH_4NO_3 . Toutefois l'inhibition de l'activité racinaire est beaucoup plus marquée que celle de l'activité caulinaire (l'ARA racinaire à 3 mM NH_4NO_3 correspond à environ 4 % de l'ARA sur milieu J.O., alors que l'ARA caulinaire à 3 mM NH_4NO_3 correspond à environ 25 % de l'ARA sur milieu J.O.).

Les différences observées entre ces 2 types d'expériences peuvent être expliquées par le mode d'apport de milieu neuf.

Dans le cas de l'expérience A, le milieu est renouvelé régulièrement, et, entre 2 apports successifs, la concentration en azote est plus basse que la valeur initiale en raison de son assimilation par la plante.

Par contre dans le cas de l'expérience B, le milieu n'est pas renouvelé et les apports successifs peuvent conduire à une surconcentration du milieu en azote.

Fig. 13. Effet de l'azote combiné sur la fixation d'azote par *Sesbania rostrata*.



Les essais réalisés en culture hydroponique, ont montré que l'effet inhibiteur de l'azote combiné sur la nodulation et l'activité fixatrice est beaucoup plus marqué dans le cas des nodules de racine que dans le cas des nodules de tige.

IV. CONCLUSIONS

L'étude de la fixation d'azote caulinaire par S. rostrata au cours de cycles végétatifs initiés à différentes époques de l'année, a mis en évidence l'incidence des conditions climatiques sur l'efficacité de la symbiose Rhizobium S. rostrata. On observe en effet de Février à Juillet 1983 une corrélation très nette entre d'une part l'élévation de température, d'autre part l'activité fixatrice (ainsi que le poids sec et la teneur en azote des plantes). Il est probable que l'allongement de la durée du jour au cours de cette période, a constitué également un facteur favorable.

Compte tenu de l'importance de S. rostrata sur le plan agronomique (son utilisation comme engrais vert en riziculture irriguée ou comme engrais vert organique dans le cas de culture éxondées), il importe de définir les conditions optimales de croissance notamment de déterminer les dates d'inoculations optimales. L'analyse de l'activité des nodules correspondant aux inoculations effectuées à diverses dates de croissance de la plante, devrait nous permettre de déterminer la fréquence et les dates d'inoculation.

De même il est permis de penser que par l'analyse de paramètres de croissance aisément mesurables. (hauteur et poids sec des plantes) on puisse faire une estimation de l'azote fixé et de l'azote total des plantes.

L'étude de l'effet de l'azote combiné (NH_4NO_3) sur la fixation d'azote par de jeune plante de S. rostrata cultures sur milieu liquide, a montré que les nodules caulinaires sont beaucoup moins sensibles à l'effet inhibiteur de l'azote combiné, que les nodules

racinaires. Il apparaît même pour des concentrations en NH_4NO_3 comprise entre 0 et 3 mM (soit entre 0 et 64 ppm N), une stimulation de la fixation d'azote caulinaire, s'expliquant probablement par une croissance plus vigoureuse de la plante (donc une production plus forte de photosynthétats). Cette aptitude de S. rostrata à utiliser simultanément l'azote moléculaire et l'azote combiné, lui confère un avantage supplémentaire par rapport aux légumineuses ne disposant que de nodules racinaires.

V. PERSPECTIVES

Les résultats concernant l'étude de la fixation d'azote par S. rostrata au cours de cycles végétatifs initiés à différentes époques de l'année, ne sont que partiels.

L'analyse détaillée de l'ensemble des résultats ne pourra être effectuée qu'à l'issue de cette étude (début 1984). Nous en attendons des implications importantes sur le plan des applications agronomiques.

Lors de l'étude en culture hydroponique concernant l'effet de l'azote combiné sur l'activité fixatrice d'azote, nous avons constaté que les procédés utilisés pour renouveler le milieu de culture sont peu satisfaisants, car ils ne permettent pas de maintenir la concentration en azote combiné à un niveau stable.

Les résultats obtenus seront présentés par l'utilisation d'un système de culture avec apport continu de milieu.

D'autres études en cours n'ont pas été mentionnées dans le présent rapport. Ces études concernent notamment :

- des tests d'efficacités de nouvelles souches de Rhizobium capables de noduler S. rostrata.

- l'utilisation de S. rostrata comme engrais vert pour le riz irrigué sur un sol très argileux (les essais réalisés jusqu'ici concernaient des sols de textures légères).

- l'utilisation de S. rostrata comme engrais organique dans le cas d'une culture de maïs.

- la recherche de la densité de semis permettant une productivité optimale de S. rostrata.

Enfin l'acquisition prochaine de divers éléments qui compléteront l'équipement du laboratoire pour les analyses ^{15}N nous permettra de comparer diverses méthodes d'estimation de la fixation d'azote par S. rostrata.

- méthode de l'équivalent engrais
- méthode par différence (bilan N total)
- méthodes isotopiques
- méthodes de réduction de l'acétylène.

L'ensemble de ce travail fera l'objet d'une Thèse de 3ème cycle.

Références bibliographiques

BERHAUT, J. (1976). Flore illustrée du Sénégal. Clairafrique, Dakar, B.P. 56, Sénégal.

B.L., DREYFUS, C. ELMERICH and Y.R., DOMMARGUES. Free-living Rhizobium strain able to grow on a N_2 as the sole Nitrogen Source Applied and environmental microbiology Feb. 1983. p. 711-713.

LEGG, J.O. & SLOGER, C. (1975). A tracer method for determining symbiotic N_2 fixation in field studies Proc. 2nd. Int. Conf. Stable Isotopes Klein & Klein(Cds) Dak Brook.

POSTGATE, J. La fixation biologique de l'azote. La recherche N° 66 Avril 1976 p. 335-347.

RINAUDO, G. (1970). Fixation biologique de l'azote dans trois types de sols de rizière de Côte d'Ivoire. Thèse d'Ingénieur Docteur Université de Montpellier.

RINAUDO, G., DREYFUS, B. and DOMMARGUES, Y. (1982). Sesbania rostrata as green manure for rice in West Africa. In " Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture ". Graham P.H. & Darris, S.G. (Eds). pp. 441-445.

RINAUDO, G., DREYFUS, B., and DOMMARGUES, Y. (1983). Sesbania rostrata green manure and the nitrogen content of rice crop and soil. Soil. Biol. Biochem. 16 : 111-113.

SLOGER, C., BERDICEK, D., MILBERG, R. & BOONJORD, M. (1975). In
"Nitrogen Fixation by free living microorganisms" Stewart W.D.P.
(Ed). University Press. London. Vol. 6 pp. 271-284.

VINCENT, J.H. (1970). A manual for the practical study of the root
nodule bacteria I.B.P. Hand book N° 15, Blackwell Scientific
Publications, Oxford.