

# THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

Par

Adako MOUDIONGUI

*SESBANIA ROSTRATA*, légumineuse à nodules  
Caulinaires: FIXATION SYMBIOTIQUE D'AZOTE,  
ET UTILISATION COMME ENGRAIS VERT.

Soutenue le 29/09/87

Jury : MM. R. BARDIN

J. BALANDREAU

G. RINAUDO

A. MOIROUD

H. SAINT MACARY

Président

Rapporteur

Directeur de Thèse

Examineurs

ORSTOM Fonds Documentaire

N° : 25.058 4x2

Cote : A

30 JUIN 1988

# TDM 44

## ORSTOM

Editions de l'ORSTOM

INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION

*Collection :*

Travaux et documents microédités

PARIS 1988

ISBN 2-7099-0920-0

© ORSTOM

« La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, « que les «copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective» et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite » (alinéa 1er de l'article 40).

« Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code Pénal ».

# F4

A mon père, in memoriam

A ma mère

A mes soeurs ,frères et beaux- frères

A mes nièces et neveux

A ma famille

A tous mes amis auxquels j'adresse cette pensée:

"Kumbu a wéni batiri bambayi"

"Ton nom ce sont les autres qui le prononcent"



## Avant propos

J'adresse ma vive reconnaissance à Monsieur le Professeur Bardin qui me fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur J. Balandreau d'avoir accepté de participer à ce jury et d'en être le rapporteur. Je remercie également Monsieur H. Saint Macary d'avoir trouver le temps nécessaire pour juger ce mémoire.

J'exprime mes remerciements à Melle Gounot et Monsieur A. Moiroud de l'Université Claude Bernard de Lyon de m'avoir accueilli en stage de DEA.

Je remercie Monsieur Dommergues Directeur de Recherche au CNRS qui est l'initiateur de ce travail ; que Monsieur Rinaudo Directeur de Recherche à l'ORSTOM qui l'a dirigé trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Ce travail a bénéficié de l'appui scientifique de C. Franche, D. Bogusz chargés de Recherche à l'ORSTOM et de Monsieur le Professeur E. Duhoux de l'Université de Dakar auxquels j'exprime ma profonde gratitude.

Je remercie tout particulièrement mes collègues; P. Delajudie pour ses conseils et D. Alazard pour ses pertinentes mais parfois traumatisantes remarques.

J'ai trouvé auprès de Monsieur Dalmayrac Directeur de l'ORSTOM au Sénégal ainsi qu'auprès de Monsieur Wakermann Chef du Département F un soutien bienveillant qui a rendu ce travail possible, je les remercie vivement.

Le laboratoire de Microbiologie de l'ORSTOM à Dakar a constitué tant sur le plan scientifique qu'humain une ambiance privilégiée pour la réalisation de ce travail.

Je remercie sincèrement tous les techniciens et les chercheurs pour l'amitié et l'aide qu'ils m'ont témoignées tout au long de ce travail, qu'ils me pardonnent si je ne peux les citer tous. Le concours de Messieurs J. Bakhoum et O. Camara, Taher Maiga m'a été précieux. Je remercie Madame Cissé Anne Marthe Konté pour avoir dactylographié ce mémoire.

Il m'est difficile en quelques lignes d'exprimer ici toute ma reconnaissance à l'Etat Congolais pour l'importance sans cesse accordée à la formation des hommes.

Année 1987

Nom de l'auteur : Adako MOUDIONGUI

Sesbania rostrata, légumineuse à nodules caulinaires : Fixation symbiotique d'azote et utilisation comme engrais vert.

Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard de Lyon.

Résumé

Des souches de Rhizobium isolées de Sesbania rostrata provenant de différents lieux géographiques du Sénégal, ont été analysées. Leur comparaison avec la " souche de tige " de référence ORS571 a permis de mettre en évidence des différences au niveau des parentés immunologiques, du contenu plasmidique, de l'activité nitrogénase en condition de dérepression, et de l'efficacité de la symbiose. L'azote combiné, ammoniacal ou nitrique affecte à la fois la nodulation et l'activité réductrice d'acétylène des nodules caulinaires et racinaires, mais les nodules racinaires sont plus affectés que les nodules caulinaires. L'étude cytologique des nodules caulinaires en microscopie électronique a montré qu'en présence de fortes doses d'azote combiné la dernière phase du processus de l'infection caulinaire (libération des bactéries du cordon d'infection dans le cytoplasme des cellules du méristème nodulaire) est bloquée. Des cycles végétatifs successifs initiés toutes les deux semaines tout au long de l'année ont permis de montrer que chez S. rostrata le développement et la fixation d'azote sont très sensibles aux conditions climatiques en particulier à la photopériode et la température. Les potentialités fixatrices de S. rostrata ont été évaluées par deux méthodes, la méthode par différence et la méthode de dilution isotopique N-15. La quantité d'azote fixée par S. rostrata en 53 jours a été évaluée à environ 300 Kg N/ha.

Il est apparu que S. rostrata utilisé comme engrais vert peut être bénéfique non seulement pour la culture irriguée du riz, mais également en culture exondée (riz et sorgho). Les essais correspondants ont été effectués à la station ORSTOM Bel-Air de Dakar et en milieu paysan en Casamance (Sud du Sénégal).

MOTS-CLES

- Azote - 15
- Azote combiné
- Engrais vert
- Fixation d'azote
- Nodules caulinaires
- Sesbania rostrata
- Rhizobium



Title : S. rostrata , a stem nodule legume:  
 symbiotic nitrogen fixation and use as  
 green manure.

### SUMMARY

Strains of Rhizobia isolated from Sesbania rostrata plants collected from various localities in Senegal have been compared to the reference stem nodulating strain ORS571. They exhibit different serological properties, plasmid contents and nitrogenase activities in the free living state. Combined nitrogen (ammonium or nitrate) affects both stem and root nodulation and acetylene reducing activity; however root nodules are more affected than stem nodules. Cytological study of stem nodules developed in the presence of combined nitrogen have been made by photonic and electron microscopy. It appears that the last step of stem nodulation process (release of bacteria into the host plant cells) is blocked by high levels of mineral nitrogen. S. rostrata was sown every two weeks during a one year period. Symbiotic parameters were evaluated 50 days after seeding. It appears that photoperiod and temperature are major factors that affect plant development and nitrogen fixation. Nitrogen fixation potentiality of S. rostrata was quantified using two methods : isotopic dilution and the difference method. It was calculated that S. rostrata is able to fix an average of 300 KgN/ha during 53 days. It has been shown that incorporation of S. rostrata as green manure for upland rice and sorghum resulted in a grain yield increase. The experiments were conducted during the rainy season at the ORSTOM Bel Air station in Dakar and in farmer's field in Casamance (south Senegal)

### Keys words

- Combined nitrogen
- Green manure
- Nitrogen-15
- Nitrogen fixation
- Rhizobium
- Sesbania rostrata
- Stem nodule



SOMMAIRE

	page
RESUME.....	7
SUMMARY.....	9
LISTE DES FIGURES.....	19
LISTE DES TABLEAUX.....	23
INTRODUCTION GENERALE.....	27
CHAPITRE I : CARACTERISATION DE DIFFERENTES SOUCHES DE <u>RHIZOBIUM</u>	
ISOLEES DE <u>SESBANIA ROSTRATA</u>	
1. INTRODUCTION.....	41
2. MATERIEL ET METHODES.....	45
2.1. Souches bactériennes.....	45
2.1.1. Isolement des souches de <u>Rhizobium</u> .....	45
2.1.2. Origine géographique des souches.....	45
2.2. Milieux de culture pour <u>Rhizobium</u> .....	47
2.2.1. Milieu complet YL.....	47
2.2.2. Milieu sans azote LO.....	47
2.3. Etude morphologique.....	47
2.4. Tests nutritionnels.....	48
2.5. Résistance naturelle aux antibiotiques.....	48
2.6. Etude des parentés antigéniques entre <u>Rhizobium</u> ORS571 et différentes souches de <u>Rhizobium</u> isolées de <u>S.rostrata</u> .....	48
2.6.1. Préparation de l'antigène.....	48
2.6.2. Préparation de l'antisérum.....	49

	Page
2.6.3. Méthode d'immunofluorescence indirecte.....	49
2.7. Sensibilité des souches de <u>Rhizobium</u> aux phages RS1 et RS2.....	50
2.7.1. Obtention d'un lysat RS1 et RS2.....	50
2.7.2. Titration des phages RS1 et RS2.....	50
2.7.3. Sensibilité aux phages RS1 et RS2.....	51
2.8. Mise en évidence des plasmides.....	51
2.8.1. Technique de Meyers <u>et al.</u> (1976), modifiée par Franche et Reynaud (1985).....	51
2.8.2. Technique d'Eckhardt, modifiée par Rosenberg <u>et al.</u> (1982).....	52
2.8.3. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	52
2.9. Culture des plantes hôtes.....	53
2.10. Spectre d'hôte.....	53
2.11. Mesure de l'activité nitrogénase en condition de dérepression.....	54
2.12. Evaluation de l'efficacité de la symbiose entre différentes souches de <u>Rhizobium</u> et <u>S. rostrata</u> .....	54
3. RESULTATS.....	54
3.1. Morphologie des <u>Rhizobium</u> et des colonies.....	56
3.2. Tests nutritionnels.....	56
3.3. Résistance naturelle aux antibiotiques.....	56
3.4. Parentés antigéniques.....	58
3.5. Sensibilité aux phages RS1 et RS2.....	58
3.6. Mise en évidence des plasmides.....	63

	Page
3.7. Spectre d'hôte.....	63
3.8. Activité nitrogénase <u>in vitro</u> de différentes souches de <u>Rhizobium</u> en fonction de la tension d'oxygène.....	68
3.9. Evaluation de l'efficience de la symbiose entre différentes souches de <u>Rhizobium</u> et <u>S. rostrata</u> .....	68
4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	74
 CHAPITRE II EFFET DE L'AZOTE COMBINÉ SUR LA SYMBIOSE ENTRE <u>RHIZOBIUM</u> ET <u>SESBANIA ROSTRATA</u>  	
1. INTRODUCTION.....	79
2. MATERIEL ET METHODES.....	82
2.1. Germination des graines.....	82
2.2. Milieu de culture des plantes.....	82
2.3. Dispositifs de culture des plantes.....	83
2.3.1. Culture hydroponique.....	83
2.3.2. Culture en vase de végétation.....	85
2.3.3. Culture sur sol en cylindre.....	87
2.4. Inoculation de <u>S. rostrata</u> .....	89
2.4.1. Inoculation des tiges.....	89
2.4.2. Inoculation des racines.....	90
2.5. Etude structurale de nodules caulinaires développés en présence d'azote combiné (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ou KNO <sub>3</sub> .....	90
2.5.1. Microscopie photonique.....	90

	Page
2.5.2. Microscopie électronique à transmission.....	91.
3. RESULTATS.....	92
3.1. Effet de diverses sources d'azote combiné sur la fixation d'azote par <u>S.rostrata</u> en culture hydroponique.....	92
3.1.1. Effet de $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .....	92
- Estimation de la consommation d'azote par <u>S.rostrata</u> .....	92
- Effet de $\text{NH}_4\text{NO}_3$ sur la nodulation et l'activité réductrice d'acétylène.....	92
3.1.2. Effet de l'azote ammoniacal $\text{NH}_4\text{Cl}$ ou nitrique $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....	99
3.1.3. Effet de l'azote ammoniacal $\text{NH}_4\text{Cl}$ ou nitrique $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sur l'activité réductrice d'acétylène de nodules caulinaires et racinaires matures.....	104
3.2. Effet de $\text{NH}_4\text{NO}_3$ sur la fixation d'azote par <u>S.rostrata</u> cultivé en vase de végétation avec apport continu de milieu nutritif.....	110
3.3. Effet de l'urée sur la fixation d'azote par <u>S.rostrata</u> cultivé sur sol en cylindre.....	111
3.4. Observations microscopiques de coupes de nodules caulinaires développés en présence d'azote combiné $\text{NH}_4\text{Cl}$ ou $\text{KNO}_3$ .....	114
3.4.1. Observation au microscope photonique.....	114
3.4.2. Observation au microscope électronique.....	117

3.4.3. Activité réductrice d'acétylène.....	125
---	-----

4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	132
-----------------------------------	-----

CHAPITRE III. FIXATION D'AZOTE PAR SESBANIA ROSTRATA AU  
COURS DE CYCLES VEGETATIFS SUCCESSIFS  
INITIES A DIFFERENTES EPOQUES DE L'ANNEE

1. INTRODUCTION.....	141
2. MATERIEL ET METHODES.....	142
2.1. Dispositif expérimental.....	142
2.1. Inoculation des plantes.....	142
2.3. Activité réductrice d'acétylène.....	142
2.4. Dosage de l'azote total.....	142
3. RESULTATS.....	148
3.1. Variation de l'activité réductrice d'acéty- lène de nodules caulinaires et racinaires en fonction de l'âge des plantes et des nodules.....	148
3.2. Evolution des paramètres climatiques.....	150
3.2.1. Durée du jour.....	150
3.2.2. Température.....	153
3.3. Evolution des paramètres de croissance de <u>S. rostrata</u> .....	153
3.3.1. Hauteur.....	153
3.3.2. Poids sec des plantes et des nodules caulinaires.....	156

	Page
3.3.3. Azote total.....	156
3.4. Evolution de l'ARA caulinaire.....	156
4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	164
 CHAPITRE IV :EVALUATION DE L'AZOTE FIXE PAR <u>SESBANIA</u> <u>ROSTRATA</u>	
1. INTRODUCTION.....	169
2. MATERIEL ET METHODES.....	170
2.1. Méthodes d'évaluation de la fixation d'azote.....	170
2.1.1. Méthode par différence.....	170
2.1.2. Méthode de dilution isotopique N-15.....	171
2.1.3. Dispositif expérimental.....	171
2.2. Détermination des teneurs isotopiques en N-15 par spectrométrie optique.....	172
2.2.1. Principe.....	172
2.2.2. Méthodes de calcul.....	173
2.2.3. Calcul du pourcentage de l'azote fixé en fonction des teneurs isotopiques en N-15.....	174
2.2.4. Analyse des échantillons et préparation des tubes de décharge.....	176
3. RESULTATS.....	178
3.1. Effet de l'inoculation sur la hauteur, le poids sec, et le taux moyen d'azote total des plantes....	180
3.2. Estimation de l'azote fixé par différence.....	180
3.3. Teneur isotopique et pourcentage d'azote fixé.....	180
4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	185

CHAPITRE V : UTILISATION DE SESBANIA ROSTRATA COMME  
ENGRAIS VERT

1. INTRODUCTION.....	189
2. MATERIEL ET METHODES.....	190
2.1. Recherche de différents types d'inoculum.....	190
2.2. Utilisation de l'engrais vert <u>S. rostrata</u> pour la culture du riz en rizière de plateau.....	192
2.3. Utilisation de l'engrais vert <u>S. rostrata</u> pour la culture du sorgho en microparcelles.....	193
2.4. Utilisation de l'engrais vert <u>S. rostrata</u> pour la culture du sorgho en milieu paysan.....	194
2.4.1. Culture de <u>S. rostrata</u> .....	194
2.4.2. Technique d'enfouissement de l'engrais vert et culture du sorgho.....	195
2.5. Utilisation de l'engrais vert <u>S. rostrata</u> en culture irriguée du riz.....	198
3. <u>RESULTATS</u> .....	200
3.1. Efficience de différents types d'inoculum.....	200
3.2. Effet de l'engrais vert <u>S. rostrata</u> sur les rendements de différentes cultures.....	200
3.2.1. Rendements du riz cultivé en rizière de plateau.....	200
3.2.2. Rendements du sorgho cultivé en microparcelles.....	204
3.2.3. Rendements du sorgho en milieu paysan.....	204

3.2.4. Rendements de deux cultures consécutives de riz irrigué.....	211
DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	215
CONCLUSION GENERALE.....	217
BIBLIOGRAPHIE.....	225
ANNEXES.....	243
1. Caractéristiques des sols utilisés.....	243
2. Caractéristiques de la fumure organique.....	244

## LISTE DES FIGURES

	Page
INTRODUCTION GENERALE	
Figure 1-A: <u>Sesbania rostrata</u> à l'état naturel .....	38
Figure 1-B: Nodulation spontanée de <u>S. rostrata</u> .....	38
CHAPITRE I	
Figure 2 : Carte du Sénégal, les chiffres indiquent les lieux géographiques où les souches ont été isolées.....	46
Figure 3 : Sensibilité de la souche Bam1 aux phages RS1 et RS2.....	60
Figure 4 : Mise en évidence par électrophorèse en gel d'agarose (Technique de Meyers, 1976) de plasmides de petits poids moléculaire chez différentes souches isolées de <u>S. rostrata</u> .....	64 et 65
Figure 5	
Figure 6 : Inoculation de <u>S. rostrata</u> avec deux souches de Rhizobium, <u>Nem1</u> ; souche inefficace, <u>GN20</u> ; souche efficace.....	72
CHAPITRE II	
Figure 7 : Dispositif de culture hydroponique.....	84
Figure 8 : Dispositif de culture de plantes avec apport continu de milieu nutritif.....	86
Figure 9 : Dispositif de culture de <u>S. rostrata</u> sur sol.....	88
Figure 10 : Evolution de l'utilisation de l'azote durant 20 jours par <u>S. rostrata</u> cultivé en tube en présence de différentes concentrations d'azote combiné ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ).....	95
Figure 11 : Influence de l'azote combiné $\text{NH}_4\text{NO}_3$ sur l'activité réductrice d'acétylène (ARA) de nodules caulinaires et racinaires de <u>S. rostrata</u> en culture hydroponique.....	98

- Figure 12 : Influence de l'azote ammoniacal ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) sur l'activité réductrice d'acétylène (ARA) de nodules caulinaires et racinaires de S. rostrata en culture hydroponique..... 100
- Figure 13 : Influence de l'azote nitrique  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  sur l'activité réductrice d'acétylène (ARA) de nodules caulinaires et racinaires de S. rostrata en culture hydroponique..... 101
- Figure 14 : Influence de l'azote ammoniacal ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) sur l'ARA spécifique de nodules caulinaires et racinaires matures..... 108
- Figure 15 : Influence de l'azote nitrique  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  sur l'ARA spécifique de nodules caulinaires et racinaires matures..... 109
- Figure 16 : Influence de l'azote combiné  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  sur l'activité réductrice d'acétylène de nodules caulinaires et racinaires de S. rostrata cultivé en vase de végétation avec apport continu de milieu nutritif..... 112
- Figure 17 : Effet de l'azote combiné sur la nodulation caulinaire de S. rostrata cultivé en vase de végétation en présence de différentes concentrations d'azote combiné..... 113
- Figure 18 : Coupes de nodules caulinaires de S. rostrata développés en absence d'azote combiné. A - B, MPH (Microscopie photonique). C, MET (Microscopie électronique à transmission..... 118
- Figure 19 : MPH. coupes de nodules caulinaires de S. rostrata développés en présence diverses concentrations d'azote combiné apporté sous forme nitrique ( $\text{KNO}_3$ )..... 120
- Figure 20 : MPH. Coupes de nodules caulinaires de S. rostrata développés en présence de diverses concentrations d'azote combiné apporté sous forme ammoniacale ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )..... 122
- Figure 21 : A et B MET. Ultrastructure d'un nodule caulinaire développé en présence de 6mM-N..... 126
- Figure 22 : A et B MET. Ultrastructure d'un nodule caulinaire développé en présence de 12mM-N..... 128

## CHAPITRE III

Figure 23 : A - Cinétique de l'activité réductrice d'acétylène de nodules caulinaires et racinaires de <u>S. rostrata</u> .....	149
Figure 23 : B - Evolution de l'activité réductrice d'acétylène de nodules caulinaires exprimée en (%) de l'activité total.....	149
Figure 24 : Evolution de la durée du jour et variation des températures minimales et maximales au cours de l'année.....	151
Figure 25 : Influence de la photopériode sur la floraison de <u>S. rostrata</u> au cours de cycles végétatifs successifs initiés à différentes époques de l'année.....	152
Figure 26 : Evolution de la hauteur de <u>S. rostrata</u> au cours de semis initiés à différentes époques de l'année.....	154
Figure 27 : Evolution de l'azote total de <u>S. rostrata</u> au cours de semis initiés à différentes époques de l'année.....	157
Figure 28 : Evolution de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) de nodules caulinaires de <u>S. rostrata</u> au cours de semis initiés à différentes époques de l'année.....	158

## CHAPITRE V

Figure 29 : Préparation sur le terrain d'un inoculum de <u>Rhizobium</u> à partir de nodules caulinaires frais.....	191
Figure 30 : <u>Kayendo</u> d'après Pelessier, 1966 outil utilisé pour le travail du sol en Casamance (Sud du Sénégal).....	196
Figure 31 : A et B Enfouissement de l'engrais vert <u>S. rostrata</u> en billon à l'aide du <u>Kayendo</u> en milieu paysan.....	197
Figure 32 : Effet de l'engrais vert <u>S. rostrata</u> sur les rendements du riz en rizière de plateau (Affiniam Casamance).....	202

Figure 33 : Effet de l'engrais vert <u>S. rostrata</u> sur les rendements du sorgho cultivé en microparcelles Station (ORSTOM Bel-Air).....	205
Figure 34 : A et B. Effet de l'engrais vert sur la culture du sorgho.....	206
Figure 35 : Niveau des précipitations à Balandine durant la croissance de <u>S. rostrata</u> .....	208
Figure 36 : Effet de l'engrais vert <u>S. rostrata</u> sur les rendements du sorgho en milieu paysan (Balandine Casamance).....	209
Figure 37 : Effet de l'engrais vert sur les rendements du riz irrigué cultivé en microparcelles (Station ORSTOM Bel-Air)	
- Comparaison des rendements sur sol argileux (Tilène) et sableux (Bel-Air).....	212
- Effet sur deux cultures successives de riz.....	212
Figure 38 : Effet de l'engrais vert <u>S. rostrata</u> sur les rendement du riz irrigué cultivé en microparcelles.....	215

## LISTE DES TABLEAUX

	Page
CHAPITRE I	
Tableau 1 : Utilisation des substrats carbonés par différentes souches de <u>Rhizobium</u> isolées de <u>S. rostrata</u> .....	57
Tableau 2 : Résistance naturelle aux antibiotiques de souches de <u>Rhizobium</u> isolées de <u>S. rostrata</u> .....	59
Tableau 3 : Réaction de l'antisérum anti-ORS571 avec les antigènes de surface de différentes souches de <u>Rhizobium</u> isolées de <u>S. rostrata</u> .....	61
Tableau 4 : Sensibilité aux phages RS1 et RS2 de différentes souches de <u>Rhizobium</u> isolées de <u>S. rostrata</u> .....	62
Tableau 5 : Contenu plasmidique de souches de <u>Rhizobium</u> isolées de <u>S. rostrata</u> .....	66
Tableau 6 : Spécificité d'hôte et effectivité de souches de <u>Rhizobium</u> isolées de <u>S. rostrata</u> .....	67
Tableau 7 : Activité nitrogénase de souches de <u>Rhizobium</u> en présence de différentes tensions d'oxygène.....	69
Tableau 8 : Comparaison de l'efficacité de la symbiose entre <u>S. rostrata</u> et différentes souches de <u>Rhizobium</u> isolées de <u>S. rostrata</u> .....	70
Tableau 9 : Récapitulatif des caractères phénotypiques des souches de <u>Rhizobium</u> étudiées.....	73
Chapitre II	
Tableau 10: Estimation de la consommation d'azote par <u>S. rostrata</u> pendant 20 jours à compter du jour de l'inoculation.....	93
Tableau 11: Evolution de l'utilisation de l'azote durant 20 jours chez <u>S. rostrata</u> cultivée en tubes en présence de différentes concentrations d'azote combiné ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ).....	94
Tableau 12: Influence de l'azote combiné $\text{NH}_4\text{NO}_3$ sur la nodulation et l'activité réductrice d'acétylène de <u>S. rostrata</u> en culture hydroponique.....	97

Tableau 13: Influence de l'azote ammoniacal ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) sur la nodulation et l'activité réductrice d'acétylène de <u>S. rostrata</u> en culture hydroponique.....	102
Tableau 14: Influence de l'azote nitrique ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) sur la nodulation et l'activité réductrice d'acétylène de <u>S. rostrata</u> en culture hydroponique.....	103
Tableau 15: Effet de l'azote combiné ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) sur l'activité réductrice d'acétylène spécifique de nodules caulinaires et racinaires matures de <u>S. rostrata</u> ....	106
Tableau 16: Effet de l'azote combiné ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) sur l'activité réductrice d'acétylène spécifique de nodules caulinaires et racinaires matures de <u>S. rostrata</u> .....	107
Tableau 17: Influence de l'azote combiné ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) sur la nodulation et l'activité réductrice d'acétylène de <u>S. rostrata</u> cultivé en vase de végétation avec apport continu de milieu nutritif.....	111
Tableau 18: Effet de l'azote combiné sur la nodulation et l'activité réductrice d'acétylène de <u>S. rostrata</u> cultivé sur sol avec apport d'urée au moment du semis.....	115
Tableau 19: Effet de l'azote combiné sur la nodulation et l'activité réductrice d'acétylène de <u>S. rostrata</u> cultivé sur sol avec apport d'urée au moment de l'inoculation.....	116
Tableau 20: Activité réductrice d'acétylène des nodules caulinaires de <u>S. rostrata</u> développés en présence d'azote combiné ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou $\text{KNO}_3$ ).....	130
Tableau 21: Taux d'inhibition de l'activité réductrice d'acétylène de nodules caulinaires et racinaires de <u>S. rostrata</u> développés en présence de divers sources d'azote combiné.....	131
Chapitre III	
Tableau 22: Evolution de la hauteur de <u>S. rostrata</u> au cours de cycles végétatifs successifs initiés à différentes époques de l'année.....	155
Tableau 23: Evolution du poids sec de <u>S. rostrata</u> au cours de cycles végétatifs successifs initiés à différentes époques de l'année.....	159

Tableau 24: Evolution du poids sec des nodules caulinaires de S. rostrata au cours de cycles végétatifs successifs initiés à différentes époques de l'année..... 160

Tableau 25: Evolution de l'azote total de S. rostrata au cours de cycles végétatifs successifs initiés à différentes époques de l'année..... 161

Tableau 26: Evolution de l'activité réductrice d'acétylène de nodules caulinaires de S. rostrata au cours de cycles végétatifs initiés à différentes époques de l'année..... 162

#### Chapitre IV

Tableau 27: Effet de l'inoculation sur le développement et la teneur en azote total de S. rostrata..... 181

Tableau 28: Estimation de la fixation d'azote par S. rostrata. Méthode par différence et méthode de dilution isotopique N-15..... 184

#### Chapitre V

Tableau 29: Effet de divers types d'inoculum sur la nodulation et l'ARA caulinaires de S. rostrata..... 201

Tableau 30: Effet de l'engrais vert sur les rendements du riz cultivé en rizière de plateau (Affiniam- Casamance)..... 203

Tableau 31: Effet de l'engrais vert sur les rendements du sorgho cultivé en microparcelles (station ORSTOM Bel-Air)..... 207

Tableau 32: Effet de l'engrais vert sur les rendements du sorgho cultivé en milieu paysan (Balandine Casamance)..... 210

Tableau 33: Effet de l'engrais vert sur la productivité du riz irrigué. (Deux cultures successives de riz sur sol de Tilène en microparcelles de 1 m.<sup>2</sup> Station ORSTOM Bel-Air)..... 213



INTRODUCTION GENERALE



## INTRODUCTION GENERALE

Après l'eau, l'azote est le principal facteur limitant la production agricole. Du fait de leur coût élevé, les engrais chimiques sont peu utilisés dans les pays en développement. L'utilisation des systèmes fixateurs d'azote peut contribuer à améliorer la fertilité des sols tout en limitant l'importation et l'utilisation des engrais chimiques.

En Asie du Sud Est et en Inde, les engrais verts sont traditionnellement utilisés pour la culture du riz, qu'il s'agisse d'*Azolla* ou de légumineuses (Dao et Thuyet, 1979 ; Watanabe, 1982 ; Pandey et Morris, 1983). *Sesbania rostrata* présente un grand intérêt agronomique du fait de ses potentialités fixatrices d'azote élevées (Rinaudo et al., 1983 ; Roger et Watanabe, 1986). Il s'agit d'une légumineuse annuelle poussant dans les sols hydromorphes du Nord du Sénégal (Berhaut, 1976). *S. rostrata* possède la particularité de porter des nodules fixateurs d'azote à la fois sur les racines et sur les tiges (Dreyfus et Dommergues, 1981).

Chez *S. rostrata* la nodulation caulinaire et la nodulation racinaire semblent faire intervenir deux modes d'infection différents. Le processus d'infection racinaire par l'intermédiaire de poils absorbants décrits par Olsson et Rolfe (1985) est comparable à celui de *Glycine max* (Bauer 1981 ; Turgeon et Bauer 1981). L'attachement du *Rhizobium* à l'extrémité du poil absorbant est

suivi d'une courbure de celui-ci par invagination de la paroi végétale et la formation d'un cordon d'infection contenant des Rhizobium. Après ramification des cordons d'infection dans les cellules méristématiques, les Rhizobium sont libérés dans le cytoplasme des cellules.

La nodulation caulinaire intervient au niveau de sites de nodulation prédéterminés sur les tiges, appelés mamelons caulinaires (Duhoux et Dreyfus, 1982). Le mamelon caulinaire est constitué d'un dôme épidermique percé en son centre par une ébauche racinaire. Les sites de nodulation sont régulièrement disposés tous les 3 à 5 mm le long de la tige adulte suivant 4 ou 5 génératrices parallèles à l'axe de la tige. Le processus d'infection comprend quatre phases distinctes (Duhoux, 1984) : (1) les bactéries pénètrent dans les cellules corticales dégénérantes mortes situées à la base de l'ébauche racinaire, (2) elles se multiplient activement dans des poches intercellulaires qui induisent la formation du méristème nodulaire sous jacent. (3) à partir des poches intercellulaires il y a émission de cordons d'infection sous forme de digitations intercellulaires puis intracellulaires. (4) les Rhizobium sont alors libérés dans le cytoplasme de la cellule par endocytose et entourés d'une membrane de séquestration de nature polysaccharidique dérivée du cordon d'infection, (Tsien et al., 1983 ; Duhoux, 1984). Ce mode d'infection caulinaire qualifié de " Crack entry " par Olsson et Rolfe (1985) ne fait pas intervenir de poils absorbants pour la formation des cordons d'infection comme au niveau des racines, mais se fait à partir d'une multiplication intercellulaire du

Rhizobium. A maturité les nodules caulinaires ont une forme ovoïde et une couleur vert foncé. Ils atteignent 3 à 4 mm de diamètre en moyenne, le parenchyme cortical est chloropyllien. Le qualificatif caulinaire des nodules de S. rostrata ne fait allusion qu'à leur position sur la tige. En fait leur origine est anatomiquement racinaire puisqu'ils se développent à partir du cortex d'une ébauche racinaire (Duhoux, 1984).

Plusieurs protéines sont spécifiquement synthétisées au cours du développement des nodules : elles sont appelées "nodulines" (Van Kammen, 1984). Parmi celles-ci, la légghémoglobine, hémoprotéine spécifique des nodules de légumineuses (Appleby, 1974), constitue 20 à 30% des protéines cellulaires du nodule (Verma et Bal, 1976). Sa partie protéique est codée par le génome de la plante hôte (Dilworth, 1969 ; Cutting et Schulman, 1971 ; Marker, 1982). L'hème du pigment est synthétisé par le Rhizobium (Avisar et Nadler, 1978). La légghémoglobine qui présente une grande affinité pour l'oxygène, assure le transport d'un flux important d'oxygène à faible pression partielle vers les bactéroïdes, conditions nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase (Bergersen, 1978).

Les légghémoglobines de nodules caulinaires et racinaires de S. rostrata ont été purifiées et caractérisées. Ainsi, Bogusz et al. (1987) ont pu mettre en évidence 7 composés de points isoélectriques différents, présents en proportion différentes dans les deux types de nodules. D'autres nodulines dont l'expression est différente dans les nodules caulinaires et racinaires ont été

mises en évidence chez S. rostrata (De Lajudie et Huguet, 1987).

Chez Sesbania rostrata, on distingue deux types de souches de Rhizobium selon qu'elles sont capables de noduler à la fois les tiges et les racines (souches de type ORS571) ou qu'elles ne peuvent noduler que les racines (souches de type ORS51).

La souche ORS571 est une souche à croissance rapide dont le temps de génération est de 3h sur milieu lactate-glutamate extrait de levure. Le glucose semble être le seul sucre utilisé par cette souche qui n'assimile pas le mannitol (Dreyfus, 1982).

En général, les Rhizobium ne fixent l'azote qu'en symbiose avec les légumineuses. Cependant, certaines souches à croissance lente appartenant au genre Bradyrhizobium sont capables d'exprimer une activité nitrogénase in vitro. Pour cela une source d'azote combiné et une tension d'oxygène appropriées sont nécessaires (Keister, 1975 ; Mc Comb et al., 1975 ; Pagan et al., 1975).

En milieu de culture minimal dépourvu d'azote combiné, et sous une atmosphère d'azote et d'oxygène bien définie, la souche ORS571 fixe l'azote atmosphérique. De plus, elle est capable d'assimiler, pour sa croissance, l'azote fixé (Dreyfus et al., 1983 ; Donald et Ludwig, 1984 ; Gebhardt et al., 1983), alors que les Bradyrhizobium fixant l'azote en culture se comportent comme les bactéroïdes qui excretent l'azote fixé dans le milieu de culture (Ludwig, 1978 ; Shanmugan et al., 1978).

Dans une étude récente, Ludwig (1986) a précisé que le 6-OH nicotinate, dérivé de l'acide nicotinique présent dans le milieu

minimal, agissait comme "piège intracellulaire" d'oxygène et était indispensable à l'expression in vitro de l'activité nitrogénase de Rhizobium ORS571.

La nitrogénase est l'enzyme qui catalyse la réduction de  $N_2$  en  $NH_3$ . Elle a été purifiée à partir de plusieurs organismes fixateurs libres ou symbiotiques. Dans tous les cas, on a observé une grande unité de structure (Eady et al., 1972 ; Israel et al., 1974).

La nitrogénase de Rhizobium ORS571 a été purifiée à partir de culture bactérienne en condition de fixation libre par Kush et al. (1985). Comme toutes les nitrogénases, elle est formée de deux composants :

- La protéine I ou Molybdoferrédoxine est une molécule tétramérique de poids moléculaire égal à 21000, associée à un cofacteur à fer et à molybdène.

- La protéine II ou Azoferrédoxine est un dimère de poids moléculaire égal à 74000 contenant du fer, du soufre non hématinique et du soufre labile.

La majorité des Rhizobium, ainsi que la souche ORS571 assimilent l'ammonium par la voie glutamine-synthétase (GS) glutamate-synthase (GOGAT). Deux autres glutamine-synthétases (GSI et GSII) sont généralement observées chez les Rhizobium en

culture in vitro (Darrow et Knotts, 1977). Une seule d'entre elles (GSI) est présente chez la souche ORS571 qui présente également une auxotrophie pour NAD<sup>+</sup> (nicotinamide adénine dinucléotide) (Ludwig, 1986).

Les bactéries capables d'induire des nodules fixateurs d'azote chez les légumineuses ont été subdivisées en deux groupes sur la base d'études systématiques fondées sur la taxonomie numérique (t'Mannetje, 1967), l'hybridation d'ADN (Gibbins et Gregory, 1972) et d'autres critères comme en particulier leur temps de génération sur milieu mannitol - extrait de levures (Jordan, 1982 ; Jarvis et al., 1982). Le genre Rhizobium regroupe les espèces à croissance rapide, le genre Bradyrhizobium regroupe les espèces à croissance lente.

Chez les Rhizobium à croissance rapide les gènes de la fixation d'azote ("nod", "nif", "fix") sont portés par des plasmides symbiotiques (pSym) de haut poids moléculaire. (Beringer et al., 1980 ; Kondorosi et al., 1984 ; Buickema et al., 1985) ; tandis que chez la souche ORS571, les gènes de la fixation d'azote sont chromosomiques (Donald et al., 1986), comme chez les souches à croissance lente. La capacité de la souche ORS571 à se comporter comme fixateur libre a permis d'isoler et de tester des mutants nif directement sur boîte de Pétri sans avoir recours à la plante hôte, facilitant ainsi les études génétiques (Elmerich et al., 1982).

Des techniques de mutagénèse ont permis de localiser deux régions dans les gènes nif de ORS571. La première présente une grande homologie avec les gènes nif HDKE de Klebsiella pneumoniae la seconde présente une homologie avec les gènes nif A de K. pneumoniae et Rhizobium meliloti (Donald et al., 1986).

Des régions portant des gènes nod ont été caractérisées: l'une d'elles présente une homologie de séquence avec les gènes nod communs à différents Rhizobium tempérés (Holsters et al., 1987).

Des expériences d'hybridations moléculaires et de stabilité thermique de séquences codant pour l'ARN ribosomal ont permis d'établir des relations phylogéniques entre les deux types de souches nodulant S. rostrata, avec certaines bactéries photosynthétiques, certains Rhizobium à croissance rapide et Agrobacterium. Il apparaît que l'ARN ribosomal de la souche ORS571 présente une grande homologie avec l'ARN ribosomal de Rhodospseudomonas palustris; l'ARN de la souche ORS51 (souche spécifique de racine) présente une homologie de séquence avec Agrobacterium et Rhizobium meliloti (Jarvis et al., 1986).

L'ensemble de ces résultats et ceux obtenu par taxonomie numérique (Dreyfus, 1982) ont conduit Dreyfus et al., 1987 à proposer que la souche ORS571 nodulant la tige et les racines de S. rostrata soit placée dans un nouveau genre appelé Azorhizobium caulinodans.

Chez la majorité des légumineuses, l'azote combiné exerce une action inhibitrice sur la nodulation et la fixation d'azote (Thornton, 1936 ; Munns, 1968 ; Lie, 1974 ; Rigaud, 1981). Dreyfus et Dommergues (1980) ont observé qu'en présence de nitrate d'ammonium apporté à la concentration de 3,0 mM, la nodulation caulinaire de S. rostrata en culture hydroponique (cultivé en tube) n'était pas inhibée et qu'il pouvait même y avoir stimulation de l'activité réductrice d'acétylène des nodules caulinaires.

Des expériences préliminaires effectuées par Rinaudo et al. (1983) ont montré, qu'utilisé comme engrais vert, S. rostrata pouvait doubler les rendements en grains du riz par rapport au témoin sans azote tout en améliorant la teneur en azote des pailles et des grains. La quantité d'azote fixée avait alors été estimée par la méthode de bilan, à environ 27 gN/m<sup>2</sup> ce qui équivaut à environ 270 kg N/ha par extrapolation.

-----00-----

Le travail que nous présentons ici est une contribution à l'étude de la fixation d'azote chez S. rostrata.

Nous avons en premier lieu (Chapitre 1) caractérisé différentes souches de Rhizobium isolées de S. rostrata en étudiant tout d'abord la morphologie des Rhizobium et des colonies, puis l'aptitude des souches à utiliser diverses sources de carbone, la

résistance naturelle aux antibiotiques, la parenté antigénique, la sensibilité aux phages, le contenu plasmidique, le spectre d'hôte, l'activité nitrogénase en condition de dérégulation, et enfin l'efficacité de la symbiose entre les différentes souches et S. rostrata.

La seconde partie de ce travail a porté sur l'étude de l'effet de l'azote combiné sur la symbiose entre Rhizobium et S. rostrata. Cette étude a nécessité la mise au point et l'utilisation de différents systèmes de culture de plantes. Les observations effectuées ont pu être complétées par une étude structurale et ultrastructurale de nodules caulinaires développés en présence d'azote combiné.

Afin de préciser les conditions optimales de la fixation d'azote par S. rostrata, nous avons étudié (Chapitre 3) l'effet de certains facteurs climatiques sur les différents paramètres de la symbiose au cours de cycles végétatifs successifs initiés à différentes époques de l'année.

La quantité d'azote fixée par S. rostrata a été estimée par la méthode de marquage isotopique N-15 (Chapitre 4).

Enfin la dernière partie de ce travail (Chapitre 5) a porté sur l'utilisation de l'engrais vert S. rostrata en culture irriguée (riz) ou exondée (riz et sorgho). Des essais ont été mis en place en station (ORSTOM Bel-Air, Dakar), et en milieu paysan (Casamance Sud du Sénégal).



Fig. 1



A : Sesbania rostrata  
à l'état naturel

B : nodulation spontanée de  
Sesbania rostrata

CHAPITRE I

CARACTERISATION DE DIFFERENTES SOUCHES DE *RHIZOBIUM*

ISOLEES DE *SESBANIA ROSTRATA*



## 1. INTRODUCTION

Les bactéries qui forment des nodules et fixent l'azote en symbiose avec les légumineuses étaient classées en deux groupes : les Rhizobium à croissance rapide et les Rhizobium à croissance lente (Buchanan et Gibbons, 1974).

Cette subdivision était le résultat d'études de taxonomie numérique (Graham 1964 ; t'Mannetje, 1967 ; Moffet et Colwell 1968). Elle est basée sur le spectre d'hôte, la morphologie des souches et des colonies de Rhizobium, le type de flagelle, l'utilisation et le métabolisme des substrats carbonés (Martinez-De Drets et Arias, 1972 ; Skotnicki et Rolfe, 1978), le temps de génération sur milieu mannitol- extrait de levure, la capacité à acidifier ou alcaliniser le milieu de culture (Allen et Allen, 1950; Jordan et Allen 1974) et les propriétés antigéniques (Vincent, 1977).

Des études moléculaires portant sur la composition en guanine et cytosine (GC%) de l'ADN (De ley et Rassel, 1965), l'hybridation d'ADN (Heberlein et al., 1967 ; Gibbins et Gregory, 1972) et l'analyse de l'ARN ribosomal ont confirmé la subdivision des Rhizobium à croissance rapide et à croissance lente.

Jordan (1982) a proposé que les Rhizobium à croissance lente, Rhizobium japonicum, et les Rhizobium du groupe cowpea soient placés dans un nouveau genre appelé Bradyrhizobium.

Ainsi, la classification actuelle des bactéries qui forment des nodules fixateurs d'azote sur les racines des légumineuses comporte deux genres : le genre Rhizobium et le genre Bradyrhizobium.

- Le genre Rhizobium regroupe les souches à croissance rapide. Il comprend les espèces suivantes : R. léguminosarum (comportant trois biovars : R. trifolii ; R. phaseoli ; et R. viceae) ; R. meliloti et R. loti. ainsi que R. fredii une espèce récemment définie qui nodule le soja (Keyser et al., 1982)

- Le genre Bradyrhizobium, espèce japonicum regroupe les souches à croissance lente (Jordan, 1982).

Les résultats des études physiologiques, biochimiques et génétiques montrent que la souche ORS571, qui a un taux de croissance comparable à celui des Rhizobium, présente des caractéristiques propres aux Bradyrhizobium, notamment en ce qui concerne l'utilisation des substrats carbonés (Dreyfus, 1982) ; elle présente également la particularité de croître aux dépens de l'azote moléculaire (Dreyfus et al., 1983 ; Gebhardt et Bergeresen, 1983 ; Donald et Ludwig, 1984). L'étude de l'homologie de séquence codant pour l'ARN ribosomal, par dénaturation thermique de l'ADN, a mis en évidence des relations phylogéniques entre la souche ORS571 et une bactérie photosynthétique Rhodospseudomonas palustris (Jarvis et al., 1986). Tous ces résultats ont conduit Dreyfus et al. (1987) à proposer que la souche ORS571 nodulant les tiges et les racines de S. rostrata soit placée dans un genre nouveau appelé Azorhizobium caulinodans.

Dans ce chapitre nous présentons une comparaison des souches bactériennes isolées de tiges de S. rostrata provenant de différentes régions du Sénégal à la souche ORS571, par l'étude de la morphologie des souches et des colonies ; l'aptitude des souches

à utiliser divers substrats carbonés ; la résistance naturelle aux antibiotiques ; la parenté antigénique ; la sensibilité aux phages ; le contenu plasmidique ; l'expression de l'activité nitrogénase in vitro ; le spectre d'hôte et enfin l'efficiéne de la symbiose des différentes souches avec S. rostrata.



## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Souches bactériennes

#### 2.1.1. Isolement des souches de Rhizobium

Deux techniques ont été utilisées pour isoler les Rhizobium à partir de nodules.

- La première consiste à stériliser le nodule par immersion dans l'éthanol à 90%, suivi d'un trempage pendant 5 minutes dans une solution à 0,1% de HgCl<sub>2</sub>. Le nodule est rincé abondamment avec l'eau distillée stérile, puis broyé dans environ 3ml d'eau physiologique à l'aide d'une baguette de verre. Une goutte de la suspension diluée est déposée en boîte de Pétri puis étalée à la surface du milieu de croissance YLA (voir paragraphe 2.2.1).

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

Les boîtes sont incubées à 30° C. Après plusieurs purifications successives, les souches sont testées pour leur aptitude à former des nodules sur la plante hôte.

#### 2.1.2. Origine géographique des souches

Les souches ainsi isolées proviennent de différentes régions du Sénégal (fig.2).

Les souches GN11, GN15, GN17 et GN20 ont été isolées à partir de nodules caulinaires récoltés à Ngnith.

Les origines des autres souches sont les suivantes : Nem 1 : Nema ; Zig 1 : Ziguinchor ; F9, Fumela ; Bam 1 et Bam 2,

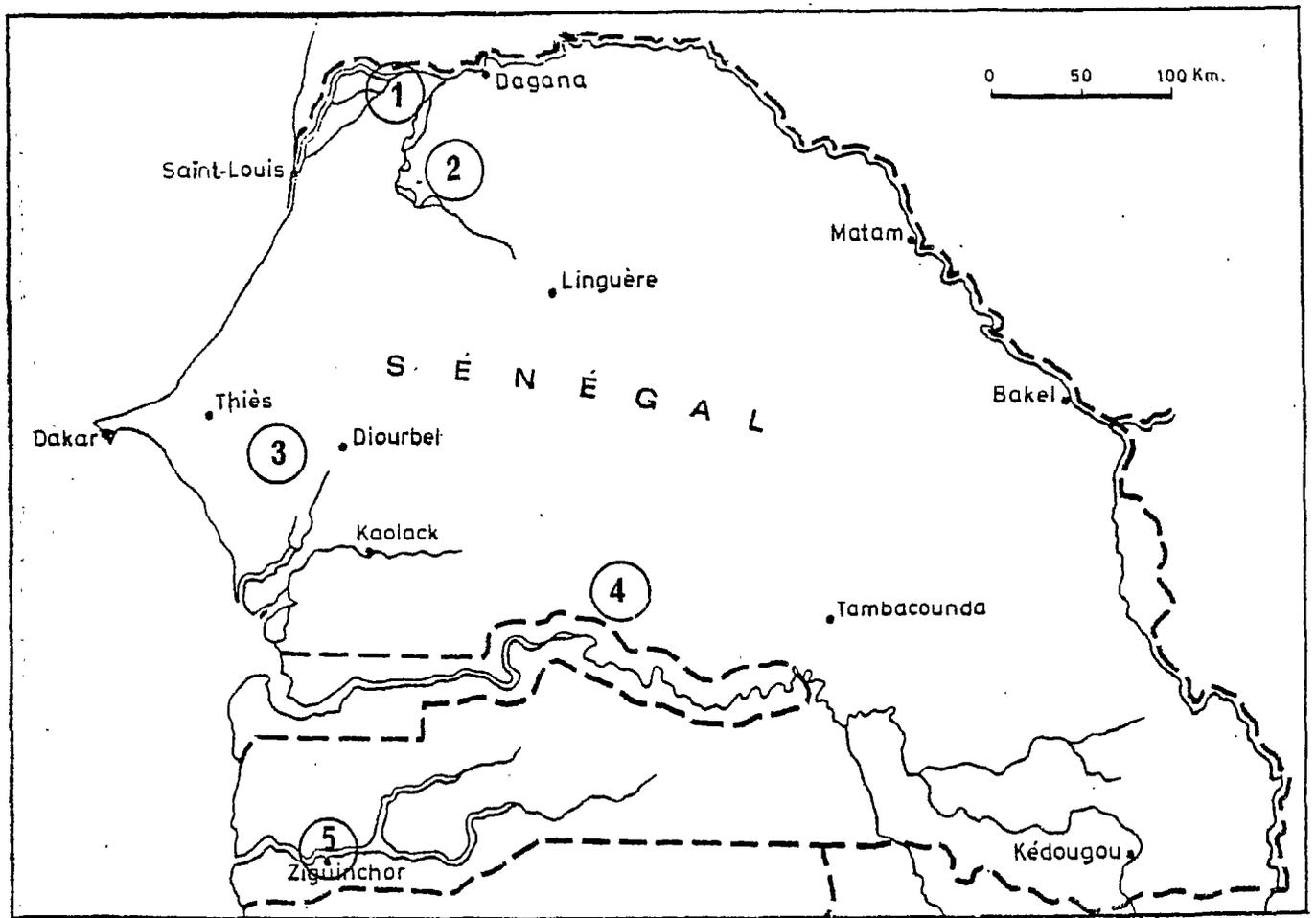


Fig. 2 Carte du Sénégal. Les chiffres indiquent les lieux géographiques où les différentes souches ont été isolées.

- 1 : Richard Toll (ORS 571)
- 2 : Lac de Guiers (GN11 ; GN 15 ; GN 17, GN 20)
- 3 : Bambey (Bam 1 ; Bam 2)
- 4 : Nema (Nem 1 ; F9, Fumela)
- 5 : Ziguinchor (Zig 1)

Bambey ; ORS571 : Richard Toll (Dreyfus, 1982).

## 2.2. Milieux de culture pour Rhizobium

Les milieux de culture utilisés dérivent d'un milieu de base (L) contenant la même base minérale que le milieu YM décrit par Vincent (1970), dans lequel le mannitol est remplacé par le lactate. Sa composition est la suivante ( par litre) : D.L Sodium lactate, 10 g ;  $K_2HPO_4$ , 0,5g ;  $MgSO_4 (7H_2O)$ , 0,2g ; NaCl, 0,1g ;  $FeCl_3$ , 4mg ;  $Na MoO_4 (H_2 O)$ , 5mg ;  $MnSO_4 (4H_2O)$ , 2,5mg ;  $ZnSO_4 (7H_2O)$ , 0,7mg ;  $CoSO_4 (7H_2O)$  0,14mg ;  $CuSO_4, (5H_2O)$ , 0,12mg ;  $H_3BO_3$ , 0,03 mg ; pH 6,8.

### 2.2.1. Milieu complet YL

Le milieu YL correspond au milieu L supplémenté par 1g/l de glutamate de sodium et 1g/l d'extrait de levure (Difco). Le milieu gélosé YLA contient 15g/l d'Agar Difco.

### 2.2.2. Milieu sans azote L0

Ce milieu utilisé pour l'étude de l'activité de la nitrogénase en condition de dérepression, correspond au milieu L. supplémenté de 3 vitamines : biotine, 2 mg/l ; acide pantothénique, 4mg/l ; acide nicotinique, 20 mg/l

## 2.3. Etude morphologique

L'étude morphologique des Rhizobium est faite à l'aide d'un microscope Zeiss.

Une culture de 24 heures sur milieu YL (environ 10<sup>8</sup> bactéries par ml) est diluée 10 fois en milieu YL ; 0,1 ml de cette suspension est étalée sur milieu gélosé YLA en boîte de Pétri, puis incubé 48h à 30°C.

Les colonies sont observées au photomicroscope Wild M 400.

#### 2.4. Tests nutritionnels

L'étude de l'assimilation des différents substrats carbonés a été réalisée avec la base minérale du milieu YL décrit ci-dessus additionné de 15 g/l d'Agar noble. Les différents substrats carbonés sont utilisés à raison de 2 g/l. La liste des substrats utilisés est indiquée dans le tableau 1.

Les bactéries cultivées sur milieu YL liquide sont centrifugées, lavées deux fois avec du sérum physiologique stérile (0.85% NaCl) puis étalées sur le milieu gélosé contenant le substrat à tester.

#### 2.5. Résistance naturelle aux antibiotiques

Après filtration sur filtre millipore (0.45  $\mu$ m), les solutions d'antibiotiques sont ajoutées au milieu YLA maintenu à 45°C. Les milieux sont alors coulés en boîtes de Pétri. Les boîtes de Pétri sont inoculées par étalement de 0,2 ml d'une culture de 24 heures puis incubées à 30°C.

#### 2.6. Etude des parentés antigéniques entre Rhizobium ORS571 et différentes souches de Rhizobium isolées de Sesbania rostrata

Nous avons utilisé la méthode de fluorescence indirecte pour la caractérisation des souches de Rhizobium.

##### 2.6.1. Préparation de l'antigène

Une culture de 48 heures de la souche de Rhizobium ORS571 est centrifugée à 5000 rpm puis lavée trois fois au sérum

physiologique stérile . Le culot bactérien est repris dans du sérum physiologique de manière à obtenir une suspension d'environ  $10^8$  bactéries/ml. La suspension ainsi obtenue est maintenue 1 heure à  $100^{\circ}\text{C}$  dans un bain marie pour éliminer les antigènes flagellaires, puis conservée à  $4^{\circ}\text{C}$  en présence de merthiolate de sodium 0,1%.

#### 2.6.2. Préparation de l'antisérum

L'antisérum est obtenu par injections répétées d'antigène à un lapin adulte selon le protocole préconisé par Schmidt et al. (1968).

Trois injections intraveineuses de l'antigène sont effectuées les trois premiers jours (0,5 ml ; 1,0 ml ; 1,5 ml). Après 3 jours de repos trois autres injections intraveineuses sont effectuées (1,5 ml ; 2,0 ml, 2,0 ml). Au 16ème jour du sang est prélevé pour titrer l'anticorps. La titration est effectuée par agglutination indirecte en utilisant les anti-immunoglobulines de lapin marquées à l'isothiocyanate de fluorescéine (F.I.T.C.) (Biomérieux). Le titre étant supérieur à 1/1280, les lapins sont laissés à jeun jusqu'au 18ème jour pour une récolte partielle ou totale du sang.

#### 2.6.3. Méthode d'immunofluorescence indirecte

Une goutte d'une culture de Rhizobium est déposée sur une lame de verre. Après séchage sous courant d'air chaud, les bactéries sont fixées par passage de la lame au dessus du cône de la flamme d'un bec Bunzen, la face du dépôt vers le haut. Le frottis bactérien est traité successivement par l'application

d'une goutte de l'antisérum (anti ORS571) puis par une goutte d'anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de lapin marquées au F.I.T.C.(Biomérieux). Après montage dans la glycérine tamponée, les préparations sont observées avec un microscope à fluorescence (modèle Zeiss équipé d'une lampe à vapeur de mercure HBO 50W, d'un filtre d'excitation X P 490, d'un réflecteur FI 510 et d'un filtre d'arrêt FP 520).

## 2.7.Sensibilité des souches de Rhizobium aux phages RS1 et RS2

### 2.7.1.Obtention d'un lysat RS1 et RS2

Les phages RS1 et RS2 obtenus de D.Bogusz ont été isolés à partir de nodules caulinaires secs de S. rostrata. IL sont spécifiques de la souche ORS571 et respectivement lytique et tempéré (De Lajudie et Bogusz, 1984).

Une culture en milieu YL de la souche ORS571 contenant <sup>8</sup>10<sup>8</sup> bactéries par ml est infectée par une suspension de phages (RS1 ou RS2), à une multiplicité de 10<sup>8</sup> phages par cellule. La culture est agitée 16h à 30°C jusqu'à lyse totale. Les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation de 10 minutes à 8000 rpm , température 4°C. Le surnageant contenant les particules phagiques est filtré sur millipore 0,45 µm.

### 2.7.2.Titration des phages RS1 et RS2

Une suspension de phages (RS1 ou RS2) est introduite dans un milieu YL faiblement gélosé (5g/l d'Agar), maintenu en fusion à 40°C. On y ajoute 0,1 ml d'une suspension de la souche indicatrice ORS571 ; après homogénéisation, le mélange ainsi

obtenu est étalé sur milieu gélosé YLA, en boîte de Pétri. Après 16 h d'incubation à 37° C, les plages de lyse sont comptées.

### 2.7.3. Sensibilité aux phages RS1 et RS2

Dans 3 ml de milieu YL faiblement gélosé (5g/l d'Agar) maintenu en fusion à 40° C, on introduit 0.2ml d'une culture de Rhizobium. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un agitateur vibrant puis étalé sur milieu YLA en boîte de Pétri.

Une goutte d'un lysat concentré de RS1 ou de RS2 est déposée sur la surcouche. Après 16 h d'incubation à 37° C les plages de lyse sont recherchées.

## 2.8. Mise en évidence des plasmides

### 2.8.1. Technique de Meyers et al. (1976), modifiée par Franche et Reynaud (1985)

100 ml d'une culture de 24 heures en milieu YL sont centrifugés 10 minutes à 8000 rpm à 4° C. Le culot bactérien est repris dans 1,5 ml de tampon Tris-HCl 50 mM pH8, EDTA 1mM, saccharose 25%. La lyse est obtenue après addition: de 10 mg/ml de lysozyme (1h à 37° C); 0.1M de EDTA pH 8 (15 minutes à 37° C); de S.D.S 2,5% (20 minutes à 4° C). La concentration en NaCl de la solution obtenue est ajustée à 1M final et le lysat est laissé la nuit à 4° C. Il est ensuite centrifugé à 8000 rpm pendant 30 minutes de façon à éliminer la majorité de l'ADN chromosomique. 1 volume d'eau distillée est ajouté au surnageant. Le lysat clarifié est déprotéinisé par un volume de phénol saturé dans du tampon Tris-base 50 mM (pour 100 g de phénol, 36 ml de tampon Tris-Base 50 mM). L'ADN est précipité une nuit à 20° C après addition d'acétate de

sodium (concentration finale : 0.3 M) et de 2 volumes d'éthanol froid ; après centrifugation pendant 30 minutes à 8000 rpm le culot est repris dans 100 $\mu$ l de tampon T.E.S (Tris-HCl 50 mM , NaCl 50 mM , EDTA 5 mM pH 8). 30  $\mu$ l de chaque échantillon sont analysés par électrophorèse.

### 2.8.2. Technique d'Eckhardt (1978) modifiée par Rosenberg et al., 1982

Cette technique qui consiste à lyser les cellules directement dans le puits du gel, permet généralement d'observer des plasmides de masse moléculaire supérieure à 100 10<sup>6</sup> Dalton.

0,5 à 1 ml d'une culture de Rhizobium de 24 heures sur milieu YL sont centrifugés puis lavés en tampon T E S (Tris 10 mM ; EDTA 1mM ; 0,1% sarkosyl). Le culot est repris dans 50  $\mu$ l d'une solution contenant: Lysosyme 7500 U/ml , Ribonuclease I 0,3u/ml , bleu de bromophénol en tampon Tris borate 0,05% , 20% Ficoll 400. Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel vertical d'agarose à 0,7%. Les cellules sont laissées 1h à température ambiante. Les solutions 1 (2% SDS, 10% Ficoll 400) et 2 (2% S.D.S. 5% Ficoll 400) sont alors ajoutées à raison de 50  $\mu$ l et 100  $\mu$ l, respectivement pour compléter la lyse avant la migration.

### 2.8.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les électrophorèses sont réalisées sur gel vertical en plaque (20 x 14 x 0,4 cm) à 0,7% d'agarose Sigma type II tampon Tris Borate (Tris-Base 89 mM ; EDTA 2,5 mM ; acide borique 89 mM ; pH 8). Les échantillons extraits selon la technique de Meyers sont additionnés pour 1/5e de leur volume d'un mélange contenant du

glycérol 50%, TES 50%, du bleu de Bromophénol 0,07%, avant le dépôt sur le gel

La migration est réalisée sous un courant de 120 volts pour la technique de Meyers modifiée par Franche et Reynaud (1985) où sous un courant de 8 milliampères (60 minutes) puis 40 milliampères (3heures) pour la technique Eckhardt modifiée par Rosenberg et al.(1982).

Après migration, le gel est coloré par trempage dans du bromure d'éthyidium à 1µg/ml et photographié en lumière U.V.(254nm) à l'aide d'un appareil Polaroid de type MP.4 équipé d'un filtre rouge.

La masse moléculaire du plasmide est estimée par rapport à la migration de plasmides de référence de masses moléculaires connues, RP4 ( $36 \cdot 10^6$  Dalton) et col E1 ( $4,2 \cdot 10^6$  Dalton).

### 2.9. Culture des plantes hôtes

La stérilisation, la germination des graines, les dispositifs de culture et les méthodes d'inoculation sont décrites au chapitre II.

### 2.10. Spectre d'hôte

Pour l'étude du spectre d'hôte nous avons utilisé S. ros-trata et six autres espèces de Sesbania ne nodulant que sur les racines : S. aculeata, S. paludosa, S. emerus, S. sesban, S. pubescens, S. pachycarpa.

Les plantes sont cultivées en tube à l'aide du dispositif de culture hydroponique décrit au paragraphe 2.3.1 du chapitre II. Les racines des plantes sont inoculées à 3 semaines avec les

différentes souches de Rhizobium à tester. L'infectivité des souches et l'efficacité de la symbiose sont évaluées 20 jours après l'inoculation; l'activité fixatrice d'azote des nodules est estimée par la méthode de réduction l'acétylène (cf.chapitre III)

#### 2.11.Mesure de l'activité nitrogenase en condition de dérepression

Les différentes souches de Rhizobium sont cultivées en milieu YL pendant 36 heures. Elles sont centrifugées puis lavées deux fois avec un milieu L0. Le culot bactérien est repris avec du milieu L0. Des flacons sérum de 150ml contenant 10ml du milieu L0 sont inoculés à l'aide de cette suspension bactérienne de façon à obtenir une densité optique de 0,3 à 540 nm. L'air présent dans le flacon est remplacé par de l'argon. Pour chaque souche testée, deux tensions d'oxygène ont été utilisées, 3% et 5%. Après 3 heures d'incubation sous agitation à 32°C, l'acétylène est introduit dans les flacons (concentration finale : 10 %). Des prélèvements gazeux sont effectués à intervalles réguliers: 1, 3, 4 et 5h après l'introduction de l'acétylène. L'éthylène produit est mesuré par chromatographie en phase gazeuse.

A la fin de l'expérience on effectue un dosage de protéines par la méthode de Lowry et al.(1951) sur un aliquote prélevé dans chaque culture. L'activité réductrice d'acétylène est exprimée en nmoles/ C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/ min/ mg de protéines.

#### 2.12.Evaluation de l'efficacité de la symbiose entre différentes souches de Rhizobium et S. rostrata

Les plantes sont cultivées sur sol sableux dans des cylindres de P.V.C. rigide à raison de 4 plantes par cylindre.(cf.

Chapitre II) les tiges sont inoculées quand les plantes sont âgées de 4 semaines, par pulvérisation des tiges avec les différentes souches de Rhizobium à tester. La mesure de l'activité réductrice d'acétylène des nodules caulinaires est effectuée 3 semaines après l'inoculation.

Après séchage à l'étuve à 70°C pendant 48 heures, le poids de matière sèche des nodules et des plantes, l'azote total sont déterminés.

### 3. RESULTATS

#### 3.1. Morphologie des Rhizobium et des colonies

Sur les boîtes de Pétri, les diverses souches isolées forment des colonies d'aspects différents. Suivant les souches, on distingue trois types de colonies : des colonies d'allure sèche (souche GN15 et F9), des colonies muqueuses (souche Nem1), les autres souches testées formant des colonies circulaires blanches et opaques.

Au microscope optique, les bactéries se présentent sous forme de bâtonnets Gram-négatif très homogènes d'environ 0.5  $\mu\text{m}$  de large sur 2 à 3  $\mu\text{m}$  de long.

#### 3.2. Tests nutritionnels

La croissance des souches de Rhizobium a été étudiée en présence de différentes sources de carbone : sucres, acides organiques, acides dicarboxyliques, amino acides, composés aromatiques.

Les résultats, obtenus (tableau 1) montrent que les souches testées utilisent toutes les mêmes substrats : glucose, gluconate, acétate, succinate, lactate et glucosamine. Aucune n'utilise le ribose l'arabinose, le lactose, le maltose, le mannitol ou le sorbitol.

#### 3.3. Résistance naturelle aux antibiotiques

Nous avons testé la sensibilité de différentes souches de Rhizobium à deux concentrations d'antibiotique. Les antibiotiques utilisés appartiennent aux familles suivantes : Beta-Lactamines (Pénicilline, Ampicilline, Carbénicilline, Céfalotine) ;

Tableau : 1. Utilisation des substrats carbonés par différentes souches de Rhizobium isolées de Sesbania rostrata

Substrats carbonés	Souches de <u>Rhizobium</u>									
	ORS571	GN 11	GN 15	GN 17	GN 20	Bam 1	Bam 2	Nem 1	F 9	Zig 1
D (+) Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D (-) Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D (+) Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D (-) Fructose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Succinate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-L Lactate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ Alanine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) indique une absence de croissance sur boîte

(+) indique une croissance sur boîte.

Aminosides (Streptomycine, Néomycine, Kanamycine, Gentamycine) ;  
Tétracyclines ; Macrolites (Erythromycine) ; Polypeptides  
(Bacitracine) ; Sulfamides (Triméthoprime + sulfaméthoxazole,  
Furadantine, Acide nalidixique); Chloramphénicol; Novobiocine.

Les résultats obtenus (tableau 2) montrent que la majorité des souches testées, ainsi que la souche de référence ORS571 sont résistantes aux antibiotiques appartenant à la famille des Beta-lactamines. Toutes les souches sont sensibles aux antibiotiques de la famille des Aminosides. La souche GN15 est sensible à la novobiocine et résistante au chloramphénicol alors que toutes les autres souches sont au contraire résistantes à la novobiocine et sensibles au chloramphénicol. La souche GN 17 est la seule à présenter une résistance à la furadantine.

#### 3.4. Parentés antigéniques

Les résultats rapportés dans le tableau 3 montrent que 5 des 9 souches testées possèdent des antigènes de surface reconnus par les anticorps anti ORS571, et fluorescent comme ORS571 : Nem1, F9, Bam1, Bam2, et GN15. La souche GN17 présente une fluorescence intermédiaire. Les souches GN20, Zig1 et GN11 ne fluorescent pas.

#### 3.5. Sensibilité aux phages RS1 et RS2

Une seule souche de Rhizobium, Bam1, est sensible aux phages RS1 et RS2 spécifiques de la souche ORS571. Des plages claires sont observées avec RS1 et des plages troubles avec RS2 (fig. 3). Ces résultats sont analogues à ceux observés avec la souche ORS571 par De Lajudie et Bogusz (1984). Pour les autres souches aucune plage de lyse n'a été observée (tableau 4).

Tableau 2. Résistance naturelle aux antibiotiques de souches de *Rhizobium* isolées de *Sesbania rostrata*.

Antibiotiques	Concentrations d'antibiotique testées ( $\gamma$ )	Souches de <i>Rhizobium</i>										
		ORS571	GN 11	GN 15	GN 17	CN 20	Bam 1	Bam 2	Nem 1	F 9	Zig 1	
Pénicilline	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	200	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ampicilline	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	200	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Carbénicilline	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	200	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Céfalotine	30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	60	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Streptomycine	10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Erythromycine	15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Rifampicine	5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Novobiocine	30	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
	60	I	I	S	I	I	I	I	I	I	I	I
Bacitracine	10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	20	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Triméthoprim + Sulfaméthoxazole	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	200	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Néomycine	5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kanamycine	30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	60	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Gentamycine	10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Chloramphenicol	30	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	60	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Tétracycline	30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	60	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Furadantine	300	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
	600	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Acide Nalidixique	30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	60	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S = La souche est sensible; aucune croissance sur boîte; I = La souche présente une sensibilité intermédiaire; faible croissance.  
R = La souche est résistante.



Fig. 3

Sensibilisé de la souche Baml aux phages  
RS1 (lytique) et RS2 (tempéré)

- RS1 = plage de lyse claire
- RS2 = plage de lyse trouble mettant en évidence la présence de bactéries lysogène pour RS 2.

Tableau: 3 . Réaction de l'antisérum anti-ORS571 avec les antigènes de surface de différentes souches de Rhizobium isolées de Sesbania rostrata

Souches de <u>Rhizobium</u>	*Origine des souches testées	**Fluorescence spécifique observée
ORS571	Richard Toll	+ + +
GN_15	NGnith	+ + +
Bam 1	Bambey	+ + +
Bam 2	Bambey	+ + +
Nem 1	Néma	+ + +
F 9	Fumela	+ + +
GN 17	NGnith	+
GN 11	NGnith	-
GN 20	NGnith	-
Zig 1	Ziguinchor	-

\* : Les souches ont été isolées à partir de plantes de S. rostrata récoltées dans les lieux géographiques indiqués

\*\* : L'intensité de la fluorescence est estimée par comparaison avec le témoin positif ORS571 traité avec l'anticorps anti-ORS571

+++ : Fluorescence observée identique au témoin positif

+ : Légère fluorescence

- : Pas de fluorescence.

Tableau : 4. Sensibilité aux phages RS<sub>1</sub> et RS<sub>2</sub> de différentes souches de Rhizobium isolées de S. rostrata

<u>Rhizobium</u> testés		Phages	
<u>Souches</u>	<u>Origine</u>	<u>RS<sub>1</sub></u>	<u>RS<sub>2</sub></u>
ORS 571	Richard-Toll	C*	T**
Bam 1	Bambey	C	T
Bam 2	Bambey	-	-
Nem 1	Néma	-	-
F 9	Fumela	-	-
GN 15	Ngnith	-	-
GN 17	Ngnith	-	-
GN 20	Ngnith	-	-
Zig 1	Ziguinchor	-	-

\* Plage de lyse claire

\*\* Plage de lyse trouble.

### 3.6. Mise en évidence des plasmides

La technique Eckhardt modifiée par Rosenberg et al. (1982) n'a pas permis d'observer des plasmides avec les souches de Rhizobium étudiées. La raison en est probablement une lyse insuffisante par cette technique. Des lavages à forte concentration saline (3 lavages avec NaCl 0,5 M) avant l'addition de la solution 1 contenant le lysosyme, n'a pas permis d'améliorer la lyse.

Par contre la technique Meyers modifiée par C. Franche et P. Reynaud (1985) nous a permis d'observer des plasmides chez certaines souches de Rhizobium. (fig. 4 et 5).

Ces plasmides ont une masse moléculaire comprise entre  $5 \cdot 10^6$  Dalton et  $12 \cdot 10^6$  Dalton (tableau 5). Le contenu plasmidique des souches GN15, GN17 et Bam 1 est identique à celui de la souche de référence ORS571 qui possède un plasmide de  $5 \cdot 10^6$  Dalton mis en évidence par Dreyfus (1982), la souche F9 possède un plasmide de  $8 \cdot 10^6$  Dalton ; GN 11 et Zig1 possèdent un plasmide de  $12 \cdot 10^6$  Dalton. Les souches Nem1, Bam2 et GN20 ne contiennent pas de plasmides.

### 3.7. Spectre d'hôte

Les résultats obtenus ont été rapportés dans le tableau 6. La majorité des souches testées induisent la formation de nodules efficaces avec S. rostrata et S. paludosa. Par contre la souche Nem1 est la seule à induire la formation de nodules inefficaces aussi bien avec S. rostrata qu'avec S. paludosa. Les 5 autres espèces de Sesbania ne forment que des nodules inefficaces ou ne nodulent pas avec certaines des souches testées.

Fig.4 et 5 : Mise en évidence par électrophorèse en gel d'agarose (Technique de Meyers 1976) de plasmides de petits poids moléculaire chez différentes souches isolées de S. rostrata.

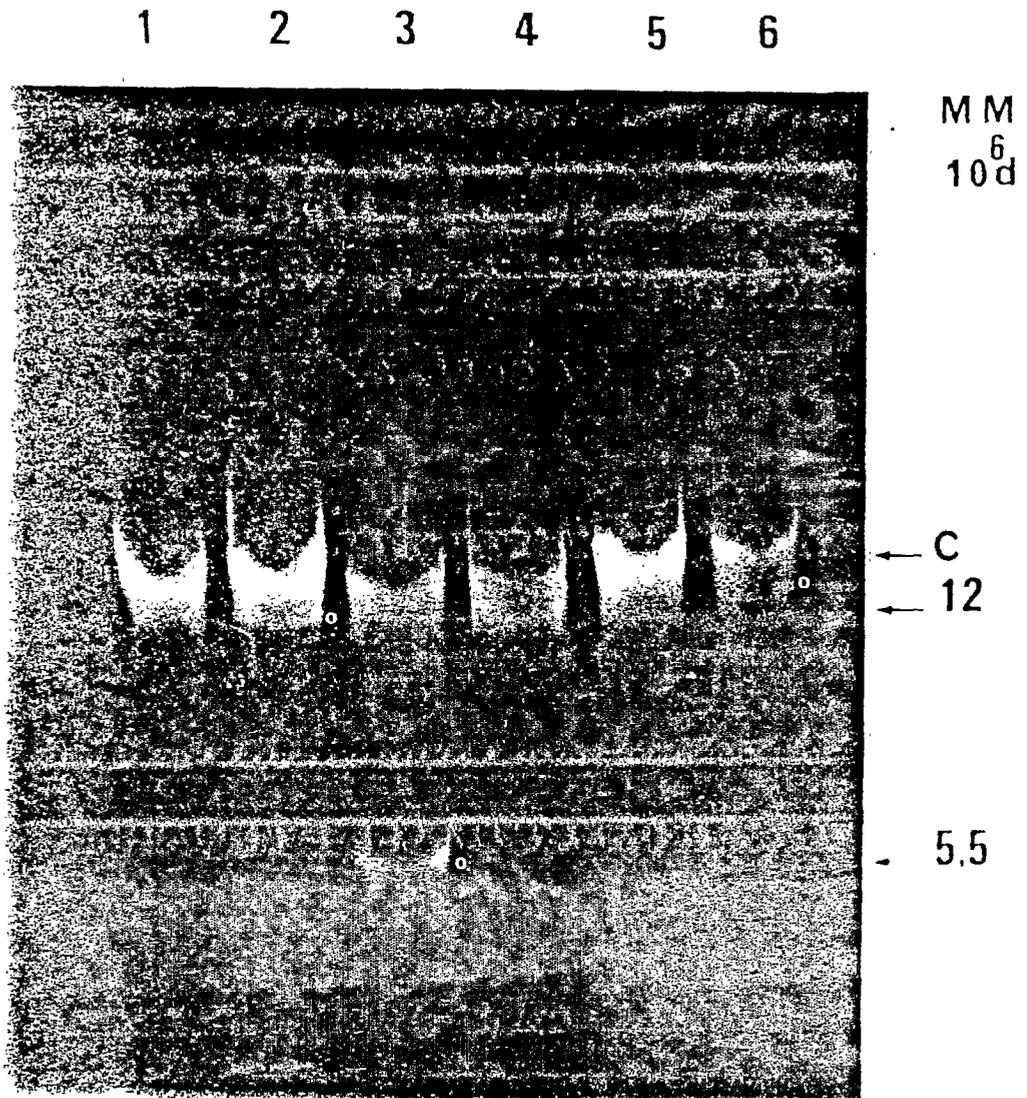


Fig. 4 : C : ADN linéaire.

1 : Nem1 ; 2 : GN11 ; 3 : GN17

4 : GN20 ; 5 : Bam2 ; 6 : Zig1

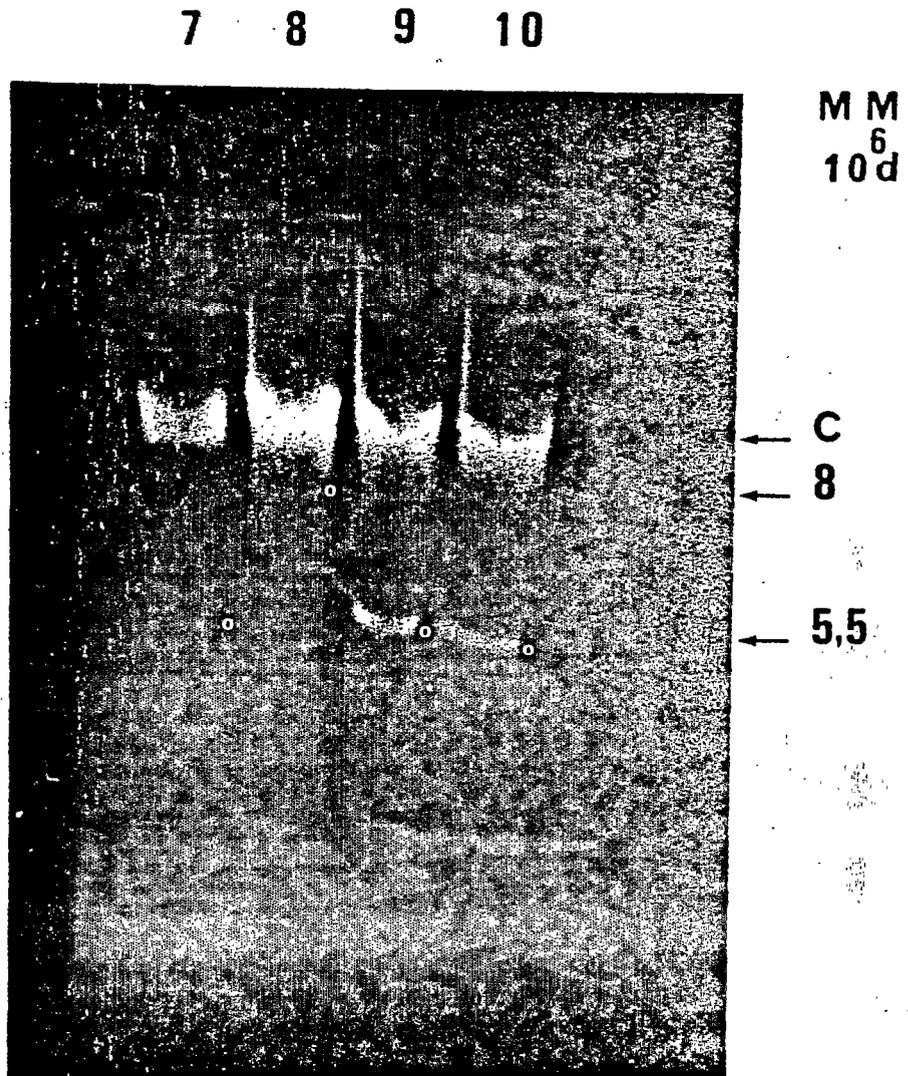


Fig. 5 : C : ADN linéaire.

7 : GN15 ; 8 : F9 ;

9 : ORS571 ; 10 : Bam1.

Tableau: 5. Contenu plasmidique de souches de Rhizobium isolées de Sesbania rostrata

Souches de <u>Rhizobium</u>	Plasmides	
	Nombre	Masse moléculaires x 10 <sup>6</sup> d
ORS571	1	5,5
GN 15	1	5,5
GN 17	1	5,5
Bam 1	1	5,5
F 9	1	8
GN 11	1	12
Zig 1	1	12
Bam 2	0	-
Nem 1	0	-
GN 20	0	-

Tableau 6 . Spécificité d'hôte et effectivité de souches de Rhizobium isolées de Sesbania rostrata

Plantes hôtes	Souches de Rhizobium									
	ORS571	GN 11	GN 15	GN 17	GN 20	Bam 1	Bam 2	Nem 1	F 9	Zig 1
<u>Sesbania rostrata</u>	E	E	E	E	E	E	E	I	E	E
<u>Sesbania paludosa</u>	E	I	E	E	E	E	E	I	E	E
<u>Sesbania pubescens</u>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<u>Sesbania aculeata</u>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<u>Sesbania pachycarpa</u>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<u>Sesbania sesban</u>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<u>Sesbania cannabina</u>	I	I	0	I	I	I	I	I	I	I
<u>Sesbania emerus</u>	0	I	I	0	I	0	I	I	I	I

E : efficiente

I : inefficiente

0 : pas de nodulation

### 3.8. Activité nitrogénase in vitro, de différentes souches de Rhizobium en fonction de la tension d'oxygène

Les résultats suivants ont été obtenus (tableau 7) :

- 4 souches ont une activité maximale en présence de 3% d'oxygène comme ORS 571 : GN11, GN15, Bam 1 et Bam 2,
- les souches GN17, GN20, F9 et Zig1 ont une activité maximale en présence de 5% d'oxygène,
- l'activité réductrice d'acétylène de la souche Nem1 est nulle aux deux tensions d'oxygène.

### 3.9. Evaluation de l'efficacité de la symbiose caulinaire entre différentes souches de Rhizobium et S. rostrata

Les résultats obtenus (tableau 8) montrent que la majorité des souches testés sont toutes capables d'induire la formation de nodules caulinaires effectifs sur les tiges de S. rostrata.

Les plantes inoculées avec la souche Nem1 présente l'activité réductrice d'acétylène la plus faible (27 umoles/ C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> /h/plante) elle est de 96 umoles/ C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> / h / plante avec la souche de référence ORS571.

Le poids de matière sèche est de 5g/plante pour les plantes inoculées avec la souche Nem1 contre 29g pour les plantes inoculées avec la souche ORS571.

L'azote total par plante varie dans le même sens: 0.06 g

Tableau 7. Activité nitrogénase de souches de Rhizobium  
en présence de différentes tensions d'oxygène

Souches	Activité nitrogénase ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4$ /mn/mg protéine)	
	$A_r - O_2$ (97% - 3%)	$A_r - O_2$ (95% - 5%)
ORS 571	77	44
GN 17	33	96
GN 20	40	50
GN 15	42	18
GN 11	21	10
F 9	40	80
Zig 1	44	68
Bam 1	30	-
Bam 2	7	-
Nem 1	-	-

Tableau 8 . Comparaison de l'efficience de la symbiose entre Sesbania rostrata et différentes souches de Rhizobium isolées de S. rostrata

Souches	Hauteur (cm)	Parties aériennes			Nodules poids sec (g/plante)	Activité Réductrice d'Acétylène	
		Poids sec (g/plante)	Azote %	Azote total (g/plante)		Par plante ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}$ )	Par g de nodules ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )
ORS571	147,0 f	29,0 f	2,56	0,74 e	1,00 d	96,0 d	96,0 d
GN 11	98,0 b	12,5 b	2,59	0,32 b	1,00 d	90,0 c	90,0 c
GN 15	142,0 c	18,5 d	2,47	0,45 c	0,55 b	91,0 c	182,0 g
GN 17	137,0 d	27,0 f	2,39	0,64 d	0,80 c	89,0 c	11,0 f
GN 20	141,0 e	28,5 f	2,60	0,74 e	1,10 d	123,0 f	112,0 f
Bam 1	130,0 d	25,0 e	2,49	0,62 d	0,96 cd	97,5 d	101,5 e
Bam 2	137,0 de	28,5 f	2,19	0,62 d	1,10 d	81,5 b	74,0 b
Nem 1	57,0 a	5,0 a	1,23	0,06 a	0,41 a	27,0 a	66,0 a
F 9	125,0 cd	18,0 d	2,63	0,47 c	1,26 e	133,5 e	106,0 ef
Zig 1	121,0 c	14,5 c	2,37	0,34 b	0,73 c	80,5 b	110,0 f

Dans chaque colonne les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05) (Test de DUNCAN, 1955).

avec la souche Nem1 contre 0.74 g avec la souche ORS571.

Les résultats contenus dans le tableau 8, montrent que l'ensemble des mesures effectuées sur les plantes inoculées avec la souche Nem1 sont les plus faibles ( cf. en particulier la hauteur des plantes fig. 6)



Fig. 6 : Inoculation de *S. rostrata*  
avec deux souches de *Rhizobium*  
Nem 1 = souche inefficente  
GN20 = souche efficiente

Tableau 9. Récapitulatif des caractères phénotypiques des souches de *Rhizobium* étudiées.

Caractères		Souches de <i>Rhizobium</i> testées									
		ORS 571 souche de référence	Bam 1	GN 11	Zig. 1	Nem 1	F 9	GN 17	GN 15	GN 20	Bam 2
Morphologie des colonies	- sèches	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	- muqueuses	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	- intermédiaires	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
*Antibiotiques	1 Furadantine	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	2 Chloramphenicol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	3 Novobiocine	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Fluorescence avec anticorps ORS 571	+ + +	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
	+ -	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-
Sensibilité aux phages RS1 et RS2	Sensibles	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Contenu plasmidique	Plasmides										
	5,5.10 <sup>6</sup> d	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	8,0.10 <sup>6</sup> d	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	12.10 <sup>6</sup> d	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	Pas de plasmide	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+

\* Antibiotiques (+) : souche résistante, (-) : souche sensible

1: Furadantine, 2: Chloramphenicol, 3: Novobiocine.

#### 4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'ensemble des caractères phénotypiques étudiés pour les dix souches de Rhizobium isolées de S. rostrata permet de conclure qu'il y a au moins huit souches différentes capables d'infecter cette légumineuse tropicale. La souche Bam1 est par contre la seule à posséder les mêmes caractères phénotypiques que la souche de référence ORS571. (tableau 9).

Les souches forment en général des colonies circulaires blanches et opaques. Cependant la souche Nem1 forme des colonies muqueuses et la souche F9 des colonies sèches.

Les souches étudiées présentent une grande homogénéité en ce qui concerne l'utilisation des substrats carbonés.

La résistance naturelle aux antibiotiques du groupe des Beta-lactamines et la sensibilité aux Aminosides confirment les résultats déjà obtenus avec la souche ORS571 (Dreyfus, 1982) et semblent être une caractéristique des souches isolées de S. rostrata. Cependant la souche GN15 est sensible à la novobiocine et résistante au chloramphénicol et la souche GN17 résistante à la furadantine.

Un seul Rhizobium étudié possède à sa surface les récepteurs des phages RS1 et RS2. Les souches résistantes peuvent être soit des mutants spontanés devenus résistants aux phages, soit des souches qui n'ont jamais possédé les récepteurs spécifiques de RS1 et RS2. La fréquence des mutants spontanés de ORS571 qui résistent à RS1 et RS2 est relativement élevée, environ 1% ( D. Bogusz, communication personnelle).

Les souches GN15, GN17 et Bam1, paraissent avoir le même contenu plasmidique que ORS571  $5,5 \cdot 10^6$  Dalton. Les souches

suivantes ont un contenu plasmidique différent de ORS571 il s'agit de F9,  $8 \cdot 10^6$ ; GN 11 et Zig1,  $12 \cdot 10^6$ . Il serait nécessaire de procéder à la purification de ces plasmides et à l'analyse de leurs cartes physiques, afin de préciser le degré de parenté d'une souche à l'autre. Trois souches ne possèdent pas de plasmides (Bam2, Nem1 et GN20). La différence du contenu plasmidique entre les souches suggère une diversité au niveau des souches nodulant S. rostrata.

Pour l'instant aucun caractère phénotypique ne peut être attribué à ces plasmides. La présence des petits plasmides de masse moléculaire identique à ORS571 ne confère pas la sensibilité aux phages RS1 et RS2. De même nous n'avons pu relier la présence d'un plasmide à la résistance aux antibiotiques et à l'utilisation des substrats carbonés.

Chez les Rhizobium à croissance rapide, des fonctions importantes comme la fixation d'azote et la nodulation sont portées par des plasmides de masses moléculaires élevées (Corbin et al. 1983 ; Downie et al. 1984 ; Bender et al., 1986). De tels plasmides n'ont pas été observés chez les Rhizobium à croissance lente (Haugland et Verma, 1981 ; Masterson et al., 1982).

Chez les Rhizobium à croissance lente les gènes nif ont été localisés sur le chromosome. Chez ORS571, ces gènes sont également chromosomiques, (Donald et al., 1986).

L'étude des parentés antigéniques des souches de Rhizobium nodulant S. rostrata a permis de mettre en évidence trois groupes de Rhizobium. Les souches GN15, Bam1, Bam2, Nem1, et F9 donnent une fluorescence maximale avec l'anticorps anti ORS571 ; la souche GN17 présente une fluorescence intermédiaire ; les souches

GN20, GN11, et Zig1 ne fluorescent pas. L'utilisation de techniques plus fines telles que la technique E.LI.SA. (Kishinevsky et Bar-Joseph, 1978) est nécessaire pour confirmer ces résultats.

Parmi les espèces de Sesbania testées pour l'étude du spectre d'hôte, S. paludosa est la seule avec laquelle la majorité des souches établissent une symbiose efficace. La souche Nem1 est la seule à établir une symbiose inefficace aussi bien avec S. rostrata qu'avec S. paludosa.

L'étude de l'activité nitrogénase en condition de dérépression montre que les souches GN11, GN15, Bam1 et Bam2 présentent une activité de réduction d'acétylène maximale en présence de 3% d'oxygène comme la souche ORS571. Par contre les souches GN17, GN20, F9 et Zig1 présentent une activité maximale à 5% d'oxygène et apparaissent donc plus tolérantes vis à vis de l'oxygène. L'aptitude à fixer l'azote en culture libre semble être une caractéristique commune à la majorité des Rhizobium nodulant à la fois les tiges et les racines de S. rostrata. La souche Nem1 qui ne présente pas d'activité réductrice d'acétylène aussi bien en symbiose qu'en condition de dérépression pourrait être un mutant naturel nif-.

Afin de définir le degré de parenté entre les souches étudiées, il serait intéressant d'effectuer sur les différentes souches de Rhizobium isolées de S. rostrata une étude de taxonomie moléculaire analogue à celle effectuée par Stanley et al. (1985) sur 10 souches de Rhizobium japonicum. Cette étude basée sur la comparaison des sites de restriction dans les gènes nif et nod de souches de R. japonicum a permis de mettre en évidence deux lignées évolutives.

CHAPITRE II

EFFET DE L'AZOTE COMBINE SUR LA SYMBIOSE ENTRE

*RHIZOBIUM* ET *SESBANIA ROSTRATA*.



## 1. INTRODUCTION

En présence d'une légumineuse hôte spécifique, les bactéries du genre Rhizobium peuvent induire la formation de nodosités fixatrices d'azote. L'azote fixé participe pour une part importante à la nutrition azotée de la plante, mais ne peut à lui seul couvrir la totalité de ses besoins.

Dans la pratique, une dose " starter " d'azote minéral apportée au semis peut éviter la dépression azotée qui suit l'épuisement des réserves de la graine, et précède l'établissement d'une symbiose efficiente. Cependant, il est bien établi que des concentrations élevées d'azote combiné dans le sol ou dans un milieu de culture synthétique, exercent un effet inhibiteur sur les différentes phases du processus d'infection et sur le développement des nodules (Dart, 1977 ; Gibson, 1976 ; Munns, 1977 ; Rigaud, 1981). Le degré de l'inhibition peut varier selon la dose d'azote appliquée, les conditions de culture des plantes, la nature de la légumineuse (Harper et Gibson, 1984) et le type de microsymbiote (Gibson, 1976; Mc Neil, 1982 ; Nelson, 1983). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer cette inhibition. Les premières phases de l'infection (attachement du Rhizobium, courbure du poil absorbant, émission de cordons d'infection) sont inhibées par l'azote combiné (Munns, 1968 ; Dazzo et Brill, 1978). Le caractère localisé de cette inhibition a été mis en évidence par Hinson (1975), Carroll et Gresshoff (1983), en utilisant la technique de culture dite " split root".

Kefford et al. (1960), Libbenga et Torrey (1973) ont montré que l'auxine AIA (acide indol acétique) intervenait dans le processus d'infection par les poils absorbants. C'est pourquoi Tanner et Anderson (1964) et Munns (1968) ont proposé l'hypothèse selon laquelle les nitrites provenant de la réduction des nitrates inhibaient la nodulation en accélérant la destruction de l'AIA.

L'azote combiné provoque souvent une diminution de l'activité nitrogénase des nodules (Pate et Dart, 1961 ; Oghoghorie et Pate, 1971 ; Houwaard, 1978). Celle-ci est souvent attribuée à la compétition qui pourrait s'instaurer entre les deux systèmes de nutrition azotée pour l'utilisation des photosynthétats (Small et Leonard 1969 ; Latimore et al., 1977 ; Houwaard, 1980 ; Wong 1980). Certains produits du métabolisme des nitrates, les nitrites probablement, ont un effet dépressif sur l'activité de la nitrogénase et sur la structure de la légghémoglobine (Kennedy et al., 1975 ; Rigaud et Puppo, 1977 ; Bisseling et al., 1978 ; Streeter, 1981).

Dreyfus et Dommergues (1980), ont mis en évidence la non-inhibition de la nodulation caulinaire en présence d'azote combiné chez Sesbania rostrata.

Dans ce chapitre nous avons étudié l'influence des différentes formes d'azote combiné sur la symbiose entre Rhizobium et S. rostrata, pour cela nous avons utilisé plusieurs dispositifs pour la culture des plantes, et diverses sources d'azote combiné.

A l'aide de la microscopie photonique et de la microscopie électronique, nous avons également étudié la structure et l'ultrastructure de nodules caulinaires développés en présence d'azote combiné.

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Germination des graines

La germination des graines de S. rostrata ne peut être obtenue qu'après scarification. Les graines peuvent être scarifiées soit par traitement à l'acide sulfurique concentré, soit par abrasion en présence de sable siliceux.

- Le traitement à l'acide sulfurique permet de scarifier les graine tout en les stérilisant, il consiste à immerger les graines dans l'acide sulfurique concentré pendant 30mn ; les graines sont ensuite abondamment rincées à l'eau distillée.

- Le second traitement consiste à mélanger les graines à un égal volume de sable siliceux dans un mortier et à triturer le mélange à l'aide d'un pilon ; on arrête 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 ensuite déposées en boîte de Pétri contenant de l'eau gélosée ( 5g/l d'Agar) . Quand les radicules atteignent 1 à 2 cm de long (après environ 48h), 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

Pour la culture des plantes en tubes et en vase de végétation, nous avons utilisé le milieu décrit par Bethlenfalvay et

Phillips (1978) auquel nous avons apporté quelques modifications. Il contient (par litre de milieu) :  $K_2CO_3$  , 0,28g ;  $K_3PO_4 (2H_2O)$ , 0,5g ;  $Mg SO_4(7H_2O)$ , 0,25g ;  $FeCl_3$ : 0,1 g ;  $H_3BO_3$  , 2,86 mg ;  $MnSO_4 (4H_2O)$ , 2,03 mg ;  $ZnSO_4 (7H_2O)$  , 0,20 mg ;  $CuSO_4(5H_2O)$  , 0,80mg ;  $Na MoO_4(4H_2O)$ , 0,09mg ; pH : 6,8. Le milieu est stérilisé 20 minutes à: 120 °C.

### 2.3. Dispositifs de culture des plantes

Les différentes expériences que nous avons effectuées ont nécessité l'utilisation de trois dispositifs de culture de plantes.

#### 2.3.1. Culture hydroponique

Nous avons procédé à la modification du dispositif de culture de Gibson décrit par Vincent (1970). Les modifications ont eu pour but d'améliorer l'aseptie du système et d'en faciliter la manipulation. Le dispositif utilisé (fig. 7) est constitué d'un tube Pyrex de 22 x 220 mm comportant un orifice à sa partie inférieure obturée par un bouchon vacutainer (B.D. Merieux) permettant l'évacuation du milieu de culture et d'une tubulure latérale dans sa partie supérieure (tube de 12 mm) également obturé par un bouchon vacutainer, destiné à l'apport de milieu . Une couche de laine de verre reposant sur quatre points de Vigreux, sert de support à la plantule.

Pour éviter le dessèchement de l'enveloppe cotylédonnaire et permettre aux cotylédons de se libérer facilement, une atmosphère humide est nécessaire pendant 48 heures. Pour cela on place un tube Pyrex de 25 x 150mm à la partie supérieure du tube de 22 x 220mm. L'ensemble du dispositif est autoclavé pendant 20 minutes

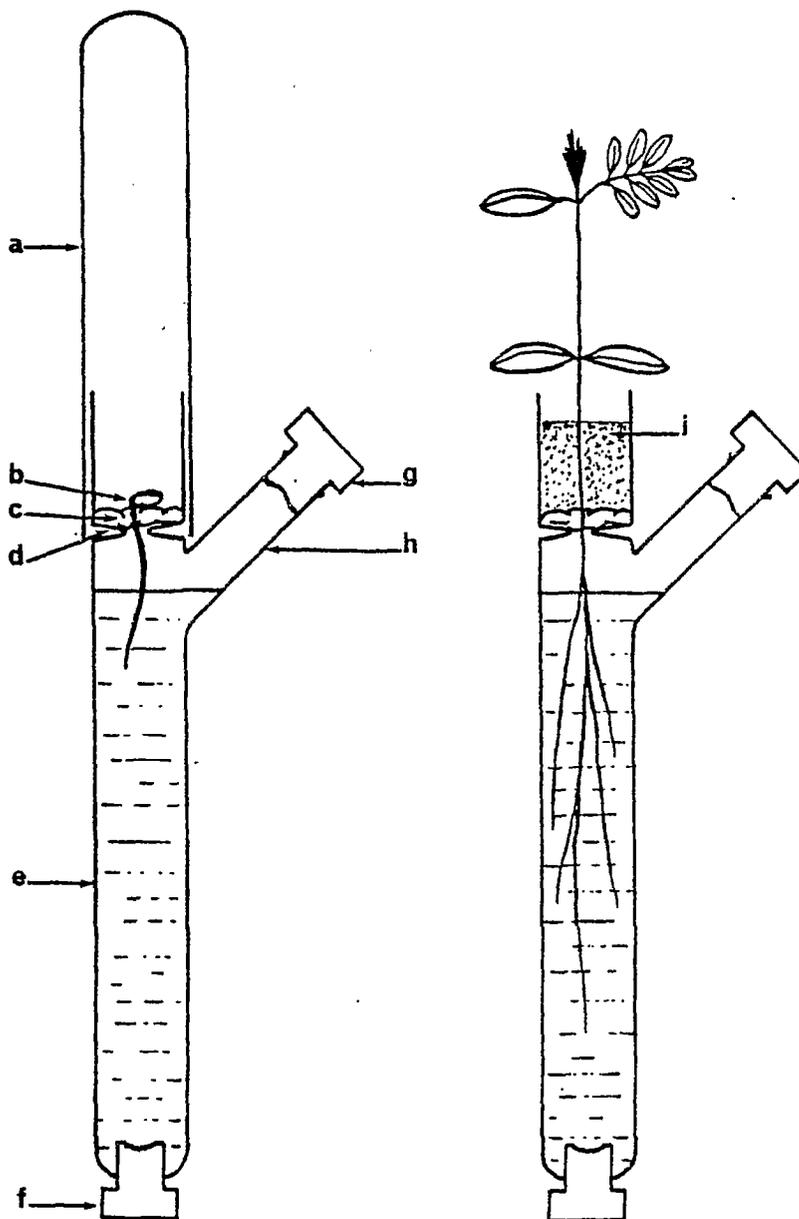


Fig. 7 Dispositif de culture hydroponique

a = tube en Pyrex 25 x 150 mm

b = graine prégermée

c = laine de verre

d = point de Vigreux

e = tube en Pyrex 22 x 220 mm.

f = orifice d'évacuation obturé par un bouchon Vacutainer

g = orifice darrosage obturé par un bouchon Vacutainer

h = tubulure latérale

i = sable hydrofugé.

à 120 °C avant utilisation.

Après germination des graines sur eau gélosée en boîte de Pétri, les plantules sont transférées aseptiquement dans le dispositif de culture. Lorsque la plante atteint 3cm environ, un joint de sable paraffiné stérile est coulé au niveau du collet (le sable paraffiné est obtenu en mélangeant 1 kg de sable à 6 g de paraffine rendue liquide (60°C) puis dissoute dans 100 ml de benzène ; le mélange obtenu est maintenu sur plaque chauffante pour éliminer le benzène). Dans ces conditions, les racines se développent en conditions aseptiques alors que la tige et les feuilles sont à l'air libre.

Afin d'étudier l'effet de l'azote combiné sur la symbiose entre Rhizobium et S. rostrata, les plantes sont maintenues pendant 4 semaines sur milieu minéral contenant 2 mM-N ; après ce temps, le milieu est remplacé par un milieu contenant : 0 ; 3,0 ; 6,0 ; ou 12mM-N sous forme  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2(4\text{H}_2\text{O})$ , ou  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Chaque traitement comporte 6 répétitions.

Les plantes sont placées en chambre de culture ( éclairement au niveau des plantes 12000 Lux environ, photopériode 14h d'illumination, température comprise entre 28°C et 32°C. Les mesures de réduction de l'acétylène, le dosage d'azote total et la détermination du poids sec des plantes sont effectuées 3 semaines après l'inoculation.

### 2.3.2. Culture en vase de végétation

Un dispositif de culture a été mis au point pour permettre une croissance optimale des plantes ( il est décrit à la fig. 8).

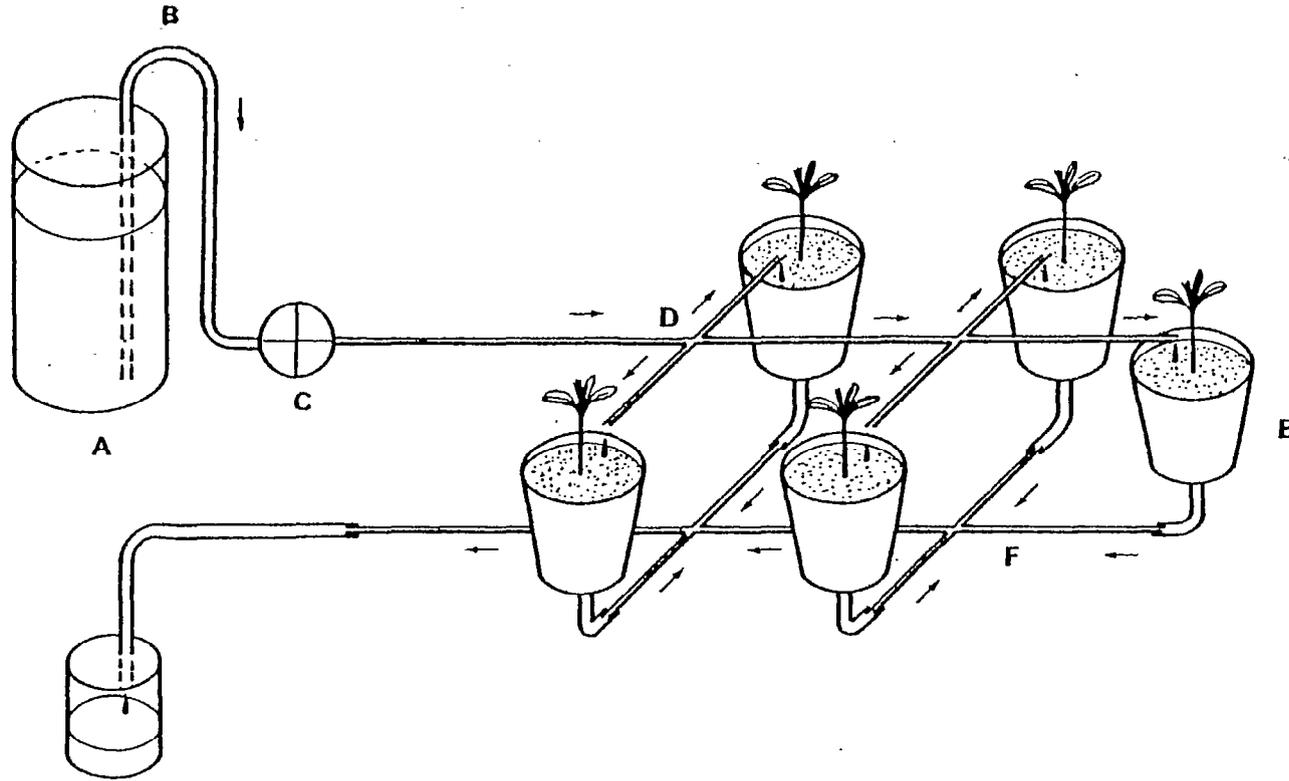


Fig. 8 : Dispositif de culture des plantes avec apport continu de milieu nutritif.

- Quatre seaux (A) d'une capacité de 20 litres chacun contenant du milieu neuf
- Quatre distributeurs (D) en canne de verre de 7 mm muni chacun de cinq tubulures latérales permettant d'arroser simultanément cinq pots.
- Cinq pots (E) sont disposés sous chacune des tubulures des quatre distributeurs (soit 20 pots au total). Les pots disposent à leur base d'un orifice relié à un collecteur (F) permettant de recueillir simultanément les milieux non utilisés par cinq plantes.
- Les quatre seaux contenant du milieu neuf et les quatre distributeurs de milieu sont reliés à une pompe péristaltique (DESAGA) (C) par des tuyaux souples en P.V.C.
- Le débit de la pompe est réglé de manière à assurer un apport de milieu neuf de 300 ml environ par plante et par 24h.

Pour éviter l'effet dépressif que l'engorgement du sol peut exercer sur l'activité des nodules racinaires (Sprent 1971), les plantes sont cultivées sur un mélange de sable et de gravier dans des pots munis d'un système permettant une parfaite percolation. Après 4 semaines de culture on procède à l'inoculation des tiges et des racines avec la souche de Rhizobium ORS571. (cf. paragraphe 2.4. de ce chapitre)

L'arrosage des plantes est assuré par une pompe péristaltique avec une solution nutritive comportant la base minérale du milieu décrit au paragraphe 2.2. diluée 5 fois, et différentes concentrations en azote : 0 ; 1,5 ; 3,0 et 6,0 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , soit l'équivalent de : 0 ; 3,0 ; 6,0 et 12 mM-N. Le débit de la pompe péristaltique est ajusté de manière à maintenir constantes les concentrations d'azote (300ml de milieu par jour et par pot). Il y a une plante par pot et 5 pots par traitement.

Les paramètres liés à la symbiose (poids sec des plantes et des nodules, nombre de nodules, activité réductrice d'acétylène et azote total des plantes) sont mesurés après 7 semaines de culture, 3 semaines après l'inoculation des tiges et des racines.

### 2.3.3. Culture sur sol en cylindre

Les plantes sont cultivées dans des cylindres en P.V.C. de 30 cm de diamètre et 60 cm de hauteur à raison de 4 plantes par cylindre. Les cylindres sont hermétiquement fermés à leur partie inférieure, enfouis dans le sol en place jusqu'à 10 cm au bord supérieur et remplis de 32 kg de sol de la station de Bel-Air dont les caractéristiques physico-chimiques sont données en annexe.



Fig. 9 : Dispositif de culture de  
S. rostrata sur sol

Deux doses d'azote minéral ont été utilisées : 2.25 et 4.50g d'urée par cylindre , soit l'équivalent de 150 et 300 kg-N/ha. Cette expérience a comporté 5 traitements avec 3 répétitions

(1) témoin sans apport d'azote.

- application de l'urée au semis:

(2) 150kg-N/ha ; (3) 300kg-N/ha.

-application de l'urée trois semaines après le semis au moment de l'inoculation:

(4) 150kg-N/ha ; (5) 300kg-N/ha.

les mesures des paramètres suivants: hauteur, poids sec des plantes et des nodules ,azote total et activité réductrice d'acétylène sont effectuées après 7 semaines, soit 3 semaines après inoculation des tiges avec la souche de Rhizobium ORS571.

#### 2.4.Inoculation de S. rostrata

Les tiges et les racines sont inoculées avec une culture de Rhizobium en phase exponentielle de croissance (environ  $10^8$  bacteries/ml).

##### 2.4.1.Inoculation des tiges

Lorsque les plantes sont cultivées en chambre de culture ou en serre, les tiges de S.rostrata sont inoculées en badigeonnant les sites de nodulation avec un pinceau fin préalablement trempé dans une culture de Rhizobium.

- Les tiges des plantes cultivées en cylindre (à l'extérieur) sont inoculées par pulvérisation avec une culture de Rhizobium à l'aide d'un pulvérisateur.

### 2.4.2. Inoculation des racines

- Les racines des plantes cultivées en tube (dispositif de culture hydroponique fig. 7) sont inoculées en introduisant aseptiquement 0,1ml d'une culture de Rhizobium par la tubulure latérale du dispositif de culture.

- Les racines des plantes cultivées sur sol en cylindre ou en vase de végétation sont inoculées en arrosant les racines avec une culture de Rhizobium.

### 2.5. Etude structurale de nodules caulinaires développés en présence d'azote combiné

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou KNO<sub>3</sub>

Des plantules de S. rostrata sont cultivées en tube dans le milieu liquide dont la base minérale est décrite au paragraphe 2.2. de ce chapitre. L'inoculation des tiges par le Rhizobium ORS571, a lieu 4 semaines après la mise en culture des plantes, elles sont ensuite maintenues dans des milieux comportant différentes concentrations d'azote (0 ; 3,0 ; 6,0 ; 12 mM-N) apportées soit sous forme de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou de KNO<sub>3</sub>; les plantes témoin sont cultivées sur le même milieu sans azote .

Des nodules caulinaires en cours de formation sont prélevés tous les 2 jours pour l'étude structurale en microscopie photonique. La mesure de l'activité réductrice d'acétylène des nodules caulinaires est effectuée 3 semaines après l'inoculation sur des plantes de 7 semaines.

#### 2.5.1. Microscopie photonique

La fixation des nodules est assurée par le mélange de

Nawashine (Lison, 1960). Le matériel est ensuite rincé à l'eau du robinet pendant 24h, puis déshydraté durant 5 à 10 minutes dans une série de bains d'éthanol . Nous employons successivement des solutions d'éthanol à 30%, 50%, 70%, 80%, 95% et 100%. Après déshydratation le matériel est inclus dans du Paraplast (Brunswick laboratory). On réalise ensuite au microtome des sections longitudinales et transversales d'environ 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Après avoir été déparaffinées par chauffage modéré et réhydratées, elles sont colorées à l'hématoxyline de Régaud ou au Paragon (Lison 1960). les lames sont ensuite déshydratées, par traitement à l'alcool et au toluène avant d'être montées dans le baume du Canada. Les coupes sont observées au photomicroscope Wild M 400 et au microscope photonique Nikon Labophot.

#### 2.5.2. Microscope électronique à transmission

Des coupes ultrafines sont réalisées après fixation des nodules pendant 4h dans du glutaraldéhyde en solution à 4% dans un tampon cacodylate de sodium à pH 7 (Sabatini et al., 1963).

Les échantillons sont ensuite fixés pendant 4h par le tétroxyde d'osmium en solution à 1% dans un tampon cacodylate de sodium. Le matériel est inclus dans l'Epon. Les coupes ultrafines sont observées au microscope électronique Siemens Elmiskop 101 après contraste par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb (Reynolds, 1963).

### 3. RESULTATS

#### 3.1. Effet de diverses sources d'azote combiné sur la fixation d'azote par S. rostrata en culture hydroponique

##### 3.1.1. Effet de $\text{NH}_4\text{NO}_3$

##### - Estimation de la consommation d'azote par Sesbania rostrata

- Après l'inoculation des tiges et des racines à 4 semaines, le milieu de culture des plantes est renouvelé tous les jours. Un prélèvement est effectué sur le milieu restant avant chaque renouvellement pour doser l'azote. L'azote ammoniacal est dosé par le réactif de Nessler, et l'azote nitrique par l'acide 2-4 disulphonique (Jackson, 1958).

Les résultats figurant dans les tableaux 10 et 11 et la figure 10 montrent l'évolution de la consommation d'azote par S. rostrata en culture hydroponique en présence des différentes concentrations d'azote combiné ( 0 ; 1,5 ; 3,0 ; 6,0 ; 10mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), soit l'équivalent de : 0 ; 1.5 ; 3.0 ; 6.0 ; 20 mM-N.

Dans le tableau 10, sont figurées les quantités d'azote apportées au cours de renouvellements successifs du milieu nutritif ainsi que les quantités d'azote consommées par S. rostrata. Chaque chiffre représente le cumul des quantités d'azote apportées ou consommées : 5, 10, 15, 20 jours après l'inoculation. Les pourcentages d'utilisation de l'azote correspondants ont été figurés dans le tableau 11.

Tableau 10. Estimation de la consommation d'azote par *S. rostrata* pendant 20 jours à compter du jour de l'inoculation.  
(L'inoculation des tiges et des racines a eu lieu au 28ème jour).

Jours après inoculation	Concentration d'azote ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )							
	1,5mM		3mM		6mM		10mM	
	*N apporté (mg)	**N utilisé (mg)	N apporté (mg)	N utilisé (mg)	N apporté (mg)	N utilisé (mg)	N apporté (mg)	N utilisé (mg)
0 - 5	8,6	8,6	17,1	15,3	34,2	19,2	57,1	38,4
5 - 10	17,1	17,1	34,1	27,3	68,5	36,2	114,2	62,6
10 - 15	27,2	27,7	54,4	39,3	108,8	50,6	181,4	83,5
15 - 20	37,2	37,2	74,5	51,2	149,8	67,7	248,6	97,9

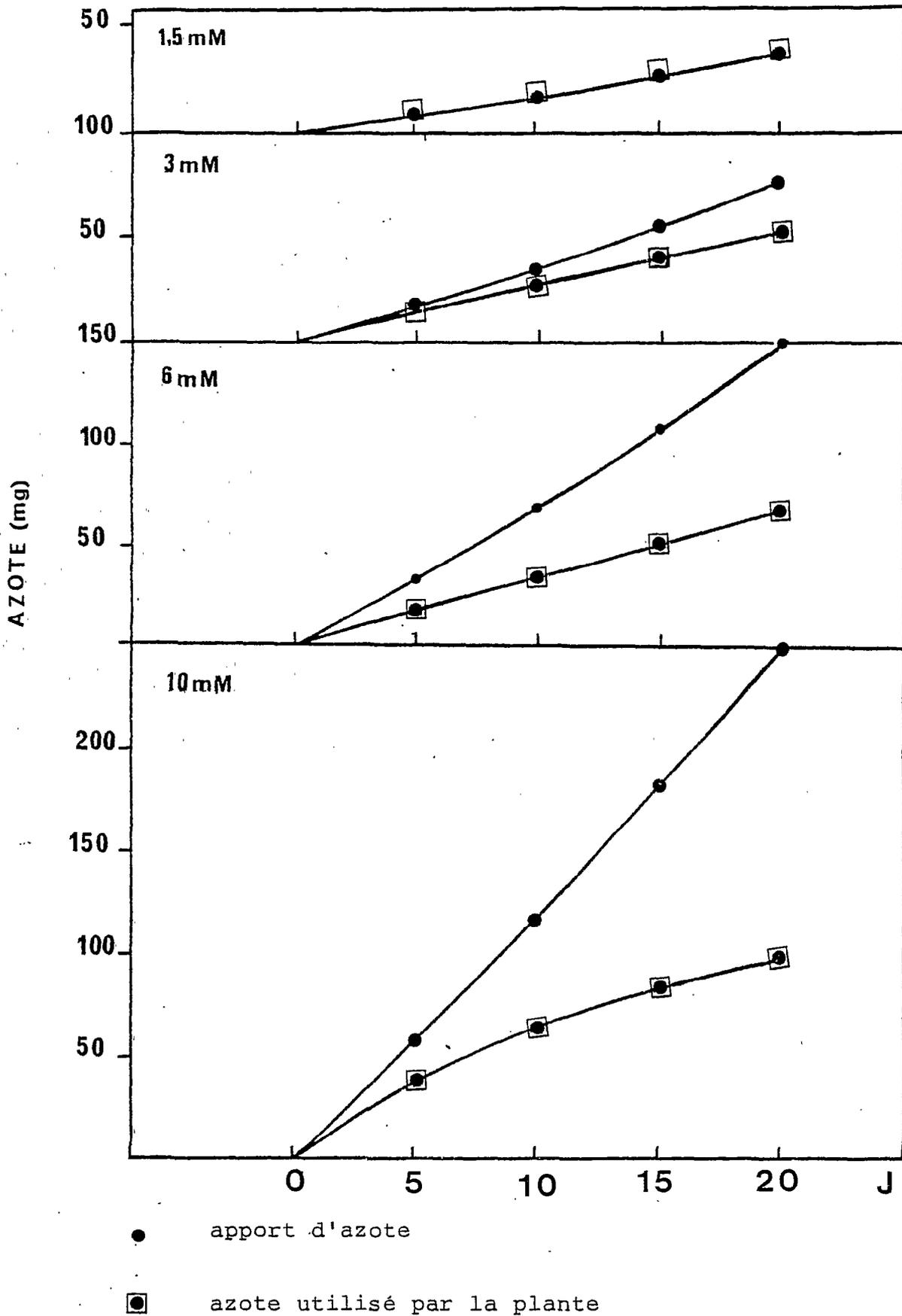
\* Quantité apportée en 5, 10, 15 et 20 jours.

\*\* Quantité d'azote utilisé en 5, 10, 15 et 20 jours.

Tableau 11. Evolution de l'utilisation de l'azote durant 20 jours chez *S. rostrata* cultivées en tubes en présence de différentes doses d'azote combiné ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )

Jours après inoculation	% Moyen d'utilisation d'azote ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )			
	1,5mM	3mM	6mM	10mM
0 - 5	100%	89%	56%	67%
5 - 10	100%	71%	50%	45%
10 - 15	100%	59%	36%	31%
15 - 20	100%	59%	42%	21%

Fig. 10 : Evolution de l'utilisation de l'azote durant 20 jours chez *S. rostrata* cultivé en tube en présence de différentes concentrations d'azote combiné ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) en culture hydroponique.



Ces résultats montrent qu'avec une concentration de 1,5 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , la totalité de l'azote apporté entre deux renouvellements est totalement consommé par S. rostrata (environ 8,6 mg-N en 5 jours soit 1,72 mg-N/jour en moyenne; tableau 10). Les taux de consommation d'azote semblent varier selon les quantités d'azote apportées. Toutefois, on observe une stabilisation de la consommation d'azote avec 3mM et 6mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  au cours la dernière période de l'expérience (tableau 11 ; fig. 10). Par contre avec 10 mM on observe une baisse du taux de consommation qui passe de 67% à 21% (tableau 11), cette variation peut être associée à la présence d'un système racinaire peu développé.

Nous n'avons pas observé de différence significative entre les quantités d'azote consommées par la plante, sous forme nitrrique ou ammoniacale

Le développement rapide de S. rostrata entraîne une forte consommation d'azote. C'est pourquoi l'effet inhibiteur exercé par l'azote combiné peut être sous estimé dans certains cas.

- Effet de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  sur la nodulation et l'activité réductrice d'acétylène

Les résultats obtenus (tableau 12) montrent que les plantes cultivées en présence de 1,5 et 3,0 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ont un poids sec supérieur au témoin sans azote. Par contre en présence de 6,0mM et 10 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , on constate une diminution du poids sec des plantes qui peut être associé à la diminution du taux de consommation observé ci-dessus.

L'azote combiné exerce un effet inhibiteur très marqué sur l'activité réductrice d'acétylène (ARA) de nodules caulinares

Tableau : 12. Influence de l'azote combiné  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  sur la nodulation et l'activité réductrice d'acétylène de S. rostrata en culture hydroponique.

Concentration $\text{NH}_4\text{NO}_3$ (mM)	P.S de plante (g/pl <sup>-1</sup> )	*P.S de nodules (g/pl <sup>-1</sup> )		Nombre de nodules		ARA ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ pl}^{-1}$ )		Activité spécifique ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ g nod}^{-1}$ )	
		**T	***R	T	R	T	R	T	R
		0	1,1 a	0,036 b	0,048 c	62 bc	62 c	3,37 d	2,16 c
1,5	1,96 d	0,051 c	0,036 b	77 c	32 b	2,85 c	0,78 b	58,39 c	41,80 b
3,0	1,96 d	0,033 b	-	49 ab	-	1,52 b	-	45,00 b	-
6,0	1,73 c	0,008 a	-	41 a	-	0,14 a	-	18,63 a	-
1.0	1,58 b	0,003 a	-	37 a	-	0,02 a	-	6,44 a	-

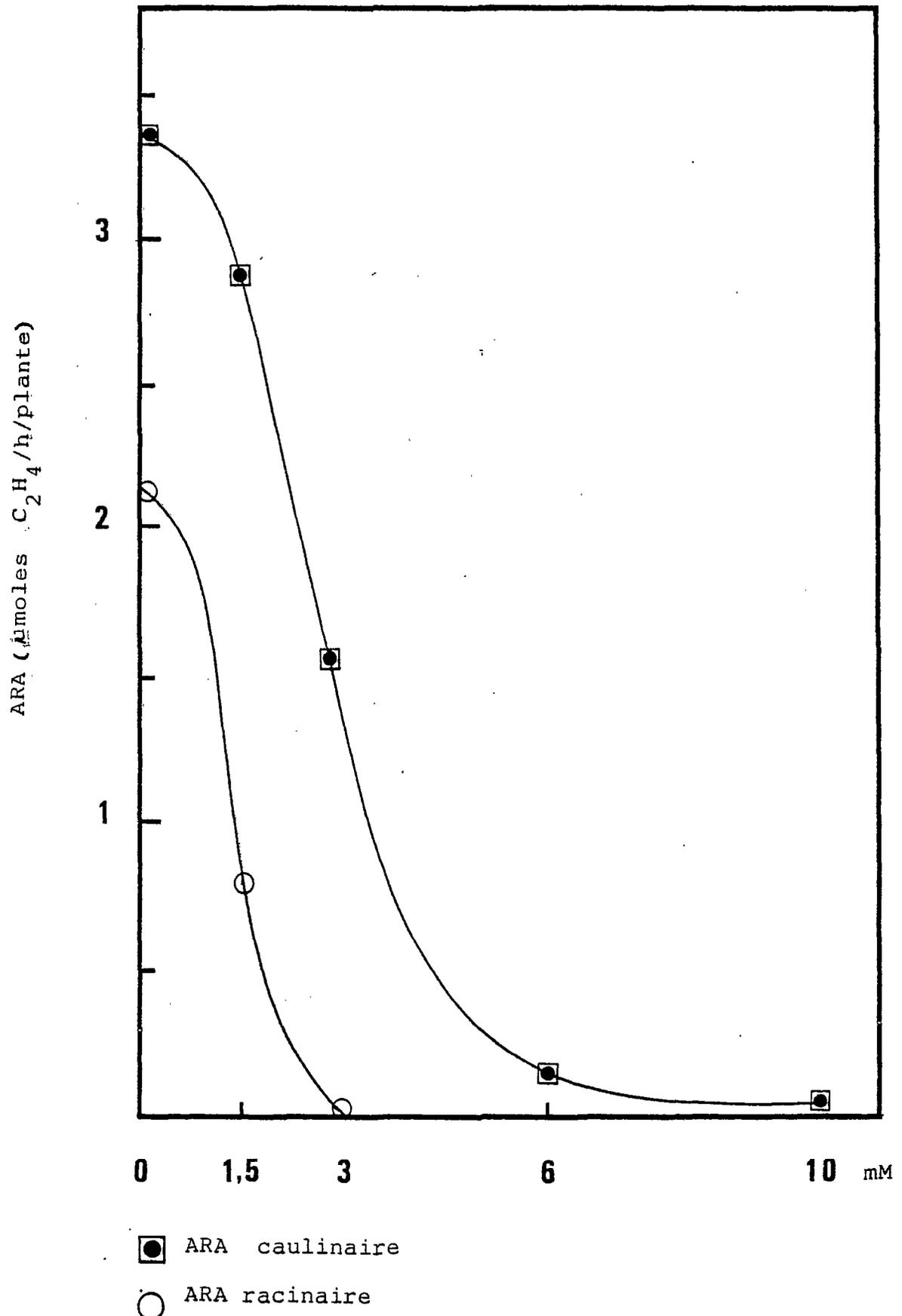
\* P.S = poids sec

\*\* T = tige

\*\*\* R = racine

Dans chaque colonne les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05) (Test de Duncan, 1955).

Fig. 11. Influence de l'azote combiné  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  sur l'activité réductrice d'acétylène (ARA) de nodules caulinaires et racinaires de S. rostrata en culture hydroponique



par rapport aux plantes témoins cultivées sans azote (tableau 12, fig.11). Les taux d'inhibition sont de 15%, 55%, 95%, et 100% respectivement avec 1,5 ; 3,0 ; 6,0 et 10 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (tableau 21). Ces résultats sont donc très différents de ceux de Dreyfus et Dommergues (1980) qui ont même observé une stimulation de l'ARA avec 3mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Un taux élevé de la consommation d'azote et une fréquence de renouvellement du milieu insuffisante expliquent probablement la " non-inhibition " observée dans ce cas.

L'ARA caulinaire est pratiquement nulle avec 6mM et 10 mM. Cependant à ces concentrations on observe des nodules caulinaires de très petite taille.

L'ARA racinaire est encore plus affecté par l'azote combiné que l'ARA caulinaire ; en présence de 1,5 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  l'ARA racinaire et caulinaire sont respectivement de 0,78 et 2,85  $\mu\text{moles}/\text{C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$ . La nodulation racinaire est totalement inhibée par 3mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

### 3.1.2. Effet de l'azote ammoniacal ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ou nitrique $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )

Dans les figures 12 et 13 nous avons représenté l'évolution de l'ARA en fonction de la concentration en azote combiné. Les tableaux 13 et 14 présentent les résultats obtenus trois semaines après l'inoculation.

Ces résultats montrent que lorsque l'azote est apporté sous forme ammoniacale ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), l'augmentation des concentrations en azote au dessus de 6mM-N se traduit par une diminution du poids sec des plantes qui passe de 1.67g/plante à 1.08 avec 12mM-N ce

Fig. 12 : Influence de l'azote ammoniacal ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) sur l'activité réductrice d'acétylène (ARA) de nodules caulinaires et racinaires de S. rostrata en culture hydroponique.

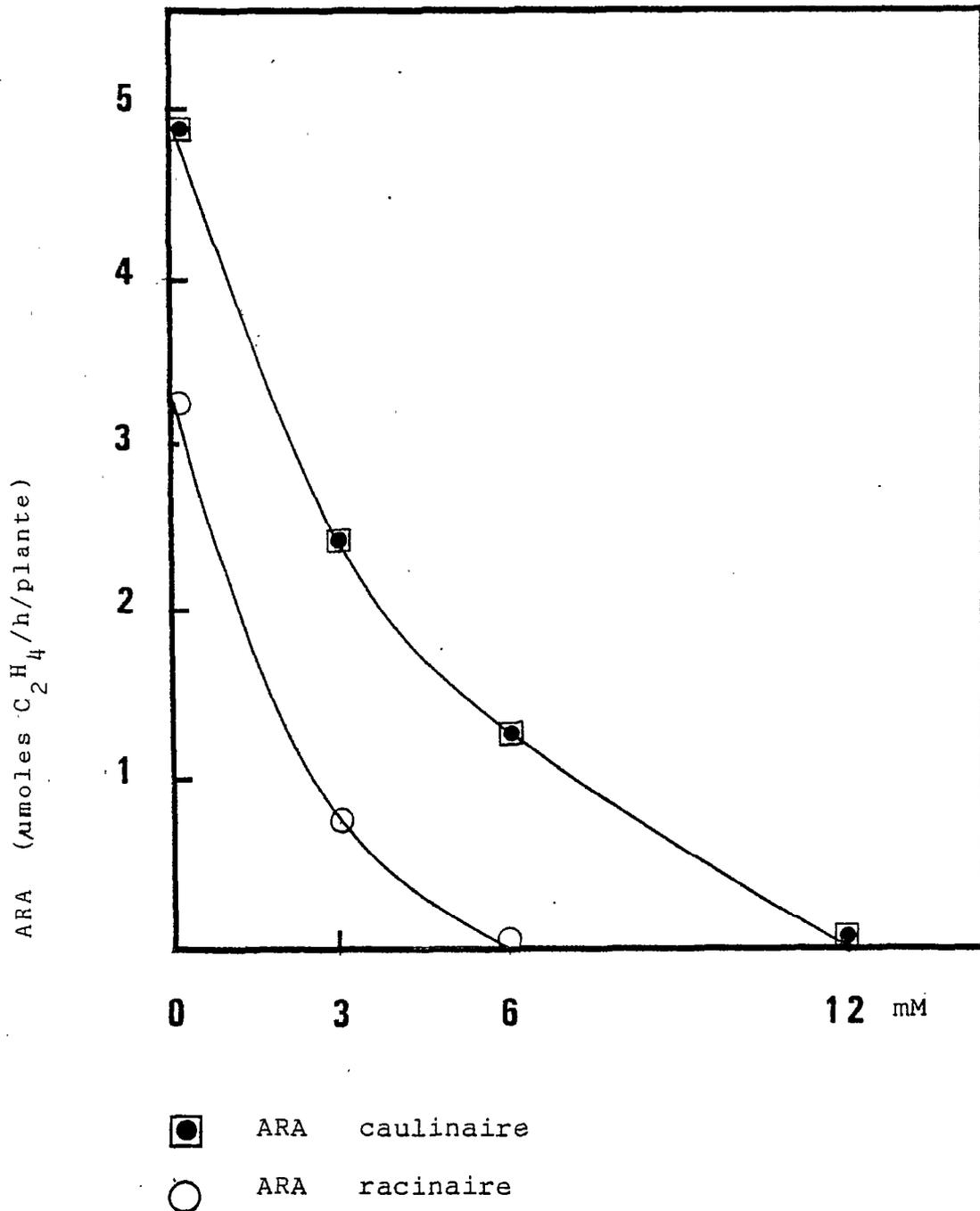


Fig. 13. Influence de l'azote nitrique  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  sur l'activité réductrice d'acétylène (ARA) de nodules caulinaires et racinaires de S. rostrata en culture hydroponique.

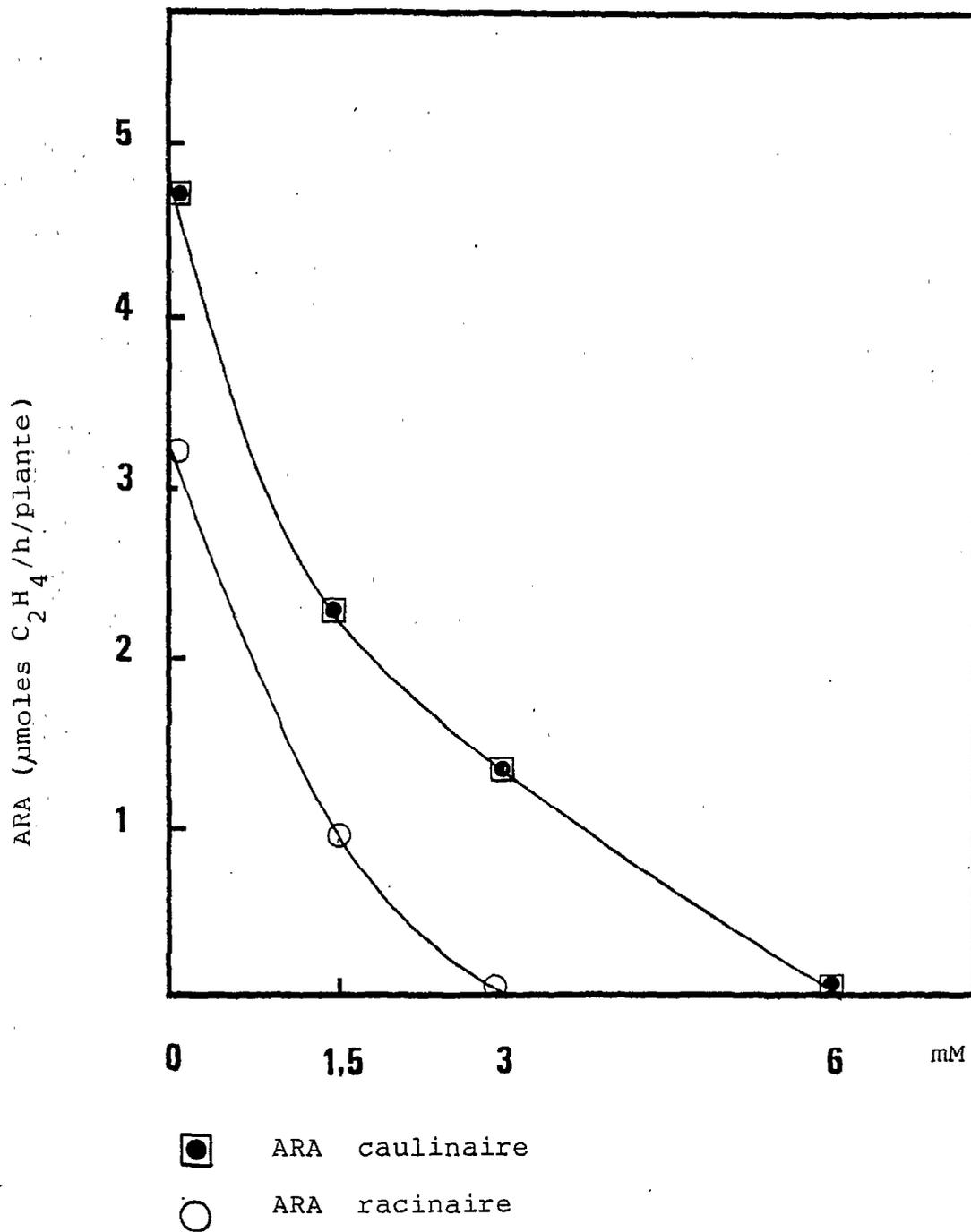


Tableau 13. Influence de l'azote ammoniacale ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) sur la nodulation et l'Activité Réductrice d'Acétylène de *S. rostrata* en culture hydroponique

Concentration $\text{NH}_4\text{Cl}$ (mM)	PS de plante (g/pl <sup>-1</sup> )	*PS de nodules (g/pl <sup>-1</sup> )		Nombre de nodules		ARA ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ pl}^{-1}$ )		Activité spécifique ( $\mu\text{moles h}^{-1} \cdot \text{g nod}^{-1}$ )	
		**T	***R	T	R	T	R	T	R
		0	0,89 a	0,029 c	0,035 c	28 c	78 c	4,96 d	3,43 c
3	1,47 c	0,028 bc	0,018 b	25 bc	25 b	2,53 c	0,83 b	90,0 c	46,0 b
6	1,67 d	0,026 b	-	24 b	-	1,31 b	-	50,3 b	-
12	1,08 b	-	-	-	-	-	-	-	-

\* P.S = poids sec

\*\* T = tige

\*\*\* R = racine

Dans chaque colonne les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05) (Test de Duncan, 1955).

Tableau: 14. Influence de l'azote nitrique ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) sur la nodulation et l'Activité Réductrice d'Acétylène de S. rostrata en culture hydroponique.

Concentration de $\text{NH}_4\text{NO}_3$ (mM)	PS. de plante (g pl <sup>-1</sup> )	*P.S de nodules (g pl <sup>-1</sup> )		Nombre de nodules		ARA ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ pl}^{-1}$ )		Activité spécifique ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \cdot \text{g nod.}^{-1}$ )	
		**T	***R	T	R	T	R	T	R
		0	0,89 a	0,029 c	0,035 c	24 b	78 c	4,96 d	3,43 c
1,5	1,6 b	0,023 b	0,019 b	34 c	35 b	2,31 c	1,0 b	100,43 c	52,6 b
3	1,62 b	0,026 bc	-	26 bc	-	1,37 b	-	52,69 b	-
6	1,9 c	-	-	-	-	-	-	-	-

\* P.S : poids sec

\*\* T = tige

\*\*\* R = racine

Dans chaque colonne les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05) (Test de Duncan, 1955).

qui équivaut à 12mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (tableau 13).

Par contre lorsque les mêmes quantités d'azote sont apportées sous la forme nitrique ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), on constate une augmentation du poids sec des plantes, il passe de 1.6g/plante avec 6mM-N à 1.9g/plante avec 12 mM-N ; ces quantités d'azote étant respectivement équivalentes à 3mM et 6mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . (tableau 14).

Ainsi donc l'azote nitrique semble exercer une stimulation de la croissance de S. rostrata.

L'effet dépressif exercé par l'azote ammoniacal pourrait provenir de l'acidification du milieu de culture que l'on observe généralement avec cette source d'azote (Rys et Phung, 1984).

Le poids sec des nodules racinaires est plus affecté par l'azote combiné que celui des nodules caulinaires. En présence de 1,5mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ou de 3mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , le poids sec des nodules racinaires diminue de 50%; par contre celui des nodules caulinaires varie peu par rapport aux témoins (tableau 13 et 14).

Le taux d'inhibition de l'ARA racinaire est d'environ 70% avec 3mM-N apportés sous forme ammoniacale ou nitrique par contre au niveau caulinaire on observe un taux d'inhibition plus bas (environ 50% ; tableau 21).

### 3.1.3. Effet de l'azote ammoniacal $\text{NH}_4\text{Cl}$ ou nitrique $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sur l'activité de nodules caulinaires et racinaires matures

Les plantes sont cultivées en tubes à l'aide du dispositif de culture précédemment décrit (paragraphe 2.3.1) en présence de

1mM d'azote , les plantes sont inoculées à 4 semaines l'activité réductrice d'acétylène des nodules atteint son optimum, 3 semaines après. A ce stade, les bouchons qui obturent la partie inférieure des tubes sont retirés. Les tubes sont transférés dans des récipients d'une capacité de 4,5 litres contenant 4 litres de la solution nutritive décrite au paragraphe 2.2. (ce volume permet d'immerger une partie du système racinaire et éviter ainsi l'asphyxie de la majorité des nodules racinaires situés au niveau du collet).

L'expérience comporte trois traitements et 12 répétitions. Le traitement témoin reçoit 12 mM de  $\text{Ca Cl}_2$ , les deux autres traitements correspondent à un apport d'azote de 24 mM-N sous forme nitrique ( $12\text{mM Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ou ammoniacal ( $24\text{ mM NH}_4\text{Cl}$ ).

Les mesures de l'activité réductrice d'acétylène, et la détermination du poids sec des nodules, sont effectuées à intervalle régulier (2, 4, et 6 jours après le transfert des plantes sur milieu azoté). Chaque mesure est effectuée avec 4 plantes par traitement.

Dans les figures 14 et 15 nous avons représenté l'évolution de l'ARA spécifique des nodules caulinaires et racinaires. Les taux d'inhibition correspondants, calculés par rapport aux témoins ont été reportés dans les tableaux 15 et 16.

Le transfert des plantes sur milieu azoté contenant 24mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ou 12mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , se traduit par une diminution de l'ARA spécifique des nodules au bout de 6 jours. Cependant les taux d'inhibition restent relativement stables au niveau des nodules caulinaires, environ 60% avec  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et 46% avec  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

Tableau 15. Effet de l'azote combiné  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sur l'Activité Réductrice d'Acétylène spécifique de nodules caulinaires et racinaires matures de Sesbania rostrata

Nombre de jours après apport d'azote combiné	Nodules	ARAS $\text{C}_2\text{H}_4$ ( moles $\text{h}^{-1} \text{g nod.}^{-1} \text{pl}^{-1}$ )		% (*) Inhibition
		12 mM $\text{CaCl}_2$	24 mM $\text{NH}_4\text{Cl}$	
2	** T	182,0	73,0	60%
	*** R	146,0	57,0	60%
4	T	110,6	46,0	58%
	R	71,0	17,0	76%
6	T	102,0	39,0	61%
	R	69,0	2,3	96%

(\*) Le taux d'inhibition de l'Activité Réductrice d'Acétylène et calculée par rapport à l'activité des plantes témoins

\*\* T = tige

\*\*\* R = racine

Tableau: 16 Effet de l'azote combiné  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  sur l'Activité Réductrice d'Acétylène spécifique de nodules caulinaires et racinaires matures de Sesbania rostrata.

Nombre de jours après apport d'azote	Nodules	ARAS $\text{C}_2\text{H}_4$ ( $\mu\text{moles} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g nod.}^{-1} \cdot \text{pl}^{-1}$ )		% Inhibition (*)
		12 mM $\text{CaCl}_2$	12 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	
2	** T	189,2	100,0	47%
	*** R	151,0	55,0	63%
4	T	131,0	77,0	41%
	R	94,5	15,2	83%
6	T	124,0	67,0	46%
	R	76,0	10,3	86%

ARAS : Activité Réductrice d'Acétylène spécifique: ( $\mu\text{moles} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g nod.}^{-1} \cdot \text{pl}^{-1}$ )

(\*) : Le taux d'inhibition de l'Activité Réductrice d'Acétylène est calculée par rapport à l'activité des plantes témoins

\*\* T = tige

\*\*\* R = racine

Fig. 14 : Influence de l'azote combiné  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sur l'activité réductrice d'acétylène spécifique (ARAS) de nodules caulinaires et racinaires matures.

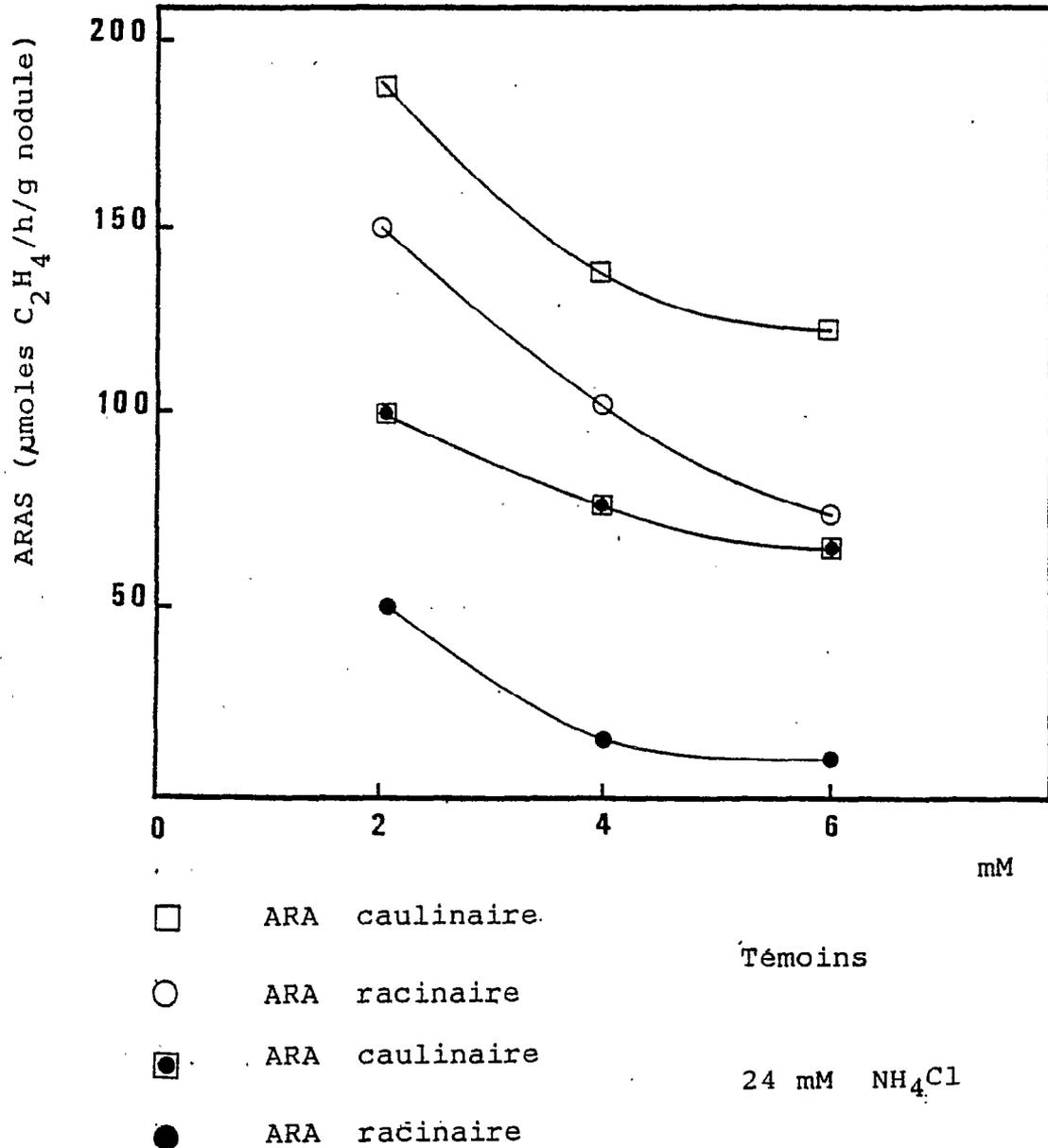
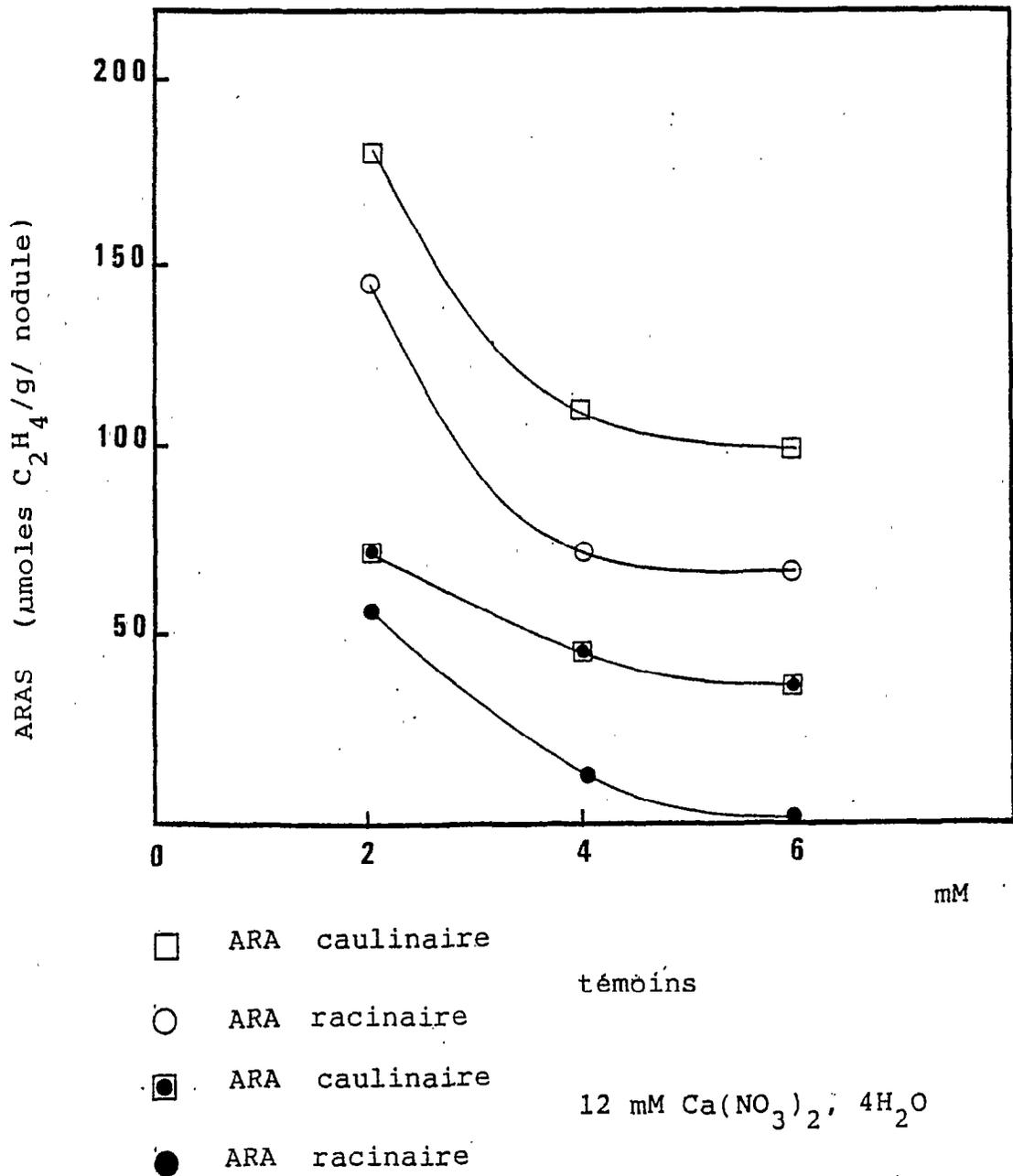


Fig. 15: Influence de l'azote combiné  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  sur l'activité réductrice d'acétylène spécifique de nodules caulinaires et racinaires matures.



4H<sub>2</sub>O . Au niveau des nodules racinaires l'ARA spécifique diminue rapidement entre le 2ème et le 6ème jour. Les taux d'inhibition correspondants passent de 60% à 96% avec NH<sub>4</sub>Cl et de 63% à 86% avec Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O .

### 3.2. Effet de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> sur la fixation d'azote par S. rostrata cultivé en vase de végétation avec apport continu de milieu nutritif

L'utilisation de ce dispositif de culture a permis d'obtenir une bonne croissance des plantes, leur hauteur est d'environ 1m.

Le poids sec des plantes augmente avec la concentration en NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (6,45 ; 7,45 ; 8,31 et 9,38 g/plante pour 0 ; 1,5 ; 3,0 et 6,0mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> respectivement). Contrairement aux expériences précédentes réalisées en culture hydroponique, avec 6,0 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> on n'observe pas d'effet dépressif sur le poids de matière sèche des plantes.

En présence de 1,5 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> , le poids sec des nodules caulinaires diminue de 25% et celui des nodules racinaires de 39% (tableau 17).

L'utilisation de ce dispositif de culture a permis d'obtenir une activité réductrice d'acétylène élevée au niveau des nodules racinaires, elle représente 45% de l'activité totale de la plante alors qu'avec S. rostrata cultivé sur sol inondé l'ARA racinaire ne représente que 4% de l'activité totale (cf. fig. 23-B; Rinaudo et Moudiongui, 1985). Ainsi donc grâce au système de culture utilisé, l'effet dépressif exercé par l'engorgement du sol sur l'ARA racinaire a été supprimé.

Tableau: 17. Influence de l'azote combiné  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  sur l'activité fixatrice et les paramètres liés au développement de *Sesbania rostrata* cultivé en vase de végétation avec apport continu de milieu nutritif.

Concentration de $\text{NH}_4\text{NO}_3$ (mM)	PS. de plante (g pl <sup>-1</sup> )	*P.S de nodules (g pl <sup>-1</sup> )		Nombre de nodules		ARA ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4\text{h}^{-1}\text{pl}^{-1}$ )		Activité spécifique ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4\text{h}^{-1}\cdot\text{g nod.}^{-1}$ )	
		**T	***R	T	R	T	R	T	R
		0	6,45 a	0,10 c	0,11 c	51 c	156 c	7,72 d	6,35 c
1,5	7,45 b	0,08 bc	0,07 b	52 c	84 b	2,76 c	1,15 b	36,8 c	17,0 b
3	8,31 c	0,06 b	-	43 b	-	1,15 b	-	19 b	-
6	9,38 d	-	-	-	-	-	-	-	-

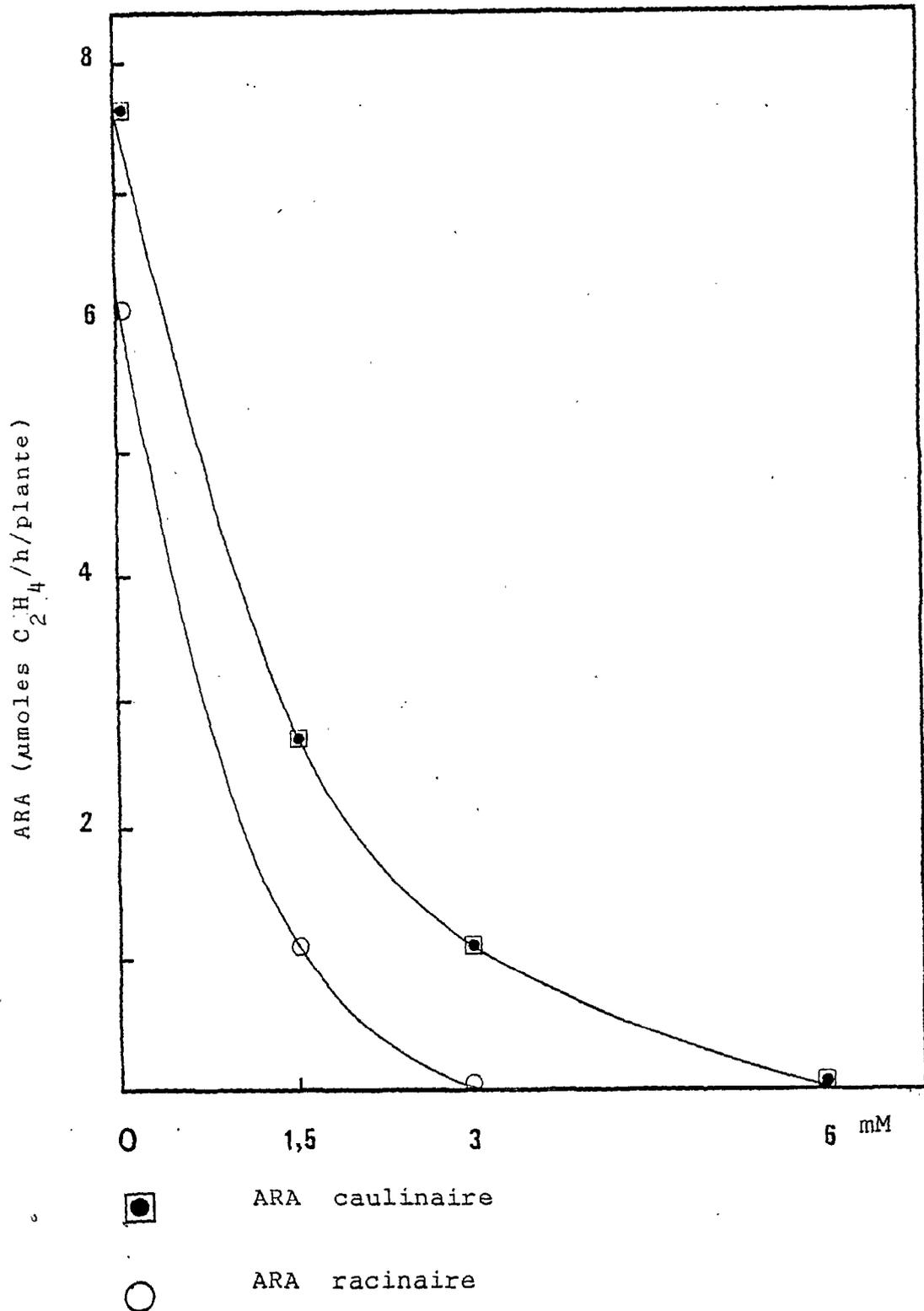
\* P.S. : poids sec

\*\* T = tige

\*\*\* R = racine

Dans chaque colonne les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05) (Test de Duncan, 1955).

Fig. 16. Influence de l'azote combiné  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  sur l'activité réductrice d'acétylène (ARA) de nodules caulinaires et racinaires de *S. rostrata* cultivé en vase de végétation avec apport continu de milieu neuf.



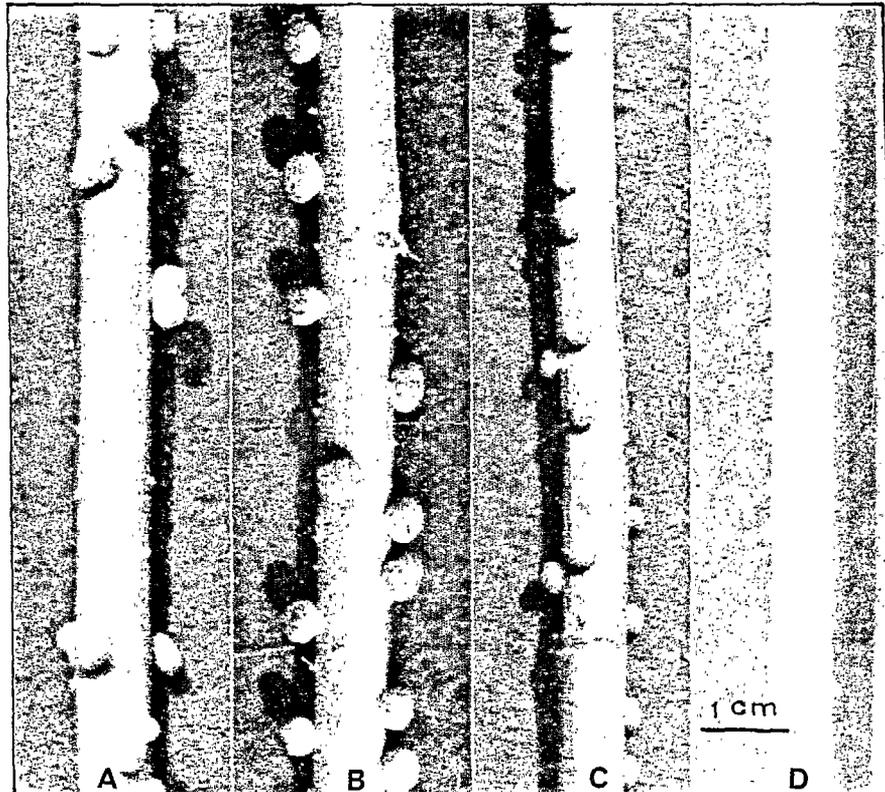


Fig. 17 : Effet de l'azote combiné sur la nodulation caulinaire de *S. rostrata* cultivé en vase de végétation en présence de différentes concentrations d'azote combiné ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )  
 A : 0mM-N ; B : 3mM-N ; C : 6mM-N ; D = 12 mM-N.

La nodulation racinaire est complètement inhibée avec 3mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . A cette concentration, on observe une diminution de la taille des nodules caulinaires (fig.17; Moudiongui et Rinaudo, 1987).

D'une manière générale l'effet inhibiteur de l'azote combiné sur l'ARA reste plus marqué au niveau racinaire qu'au niveau caulinaire (fig.16). Avec 1,5 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  les taux d'inhibition sont respectivement de 81 et 64% (tableau 21).

### 3.3.Effet de l'urée sur la fixation d'azote par *S. rostrata* cultivé sur sol en cylindre

Les résultats obtenus (tableaux 18 et 19) montrent que la période choisie pour l'apport de l'urée n'a que très peu d'influence sur l'ensemble des paramètres mesurés. L'ARA caulinaire n'est pas affectée, cependant on remarque qu'avec 150 Kg-N/ha l'ARA caulinaire et la teneur des plantes en azote sont élevées.

Ce résultat s'explique probablement par le fait qu'en raison de la nutrition azotée de la plante, la teneur en azote dans le sol diminue rapidement et n'exerce donc plus d'effet inhibiteur. Cette diminution de l'azote du sol pourrait également provenir des pertes d'ammoniac par volatilisation.

### 3.4.Observations microscopiques de coupes de nodules caulinaires développés en présence d'azote combiné $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou $\text{KNO}_3$

#### 3.4.1.Observation au microscope photonique

les figures 19 et 20 représentent des coupes de nodule cau-

Tableau 18. Effet de l'azote combiné sur la nodulation et l'activité réductrice d'acétylène le développement de la fixation caulinaire d'azote de *S. rostrata* cultivé sur sol avec apport d'urée au moment du semis.

*Apport N-Urée (kg/ha)	Hauteur (cm)	P.s de nodules (g/plante)	Activité Réductrice d'Acétylène de nodules caulinaires		Parties aériennes		
			Par plante ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1}$ )	Par g de nodule ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	Poids sec (g/plante)	Azote (%)	Azote total (mg/plante)
0	133 a	1,0 a	23,0 a	23,0 a	25,0 a	2,85 b	0,71 a
150	135 a	1,2 b	27,5 b	23,0 a	30,0 b	2,73 a	0,82 b
300	135 a	1,0 a	26,5 ab	26,5 b	30,0 b	2,71 a	0,81 b

\* Les plantes sont cultivées sur sol de Bel-Air dans des cylindres en PVC.

L'Urée est apportée en dose unique 4 semaines après le semis au moment de l'inoculation des tiges.

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05). (Test de Duncan, 1955).

Tableau :19. Effet de l'azote combiné sur la nodulation et l'activité réductrice d'acétylène de S. rostrata cultivé sur sol avec apport d'Urée au moment de l'inoculation.

*Apport N-urée (kg/ha)	Hauteur (cm)	P.S de nodules (g/plante)	Activité Réductrice d'Acétylène de nodules caulinaires		Parties aériennes		
			Par plante ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}$ )	Par g de nodule ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	Poids sec (g/plante)	Azote (%)	Azote total (mg/plante)
0	140 ab	1,0 ab	23,0 a	23,0 a	25,0 a	2,85 c	0,71 a
150	157 b	1,2 b	28,0 b	23,0 a	35,0 b	2,71 a	0,94 b
300	137 a	0,9 a	23,0 a	25,0 b	28,0 ab	2,73 b	0,76 ab

\*Les plantes sont cultivées sur sol de Bel-Air dans des cylindres de P.V.C. .

L'Urée est apportée en dose unique au semis.

Dans chaque colonne les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes

(P = 0,05) (Test de Duncan, 1955).

linaires développés pendant 20 jours en présence de différentes concentrations d'azote combiné ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ou  $\text{KNO}_3$ ).

Les nodules des plantes témoins sont bien développés : le tissu central (le méristème nodulaire) représente environ 38% du volume total du nodule (fig. 18-A). On observe au fort grossissement que les cellules du méristème nodulaire, sont de taille importante et dans leur grande majorité envahies par des bactéries (fig. 18-B).

Par contre lorsque les plantes se développent en présence d'azote combiné, l'augmentation de la concentration d'azote se traduit par une diminution de la taille des nodules et un développement moindre du tissu central ; il représente environ 25% avec 12 mM  $\text{KNO}_3$  (fig. 19-C) et 15% avec 6mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (soit de 12 mM-N) (fig. 20-C).

Les observations au fort grossissement mettent en évidence une diminution de la taille des cellules du tissu central ainsi qu'une diminution de la proportion des cellules envahies par les bactéries (fig. 19-D ; 19-E).

Les fortes concentrations de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  exercent un effet marqué sur la structure des nodules : on observe un fort décollement du cytoplasme des cellules infectées (fig. 20-D ; 20-E ; 20-F).

#### 3.4.2. Observations au microscope électronique

Les observations faites au microscope électronique confirment celles que nous avons effectuées au microscope photonique : en présence d'azote combiné, peu de cellules du tissu central sont envahies par les bactéries. Aux faibles concentrations 3mM

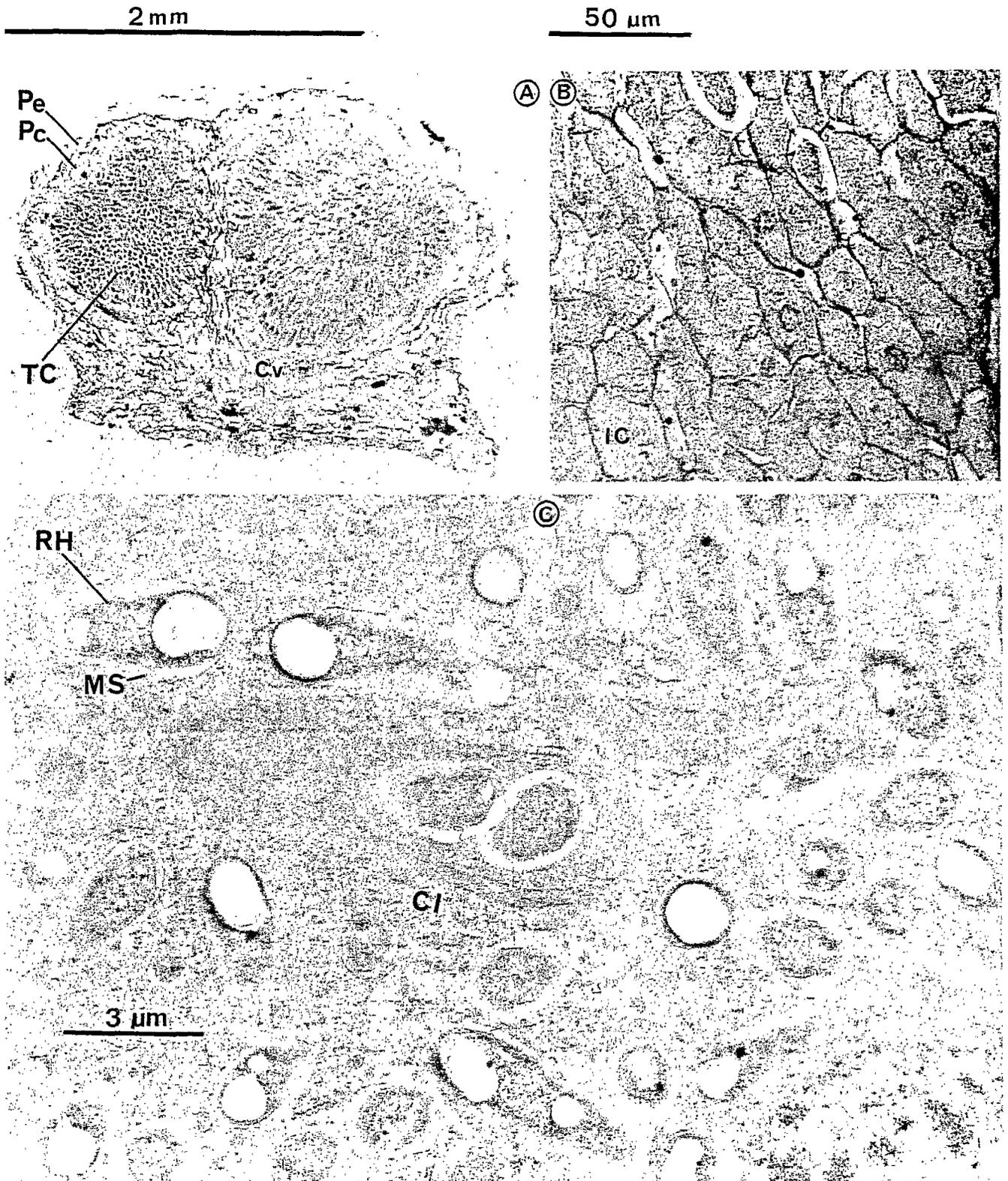


Fig. 18

Fig. 18 : A, B et C - Coupes d'un nodule caulinaire de S. rostrata développé en absence d'azote combiné.  
A. MPH. (Microscopie photonique), le tissu central (T.C.) bien développé, représente environ 40% du volume total du nodule x 32.  
B. MPH. Le cytoplasme des cellules du tissu central est totalement envahi par des Rhizobium. x 200.  
C. MET (Microscope électronique à transmission), on observe des Rhizobium entourés d'une membrane pér bactéroïde (MS). x 8000.

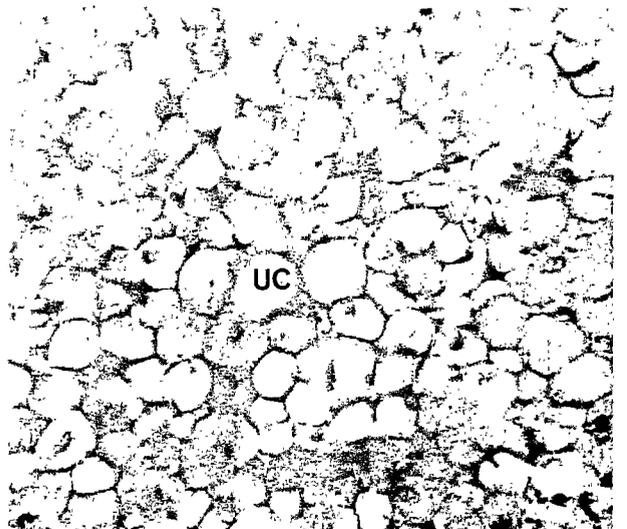
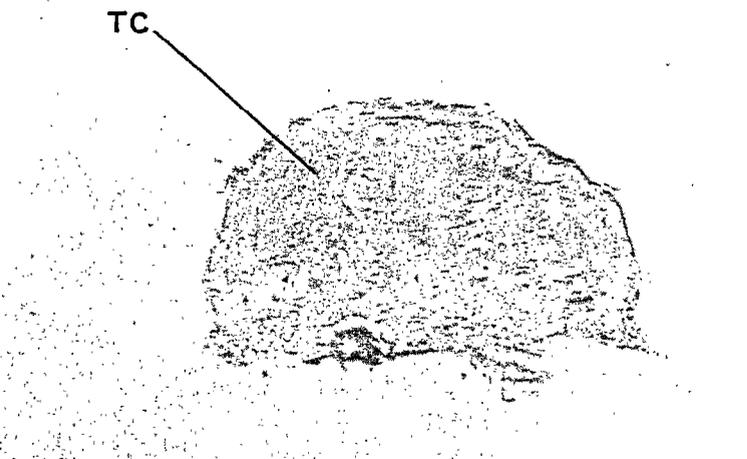
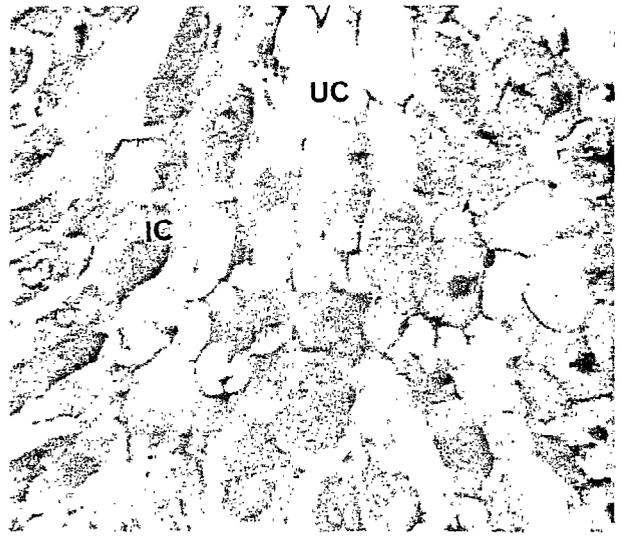
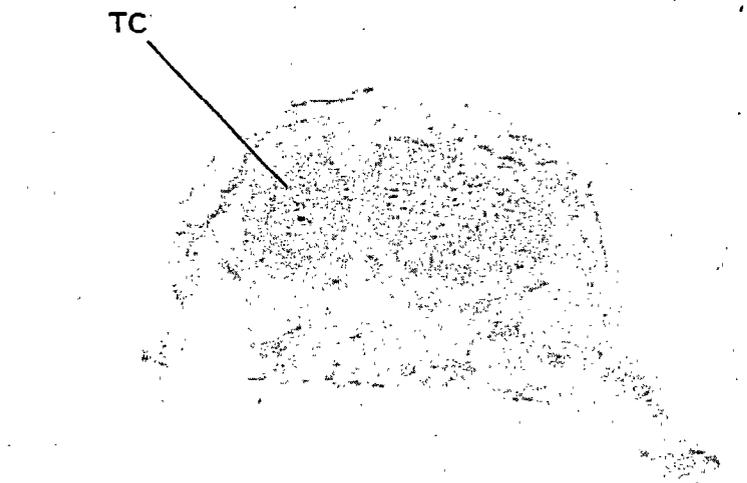
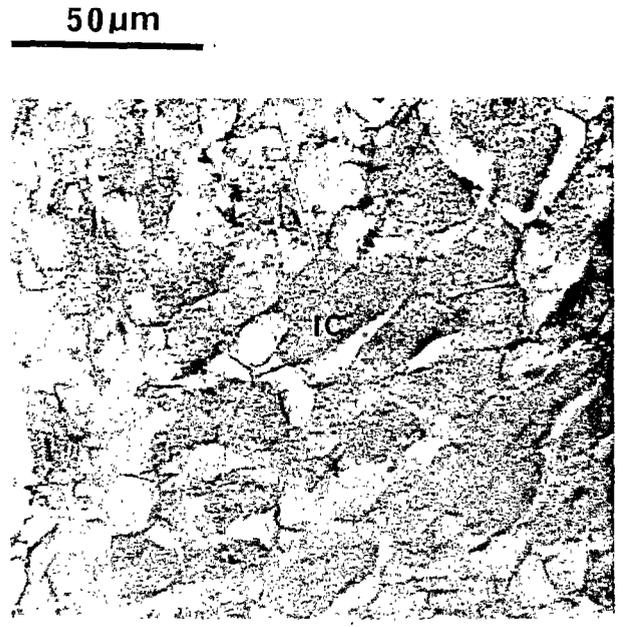
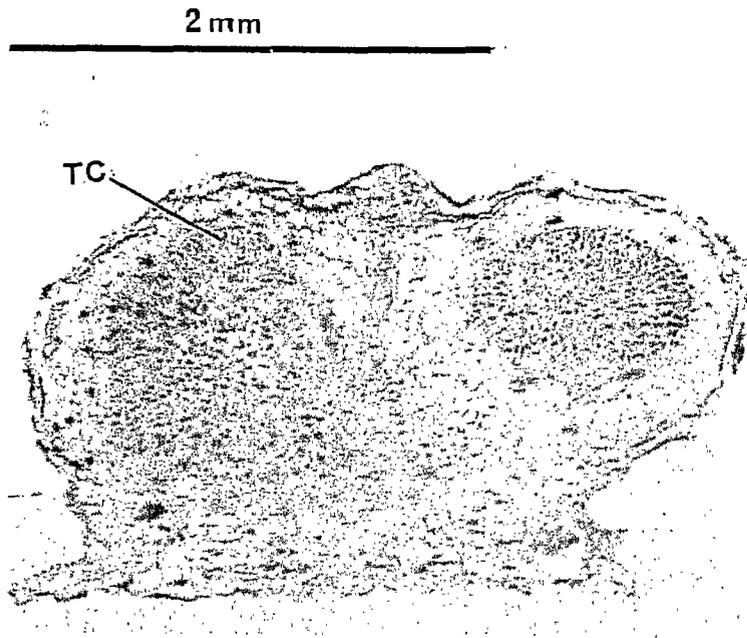


Fig. 19

Fig. 19 A, B, C, D, E et F - MPH: Coupes de nodules caulinaires de S. rostrata développés en présence de diverses concentrations d'azote apporté sous forme nitrique ( $KNO_3$ ). A et B ; 3mM - N A. le tissu central est moyennement développé, il représente environ 25% du volume total du nodule. x 32. B, toutes les cellules du tissu central ne sont pas envahies par les bactéries. x 200. C et D : 6 mM-N. C, on constate une diminution de la taille du nodule, le tissu central représente environ 20% du volume total du nodule. X 32. D, toutes les cellules du tissu central ne sont pas envahies par les bactéries. x 200. E et F : 12 mM. E, on observe une diminution de la taille du nodule, le tissu central clair par endroit présente un contour mal défini. x 32. F, les cellules du tissu central apparaissent très petites et peu infectées (UC).

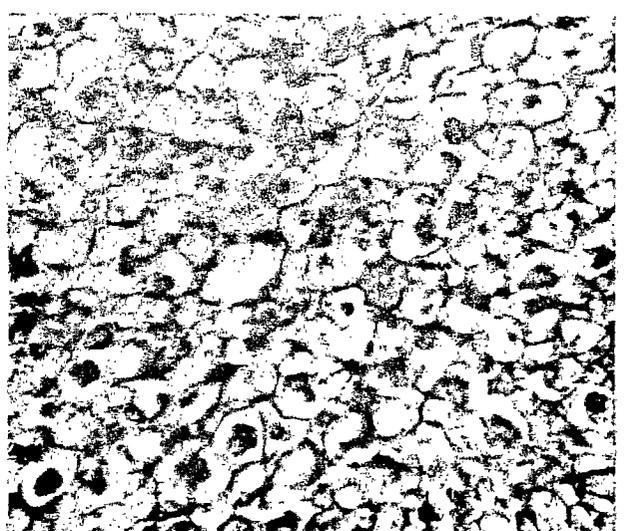
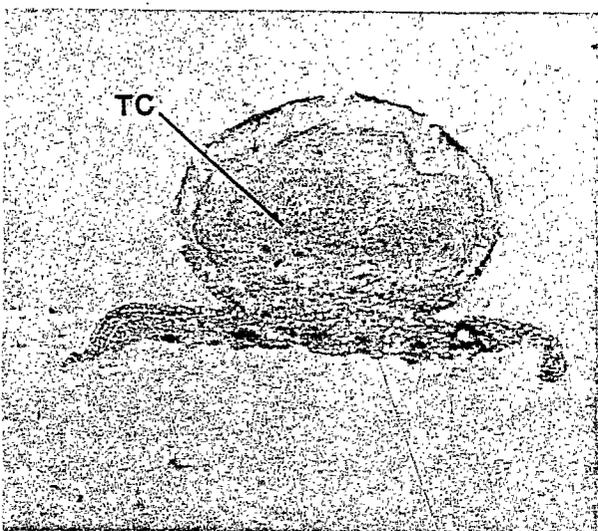
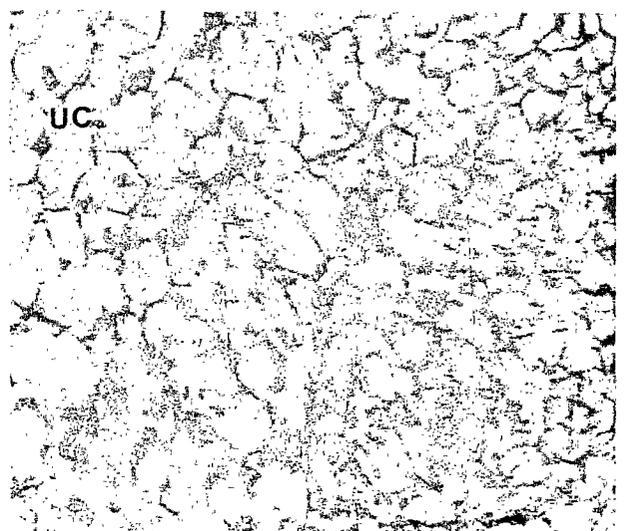
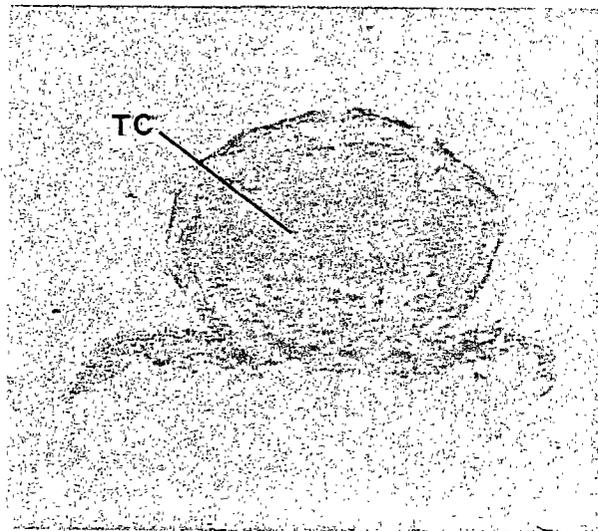
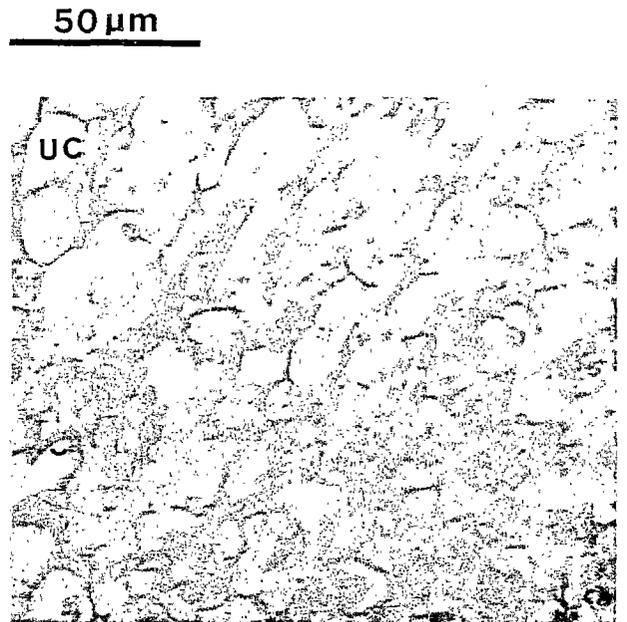
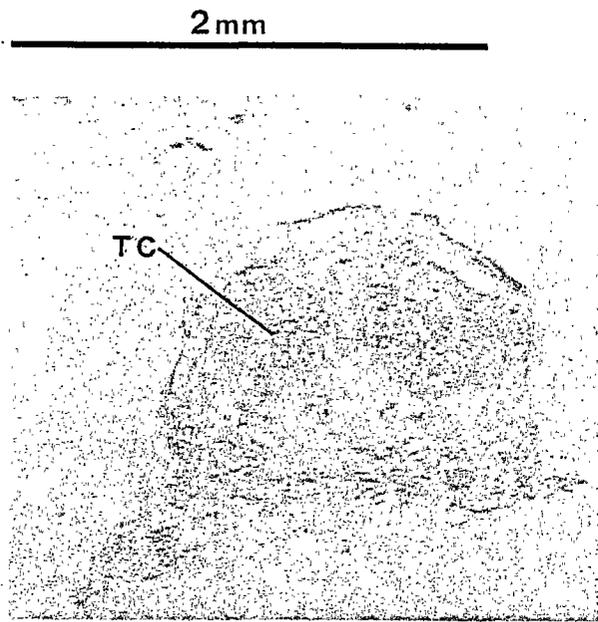


Fig. 20

Fig. 20 A, B, C, D, E et F MPH. - Coupe de nodules caulinaires de Sesbania rostrata de 20 jours développés en présence de diverses concentrations d'azote combiné apporté sous la forme ammoniacal. ( $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ). A et B : 3mM-N. A, le tissu central est moyennement développé il représente 20% environ du volume total du nodule. x 32. B, une proportion réduite des cellules du tissu central sont envahies par les Rhizobium. x 200. C et D : 6mM. C, on observe une diminution de la taille des nodules, le tissu central représente 16% du volume total du nodule. x 32. D, la majorité des cellules du tissu central pas envahies par les bactéries (U.C.). x 200 E et F : 12 mM-N E, le tissu central est réduit il représente 14% du volume total du nodule. x 32. F, on observe très peu de cellules du tissu central envahies par les bactéries.

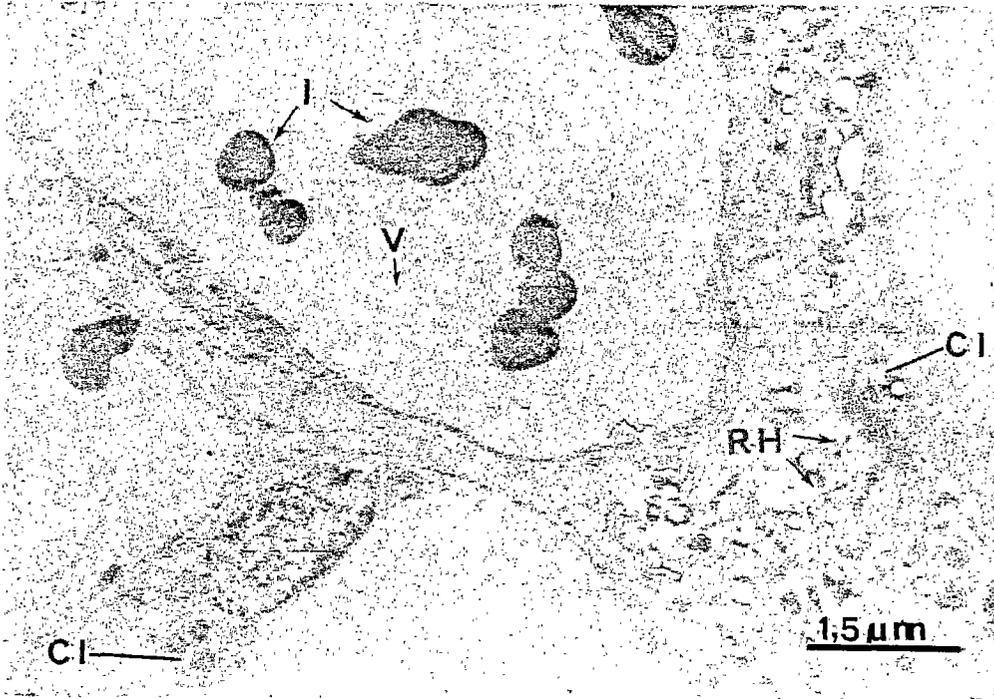


$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  les cellules du tissu central envahies par les Rhizobium ont des structures semblables au témoin (fig. 18-C). L'augmentation de la concentration en azote combiné se traduit par une diminution de la proportion de cellules infectées ; leur structure est désorganisée, on observe une détérioration partielle de la membrane pér bactéroïde, et du cytoplasme de la cellule (fig. 21-A et 21-B). Il est intéressant de noter que même en présence de fortes concentrations d'azote combiné équivalent à 12 mM-N, il y a formation de cordons d'infection intercellulaires puis intracellulaires (fig. 22-A ; 22-B). Cependant dans ces conditions expérimentales les Rhizobium ne sont pas libérés dans le cytoplasme des cellules du tissu central.

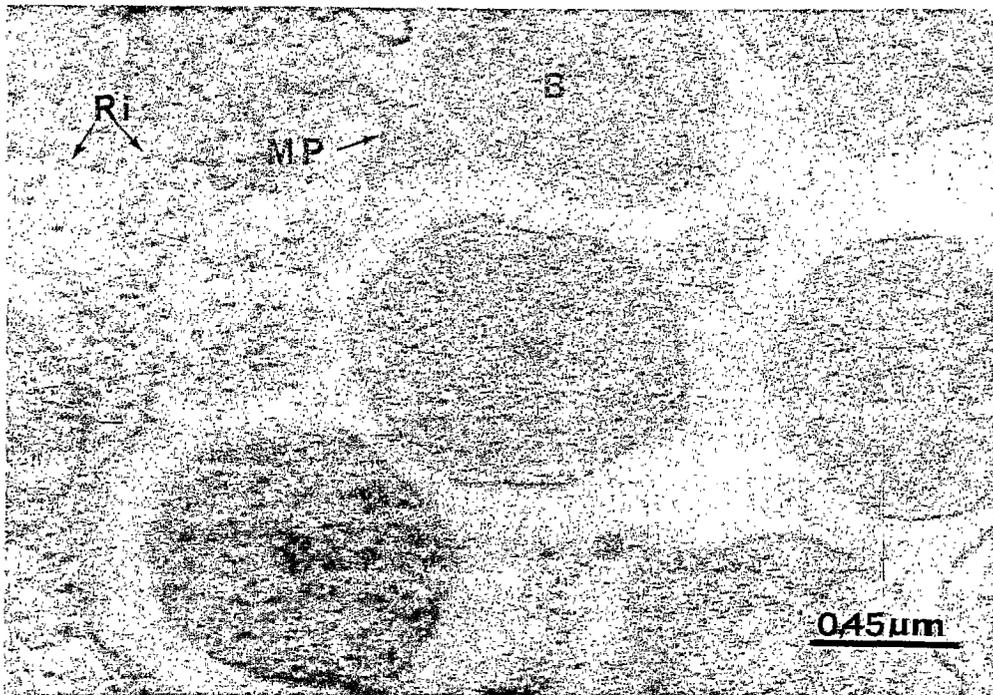
#### 3.4.3. Activité réductrice d'acétylène

L'activité des nodules est plus affectée par  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  que par  $\text{KNO}_3$ . Les taux d'inhibition mesurés à 3mM sont respectivement de 79% et 35% (tableau 20). Le taux d'inhibition est de 100% avec 12 mM-N pour les deux formes d'azote.

On constate que ces résultats sont en accord avec les observations faites en microscopie photonique et électronique. La diminution du volume du tissu central sous l'effet de l'azote combiné se traduit par une diminution de l'activité réductrice d'acétylène. La disparition des structures classiques de l'association symbiotique (membrane pér bactéroïde, bonne conservation du cytoplasme de la cellule hôte), est corrélée avec une absence d'ARA.



A



B

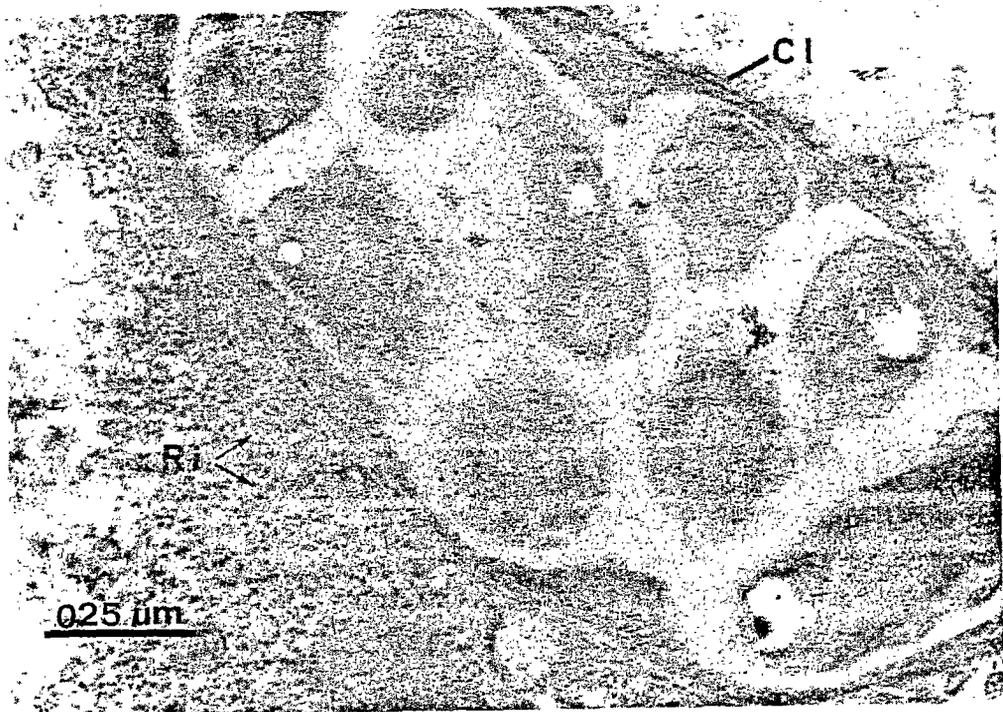
Fig. 21

Fig. 21 - A. MET (Microscope électronique à transmission).  
Ultrastructure d'un nodule caulinaire développés en  
présence de 6mM-N.  
On observe des cellules non infectées contenant des  
inclusions (I) denses aux électrons dans leur  
appareil vacuolaire (V). x 9000.

Fig 21 - B. MET. bactéroïdes (B) entouré d'une membrane  
péribactéroïde (MP) au contour mal défini x 168.000.



A



B

Fig. 22

Fig. 22 A et B. Ultrastructure de nodules caulinaires développés en présence 12mM-N on observe des cordons d'infection intracellulaires. Dans ces conditions expérimentales les bactéries ne sont pas libérées dans le cytoplasme des cellules.

Tableau : 20. Activité Réductrice d'Acétylène de nodules caulinaires de Sesbania rostrata développé en présence d'azote combiné  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ou  $\text{KNO}_3$ .

Concentrations (mM d'azote)	Nodules caulinaires (poids sec mg/plante)		Activité Réductrice d'Acétylène ( $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$ )	
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{KNO}_3$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{KNO}_3$
0	64,5 d	64,5 c	5,7 d	5,7 d
3	29,0 c	60,0 b	1,2 c	3,7 c
6	12,0 b	14,0 a	0,35 b	0,45 b
12	9,0 a	12,0 a	-	-

Dans chaque colonne les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $P = 0,05$ ) (Test de Duncan, 1955).

Tableau : 21. Taux d'inhibition de l'Activité Réductrice d'Acétylène (ARA) de nodules caulinaires et racinaires de *S. rostrata* développé en présence de différentes sources d'azote combiné.

Azote combiné	Azote* (mM)	% d'inhibition de l'ARA**	
		Tiges	Racines
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (T)	3	15	63
	6	55	100
	12	95	100
	20	100	100
NH <sub>4</sub> Cl (T)	3	49	75
	6	73	100
	12	100	100
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O(T)	3	53	70
	6	72	100
	12	100	100
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (V)	3	64	81
	6	85	100
	12	100	100

(V) = Culture en vase de végétation

(T) = Culture hydroponique en tube

\* : Les concentration en azote sont exprimées en mM,  
N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pour Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pour NH<sub>4</sub>Cl, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>  
et N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pour NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

\*\*\* : Le taux d'inhibition de l'ARA est calculé par rapport au témoin dépourvu d'azote.

#### 4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'effet de l'azote combiné sur la symbiose entre Rhizobium et S. rostrata a été étudié au moyen de différents dispositifs de culture de plantes.

L'estimation de la consommation d'azote en culture hydroponique (fig. 10, tableaux 10 et 11), montre qu'en dépit d'une fréquence élevée du renouvellement du milieu, l'azote apporté sous forme de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  à la concentration de 1,5 mM est consommé en totalité par la plante en 24 h. Par contre le dispositif de culture en vase de végétation assure le maintien de la concentration en azote par un apport continu de milieu nutritif (fig.7).

Les différentes sources d'azote utilisés :  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ; exercent toutes un effet inhibiteur sur l'ARA caulinaire et racinaire de S. rostrata.

En présence de 1.5mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  soit 3mM-N , les taux d'inhibition observés en culture hydroponique sont les suivants: 15% pour l'ARA caulinaire et 63% pour l'ARA racinaire. Par contre lorsque S. rostrata est cultivé en vase de végétation avec la même source d'azote , on observe des taux d'inhibition plus élevés avec 1.5mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ; 64% pour l'ARA caulinaire et 81% pour l'ARA racinaire (tableaux 17 et 21 ; fig. 16)

En présence de 6mM-N apporté sous forme de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ou  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , les taux d'inhibition de l'ARA caulinaire de S. rostrata en culture hydroponique sont respectivement de 55%, 72% et 73% Le taux d'inhibition observé lorsque S. rostrata est cultivé en vase de végétation en présence de la même concentration en azote est de 85% . Ces résultats montrent que lorsque S.

rostrata est cultivé en vase de végétation l'apport continu de milieu nutritif assure un apport constant d'azote qui se traduit par des taux d'inhibition plus élevés; alors qu'ils sont atténués en culture hydroponique (tableau 21).

Nous n'avons pas observé de stimulation de la nodulation et de l'activité fixatrice par de faibles concentrations en azote combiné, comme l'ont observé Dreyfus et Dommergues (1981) avec 3mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Compte tenu du taux élevé de la consommation d'azote par S. rostrata la fréquence insuffisante de renouvellement du milieu nutritif (une fois tous les deux jours) explique certainement les résultats obtenus par ces auteurs.

La formation et l'activité des nodules caulinaires sont donc bien affectées par la présence d'azote combiné, quoiqu'à un degré moindre que la nodulation et l'activité des nodules racinaires.

L'azote combiné a pour effet de réduire le nombre de nodules racinaires en présence de concentrations d'azote inférieures à 3mM-N. La nodulation est complètement inhibée en présence de 6mM-N ; cependant, à cette concentration, l'azote combiné n'a que très peu d'incidence sur la nodulation caulinaire. Une analogie peut être faite avec la technique de culture dite " split root " (Hinson, 1975 ; Carroll et Gresshoff, 1983). Elle consiste à diviser le système racinaire en deux parties. La nodulation est inhibée sur la partie du système racinaire se trouvant en contact direct avec l'azote combiné. Par contre la partie du système racinaire ne se trouvant pas en contact avec l'azote combiné possède des nodules mais leur activité est fortement inhibée. Ces

deux effets peuvent être observés simultanément avec S. rostrata cultivé en présence d'azote combiné : inhibition de la nodulation racinaire et inhibition de l'activité des nodules caulinaires.

Plusieurs auteurs ont montré que l'azote combiné pouvait réprimer la synthèse des lectines (Dazzo et Brill, 1978) et bloquer l'infection en empêchant la courbure des poils absorbants et la formation des cordons d'infection (Darbyshire, 1966 ; Munns, 1968, Truchet et Dazzo, 1982). Olsson et Rolfe (1985) ont mis en évidence l'intervention des poils absorbants dans le processus d'infection racinaire de S. rostrata. Il est donc permis de penser que c'est par son action sur les poils absorbants que l'azote combiné inhibe la nodulation racinaire de S. rostrata.

Les plantes fixatrices d'azote disposent de deux sources d'azote: l'azote du milieu dans lequel elles sont cultivées, et l'azote atmosphérique.

La fixation d'azote est directement dépendante de la photosynthèse (Hardy et al 1976 ; Schweitzer, 1980). D'une part les photosynthétats contrôlent la maturation et la dégénérescence des nodules (Ham et al., 1976, Paau et Cowles, 1981). D'autre part la réduction de l'azote moléculaire requiert une grande quantité d'énergie. En présence d'azote combiné on observe généralement une baisse de l'activité fixatrice des nodosités (Gibson et Pagan, 1977 ; Rigaud, 1981). Plusieurs auteurs ont expliqué cette baisse d'activité par la compétition entre l'assimilation

de l'azote minéral et la fixation d'azote vis à vis des photosynthétats disponibles (Gibson et al., 1977 Pate et al., 1979 ; Atkins et al., 1979 ; 1980).

Bethlenfalvay et Phillips, (1977) et Houwaard, (1978), ont montré que l'augmentation de la disponibilité des photosynthétats atténuait l'effet dépressif qu'exerçait l'azote combiné sur l'activité nitrogénase.

Chez S. rostrata, l'azote combiné (24 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) exerce un effet dépressif sur l'activité nitrogénase de nodules caulinaires et racinaires matures mais l'effet dépressif reste plus marqué au niveau racinaire : 96% contre 60% au niveau caulaire.

La nature chlorophyllienne du tissu cortical des nodules caulinaires de S. rostrata a été mis en évidence par Duhoux (1984). L'activité photosynthétique du tissu cortical pourrait accroître la disponibilité des photosynthétats au niveau de nodules caulinaires ce qui expliquerait une moins grande incidence de l'azote combiné sur l'activité nitrogénase des nodules caulinaires. Une étude de l'activité photosynthétique de S. rostrata par marquage au  $^{14}\text{C}$  pourrait permettre d'évaluer, la disponibilité des photosynthétats au niveau caulaire et racinaire d'une part et la proportion des photosynthétats provenant du tissu cortical des nodules caulinaires d'autre part.

Les observations faites au microscope photonique sur des coupes de nodules caulinaires de S. rostrata montrent que la proportion des cellules du méristème nodulaire envahies par les bactéries, diminue avec l'apport de fortes concentrations d'azote combiné. On observe dans tous les cas une initiation de la nodu-

lation caulinaire (du fait de la présence d'un méristème préexistant), mais le développement des nodules dépend de la concentration en azote combiné.

La diminution de l'ARA caulinaire en présence d'azote combiné pourrait s'expliquer non seulement par l'effet dépressif exercé sur l'activité de la nitrogénase, mais également par une diminution du nombre de bactéroïdes présents dans les cellules du méristème nodulaire (tableau 20; fig. 20-D et 20-E).

L'observation au microscope électronique de coupes de nodules caulinaires développés en présence de 6mM d'azote combiné, montre des bactéries denses aux électrons, la membrane pér bactéroïdienne est dégénéréscente, le cytoplasme de la cellule hôte apparaît désorganisé. Des observations analogues ont été faites par Truchet et Dazzo (1982) sur des coupes de nodules de Luzerne développés en présence d'azote combiné.

En présence de 12 mM-N on observe des cordons d'infection intracellulaires dans le tissu central ; l'absence de bactéroïdes dans ces cellules laisse supposer que la dernière étape du processus d'infection (libération des bactéries hors du cordon d'infection dans le cytoplasme) est bloquée par de fortes concentrations d'azote.

Quand Sesbania rostrata est cultivé sur sol, l'urée appliquée à des doses équivalentes à 150kg-N/ha ou 300kg-N/ha n'exerce pas d'effet inhibiteur sur l'ARA caulinaire (tableaux 19 et 20). En raison de la nutrition azotée de la plante et peut-être aussi des pertes d'azote par dénitrification ou volatilisation (selon Mughogho et al., 1986), ces pertes peuvent atteindre 60% sur sol

sableux en zone sahélienne). La diminution rapide de la teneur en azote du sol jusqu'à des valeurs compatibles avec l'activité fixatrice d'azote explique très probablement ces résultats.

Certaines légumineuses à nodulation caulinaire et racinaire du genre Aeschynomene peuvent développer des nodules sur la tige en présence d'azote combiné ; mais comme pour S. rostrata le développement de ces nodules et leur activité fixatrice dépendent des conditions de culture et des quantités d'azote utilisées. Il s'agit de A. indica (Yatazawa et Susilo, 1980 ; Legocki et al., 1983), d'A. scabra (Eaglesham et Szallay, 1983) et d'A. afraspera (Becker et al., 1986).

La capacité de noduler sur les tiges donne aux légumineuses à nodules caulinaires l'avantage d'assimiler à la fois l'azote atmosphérique et l'azote du sol.



CHAPITRE III

FIXATION D'AZOTE PAR *SESBANIA ROSTRATA* AU COURS DE CYCLES  
VEGETATIFS SUCCESSIFS INITIES A DIFFERENTES EPOQUES DE L'ANNEE



## 1. INTRODUCTION

La fixation biologique de l'azote est le résultat d'interactions complexes entre le Rhizobium et la plante hôte. L'efficacité de cette symbiose est susceptible de varier dans de grandes proportions en fonction de nombreux facteurs de l'environnement notamment des paramètres climatiques.

Le travail expérimental présenté dans ce chapitre a consisté à étudier l'évolution de la fixation de l'azote par Sesbania rostrata au cours de cycles végétatifs successifs initiés à différentes périodes de l'année.

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Dispositif expérimental

Différents semis ont été effectués au cours de l'année 1983. Les semis successifs et les cycles végétatifs correspondants ont été notés de S1 à S7.

Les plantes sont cultivées dans des cylindres en P.V.C. sur du sol de Bel-Air (dispositif décrit au chapitre II)

Le semis est effectué à raison de 8 graines par cylindre, le démariage est effectué une semaine après la levée de façon à ne laisser que 4 plantes par cylindre. Chaque cylindre reçoit 0,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Le sol est tout d'abord régulièrement humidifié, puis inondé et maintenu sous lame d'eau lorsque les plantes atteignent 10 à 15 cm de hauteur.

### 2.2. Inoculation des plantes

L'inoculation consiste en une pulvérisation des tiges par une culture liquide de la souche de Rhizobium ORS571. Les tiges sont inoculées 3 semaines après le semis puis à intervalles de 2 semaines (5 et 7 semaines après le semis)

### 2.3. Activité réductrice d'acétylène (ARA)

L'activité nitrogénase des nodules des plantes cultivées en tube ou sur sol est mesurée par la méthode de réduction de l'acétylène (Hardy et al., 1968).

La méthode de réduction de l'acétylène est surtout un outil d'une grande sensibilité pour l'étude qualitative de l'activité

nitrogénase. Dans la présente étude nous l'avons utilisée pour estimer l'activité fixatrice d'azote en fonction de l'âge de la plante au cours de cycles végétatifs initiés à différentes époques de l'année.

#### -Incubation sous acétylène et mesures

La partie des plantes portant des nodules (tige ou système racinaire) est enfermée de façon étanche dans un flacon serum de 570ml. On y introduit environ 11% d'acétylène en surpression puis on rétablit la pression atmosphérique dans le flacon et on incube à 30° C. Comme l'activité réductrice d'acétylène est linéaire pendant 1 heure, le prélèvement de gaz est effectué 30mn exactement après l'injection d'acétylène à l'aide d'un tube vacutainer (BD Mérieux) 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.

#### Remarques

1. Dans le cas des plantes de grande taille, les portions de tiges portant les nodules sont découpées en fragments d'environ 25 cm que l'on introduit dans des bouteilles en plastique de 1,5 litre.

2. L'activité fixatrice étant susceptible de variations importantes au cours de la journée, les mesures sont toujours effectuées à la même heure (11h).

Les analyses sont effectuées par chromatographie en phase gazeuse. Le chromatographe que nous avons utilisé est un " VARIAN AEROGRAPH " série 1400, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Il est équipé d'une colonne en acier inoxydable de 150 x 0,3 cm remplie de Spherosil X 013 075, 80-100 mesh (Girdel) imprégné de 10%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

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 rétention minimal.

Températures :	Injecteur	:	26°C
	Four colonne	:	60°C
	Détecteur	:	150°C
Débit	: Azote	:	40 ml/mn
	Hydrogène	:	30 ml/mn
	Air	:	360 ml/mn.

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

#### -Mode de calcul

La transformation des hauteurs de pics d'éthylène en nmoles  $\text{C}_2\text{H}_4$  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 sérum de 570 ml (dilution 1/1000). La concentration de cette dilution étalon est de  $\frac{10^6}{22400}$  nmoles  $\text{C}_2\text{H}_4$  /ml.

L'injection au chromatographe de 0,5 ml de cette dilution donne un pic de hauteur :

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

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

$$X = \frac{V}{h} \cdot \frac{10^6}{22400 \times A}$$

Dans le cas présent, le facteur d'atténuation  $A$  est 256 l'égalité précédente devient :

$$X = 0,174 \frac{V}{h}$$

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

#### 2.4. Dosage de l'azote total

Le matériel végétal à doser est préalablement séché 48h à l'étuve à 70°C et broyé. Le dosage est effectué par la méthode de Kjeldhal à l'aide d'un système de dosage Büchi.

##### -Minéralisation

La minéralisation est réalisée dans des tubes Büchi (50 à 100mg de matière sèche broyée par tube) en présence de 1ml de la solution de minéralisation suivante : 1,6g de sélénium amorphe, 1,6 sulfate de cuivre anhydre et 97 g de sulfate de sodium dissous dans 1 litre d'acide sulfurique concentré (Guiraud, 1984) Les tubes sont placés 40 minutes dans un digesteur (Büchi 430)

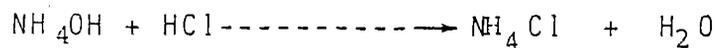
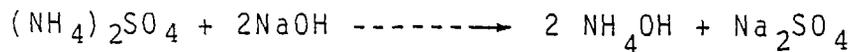
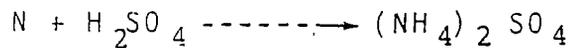
muni de calottes à chauffage infrarouge.

-Distillation et titration

Après refroidissement, le tube contenant le digestat est placé dans un distillateur (Büchi 322). Cet appareil permet d'effectuer automatiquement les opérations suivantes : adjonction d'eau et de soude au digestat, distillation puis aspiration des résidus de distillation. La titration est réalisée avec une solution d'acide chlorhydrique N/28 apportée par une burette à piston (Schott Geräte T100), contrôlée par un titrimètre à point final (Schott Geräte TR156).

-Calculs

Minéralisation, distillation et dosage correspondent aux réactions chimiques suivantes :



1 mole d'azote (soit 14 g) est neutralisée par 1 mole HCl.

On peut donc écrire 1ml (N/28) HCl correspond à 14mg N.

Compte tenue des petites quantités d'azote contenues dans les échantillons analysés, la solution d'acide utilisée pour le dosage est très diluée.

$$1ml \text{ HCl } \frac{N}{28} \text{ correspond à } \frac{14}{28} = 0,5mg-N$$

Soit  $p$  le poids sec de l'échantillon (en mg) et  $v$  le volume de la solution HCl utilisée ( en ml).

La teneur en azote de l'échantillon se calcule ainsi :

$$N\% = \frac{50 n}{P}$$

### 3. RESULTATS

#### 3.1. Variation de l'activité réductrice d'acétylène de nodules caulinaires et racinaires de S. rostrata en fonction de l'âge des plantes et des nodules

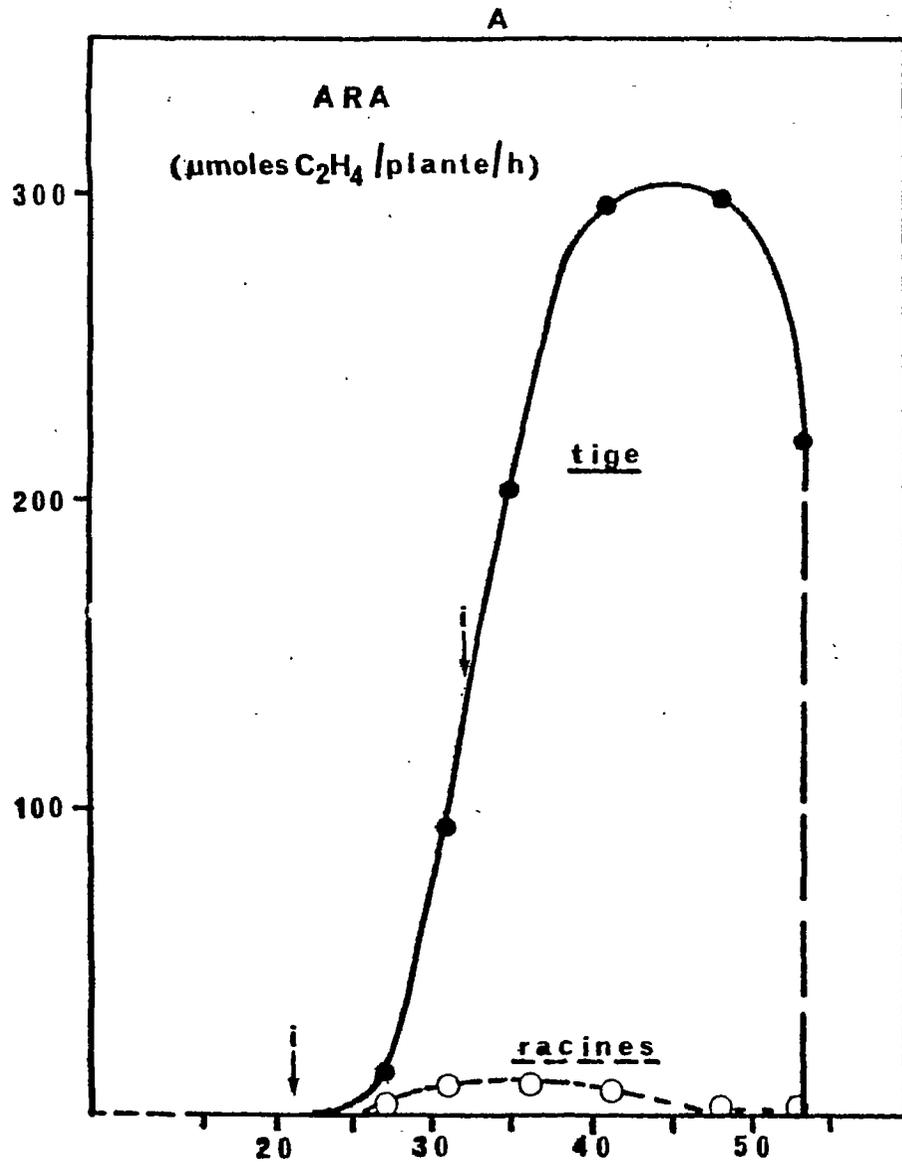
Les plantes ont été cultivées 53 jours dans le dispositif de culture précédemment décrit (cf paragraphe 2.1.) à raison de 4 plantes par cylindre. A compter du 15ème jour, le sol a été maintenu sous lame d'eau.

L'inoculation a été effectuée au 21ème et 31ème jour par pulvérisation des tiges avec une culture de la souche de Rhizobium ORS571. Les mesures de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) ont été effectuées à la fois sur les tiges et les racines. Les résultats obtenus (fig. 23-A) montrent que l'ARA des nodules caulinaires apparaît 7 jours environ après l'inoculation. Elle croît régulièrement pour atteindre une valeur maximale autour du 43ème jour après le semis. Quant à l'ARA racinaire elle évolue très peu.

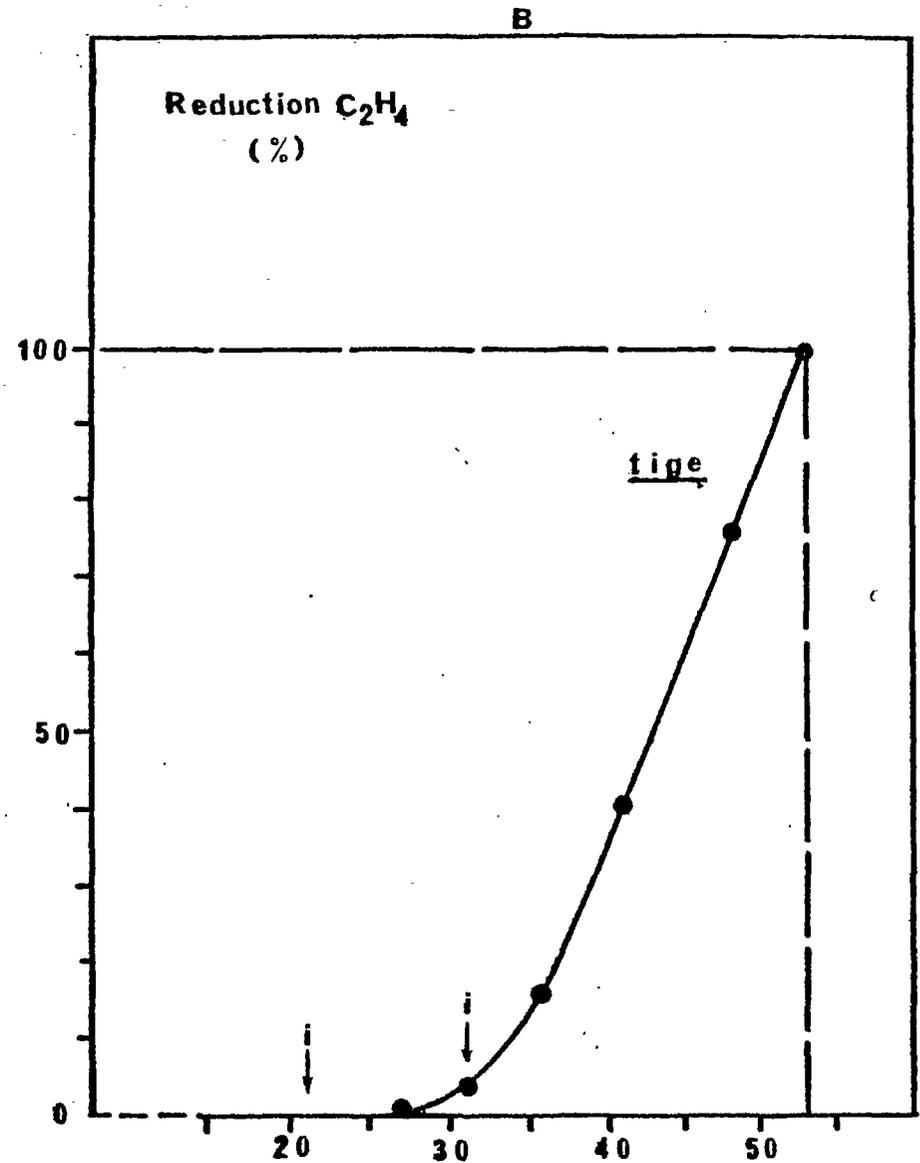
Dans les conditions d'hydromorphie permanente, ou les plantes sont cultivées, la fixation d'azote par S. rostrata, est due essentiellement aux nodules caulinaires environ 96% de l'activité totale, contre 4% aux nodules racinaires .

L'activité réductrice d'acétylène peut être considérée comme une estimation indirecte de l'activité fixatrice d'azote. L'une et l'autre évoluent probablement de la même manière au

Fig. 23



A : Cénitique de l'activité réductrice d'acétylène de nodules caulinaires et racinaires de S. rostrata  
i = inoculation



B : Evolution de l'activité réductrice d'acétylène de nodules caulinaires exprimée en (%) de l'activité total

cours du développement de la plante.

On peut donc par intégration de la courbe d'ARA caulinaire, obtenir une courbe cumulative permettant d'apprécier la fixation d'azote en fonction de l'âge de la plante. Ainsi dans le cas présent, on constate que le gain d'azote est à peu près linéaire entre le 35ème et le 53ème jour après le semis. Ainsi en 40 jours par exemple, S. rostrata n'aurait fixé que 35% environ de l'azote qu'elle peut fixer en 53 jours.

### 3.2. Evolution des paramètres climatiques

Afin d'étudier l'influence des facteurs climatiques sur le développement de Sesbania rostrata, des mesures de la durée du jour et de la température ont été effectuées tout au long de l'expérience (fig. 24).

#### 3.2.1. Durée du jour

La durée du jour varie à Dakar au cours de l'année de 11h15 à 13h. L'insolation est maximale entre Avril et Juillet, elle est minimale entre Octobre et Janvier (fig. 24).

#### - Effet de la photopériode sur la floraison de Sesbania rostrata

Dans la figure 25, nous avons porté la variation de l'insolation journalière au cours de l'année ainsi que la position des différents cycles végétatifs de S. rostrata. Les cycles végétatifs sont représentés par des traits horizontaux, les flèches indiquant le début de la floraison. On constate que la floraison intervient après un à deux mois environ pour les cycles S1, S5,

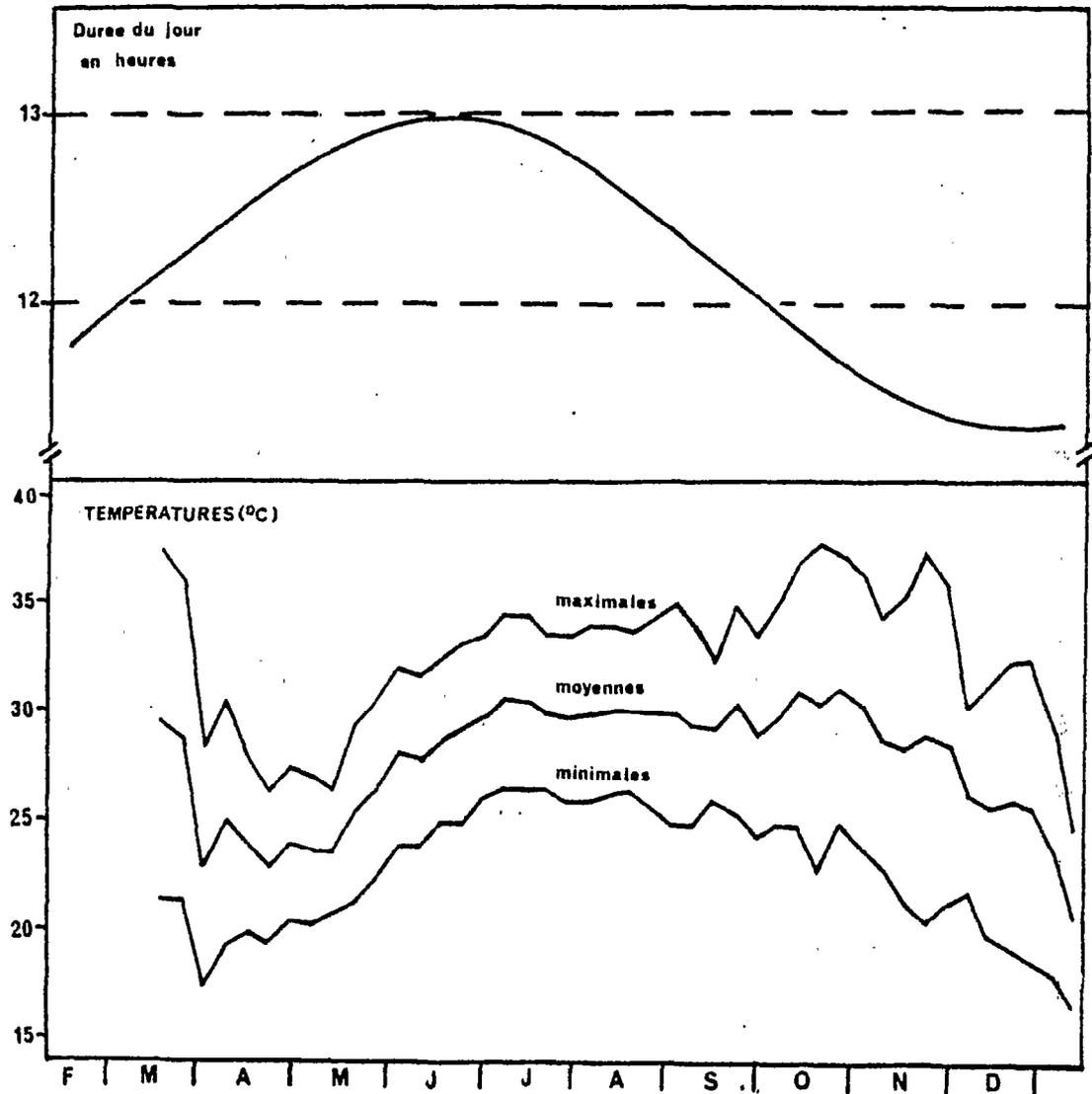


Fig. 24 : Evolution de la durée du jour et variation des températures minimales et maximales au cours de l'année.

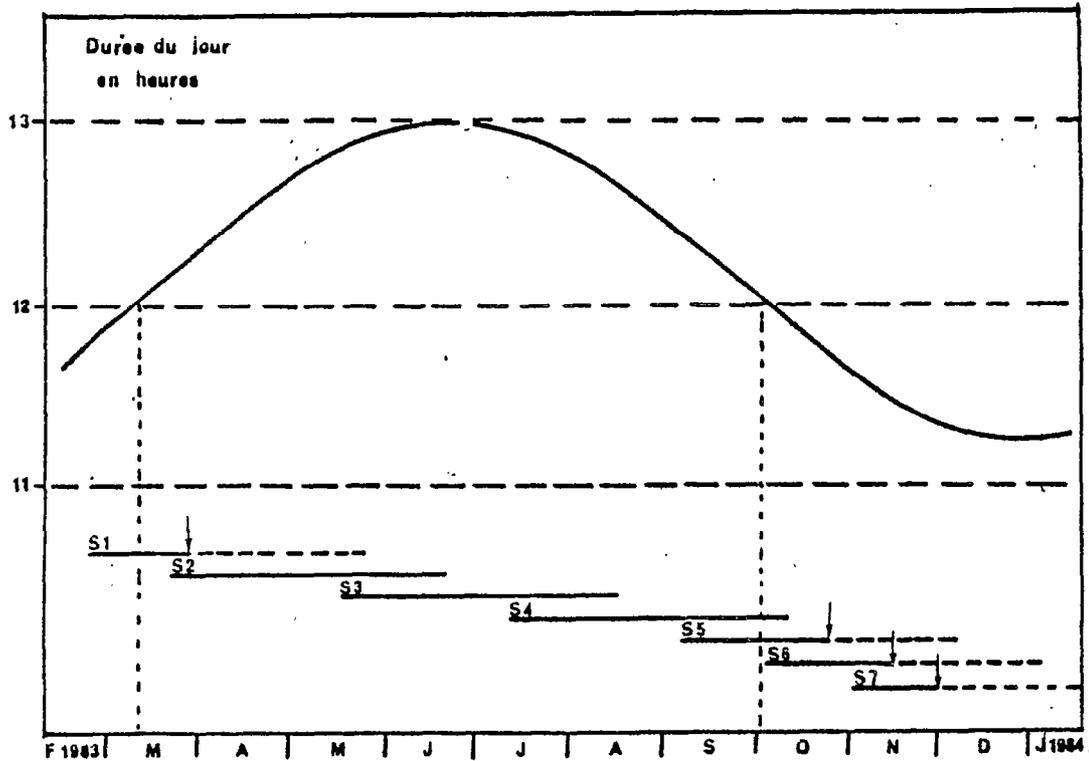


Fig.25 : Influence de la photopériode sur la floraison de S. rostrata au cours de cycles végétatifs successifs initiés à différentes époques de l'année.

-S1 , S2 , S3 , S4 , S5 , S6 et S7 représentent les différents cycles végétatifs de S. rostrata .

-( ) les flèches indiquent le début de la floraison.

S6, S7 initiés où se déroulant en période de jours courts (moins de 12h d'insolation journalière). Lorsque les plantes sont cultivées en période de jours longs, (durée du jour supérieure à 12h/j), il n'y a pas de floraison même pour des plantes âgées de 3 mois.

### 3.2.2. Température

L'analyse des valeurs hebdomadaires moyennes des températures relevées en Mars, montrent que la température décroît rapidement pendant le mois de Mars puis croît à nouveau régulièrement à partir du mois de Mai. La température moyenne en Juillet, Août et Septembre est de 31°C, puis elle baisse à partir du mois d'Octobre pour atteindre 21°C en Janvier (fig.24).

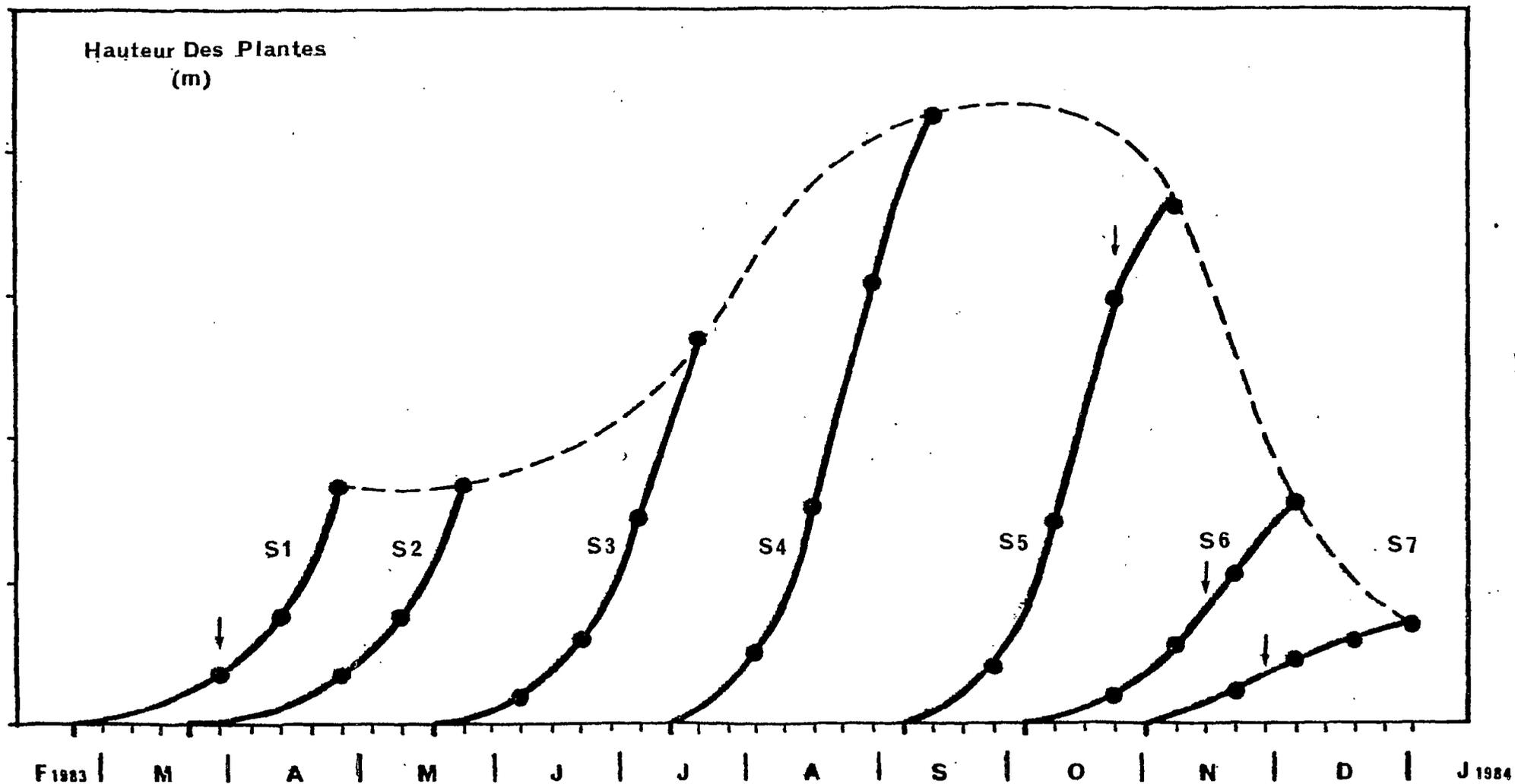
### 3.3. Evolution des paramètres de croissance de Sesbania rostrata

Les inoculations ont été effectuées à intervalles de deux semaines, 3 semaines après le semis à compter de la 3ème semaine, et les mesures à 5, 7 et 9 semaines.

#### 3.3.1. Hauteur

La hauteur des plantes (fig. 26 et tableau 22) varie considérablement suivant la date du semis : de 0,35 à 2,10m à 9 semaines (Courbe en traits interrompus). Elle est optimale pour les semis S4 et S5 effectués en période de jours longs et de température élevées (Juillet, Août) et au contraire très faible pour les semis S6 et S7 effectués en période de jours courts et de basses températures (Novembre, Mars).

Fig. 26 : Evolution de la hauteur de *S. rostrata* au cours de semis initiés à différentes époques de l'année.



- S1 , S2, S3, S4, S5, S6 et S7 indiquent les différents cycles végétatifs.

Tableau: 22. Evolution de la hauteur de *S. rostrata* au cours de semis initiés à différentes époques de l'année

Semis	Hauteur des plantes (cm)		
	Age des plantes (Semaines)		
	5	7	9
S <sub>1</sub>	19 a	38 b	85 bc
S <sub>2</sub>	18 a	39 b	84 bc
S <sub>3</sub>	31 b	72 d	134 d
S <sub>4</sub>	76 c	154 e	213 e
S <sub>5</sub>	72 c	149 e	180 f
S <sub>6</sub>	28 b	52 c	77 b
S <sub>7</sub>	23 a	29 a	35 a

Dans chaque colonne les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05) (Test de Duncan 1955).

### 3.3.2. Poids sec des plantes et des nodules caulinaires

Comme la hauteur, le poids sec des plantes varie beaucoup suivant la date de semis. C'est en période de jours longs et de températures élevées (Juillet-Août) que la production de biomasse est optimale (semis S4 : 94,5 g/plante). par contre en période de jours courts et de basses températures (Novembre-Mars) la production de biomasse est très faible (semis S7: 3,05 g/plante). Le poids sec des nodules caulinaires varie considérablement suivant la période à laquelle le semis est effectué (tableau 24). Pour des plantes de 9 semaines l'optimum est atteint au semis S4 réalisé en juillet : 1628 mg/plante contre 106 mg au semis S7 réalisé au mois de décembre (tableau 23 ).

### 3.3.3. Azote total

L'évolution de l'azote total de S. rostrata décrit une courbe comparable à celle décrite par l'évolution de la hauteur des plantes. La quantité d'azote totale par plante à 9 semaines varie entre 0,4 et 1,6 g. Ces quantités correspondent respectivement aux plantes cultivées en période de jours courts et aux plantes cultivées en période de jours longs (fig.27, tableau 25)

### 3.4. Evolution de l'ARA caulinaire

Les mesures effectuées sur des plantes âgées de 9 semaines montrent que l'activité réductrice d'acétylène des nodules caulinaires atteint son optimum au cycle S4 (170 nmoles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/plante) puis elle décroît régulièrement au cours des différents semis

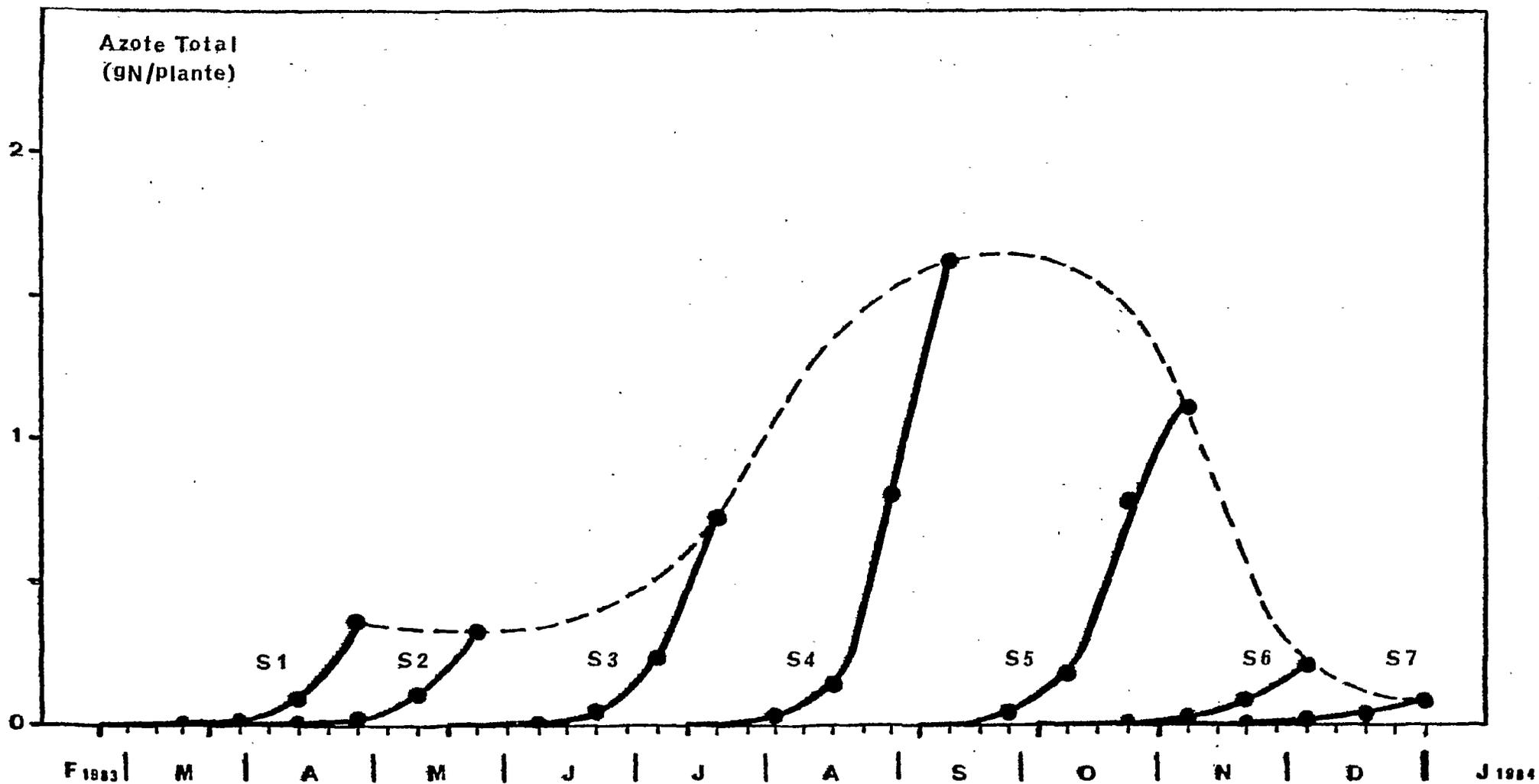


Fig. 27 : Evolution de l'azote total de *S. rostrata* au cours de semis initiés à différentes époques de l'année.

S1 ; S2, S3, S4, S6 et S7 indiquent les différents cycles végétatifs.

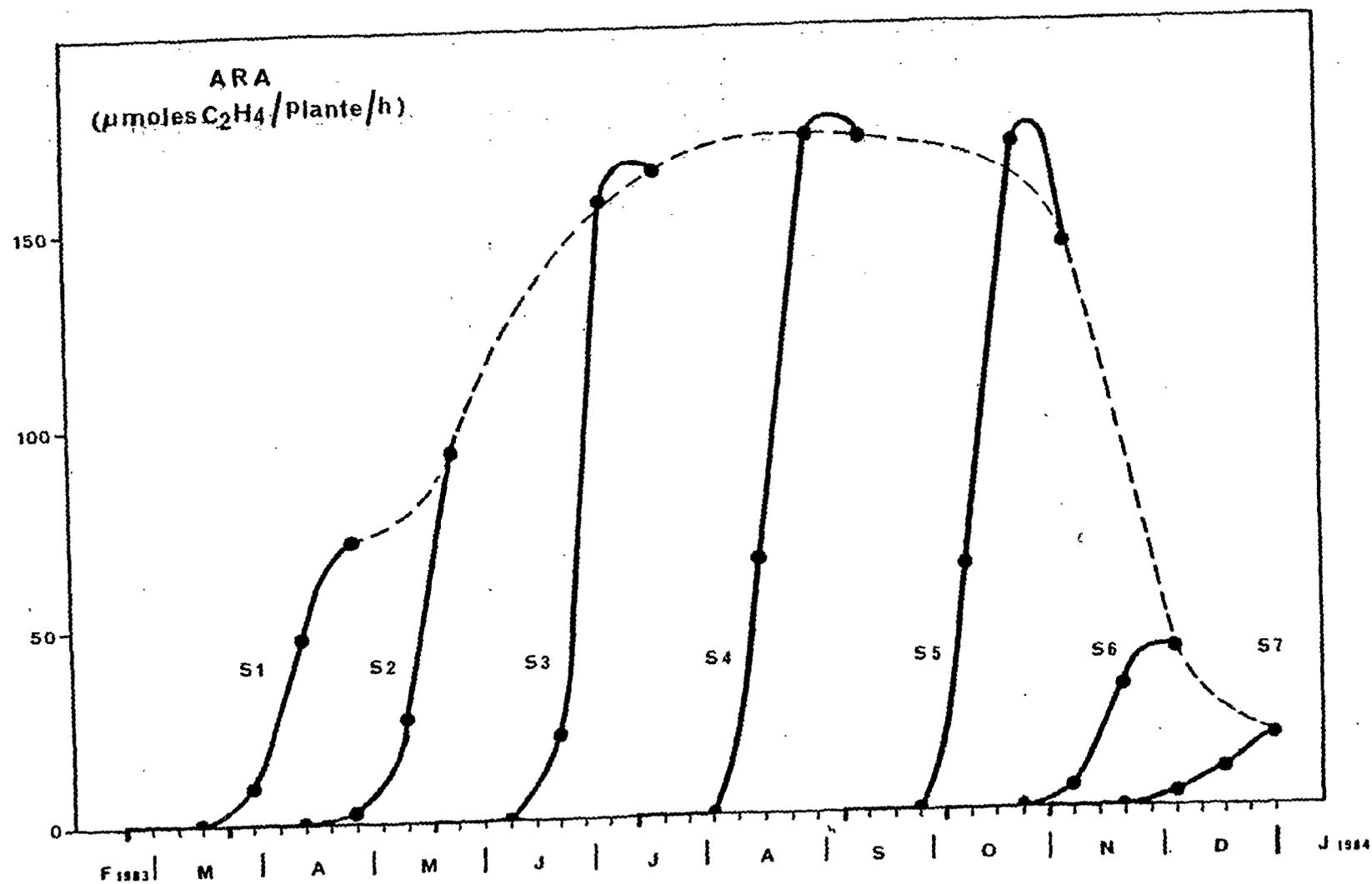


Fig. 28 : Evolution de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) de nodules caulinaires de *S. rostrata* au cours de semis initiés à différentes époques de l'année.

S1 ; S2 ; S3, S4, S5, S6 et S7 indiquent les différents cycles végétatifs.

Tableau : 23. Evolution du poids sec de *S. rostrata* au cours de semis initiés à différentes époques de l'année

Semis	Poids sec des plantes (.g)		
	Age des plantes (semaines)		
	5	7	9
S <sub>1</sub>	0,71 b	4,06 b	14,0 c
S <sub>2</sub>	0,77 b	3,33 b	16,4 c
S <sub>3</sub>	1,47 c	10,02 c	38,7 d
S <sub>4</sub>	6,2 d	40,7 de	94,5 g
S <sub>5</sub>	6,2 d	32,1 d	61,2 e
S <sub>6</sub>	0,56 ab	3,10 b	8,3 b
S <sub>7</sub>	0,46 a	1,17 a	3,05 a

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05) (Test de Duncan 1955)

Tableau: 24. Evolution de poids des nodules caulinaires de S. rostrata au cours de semis initiés à différentes époques de l'année

Semis	Poids sec des nodules (mg)		
	Age des plantes (semaines)		
	5	7	9
S <sub>1</sub>	17 b	54 a	182 bc
S <sub>2</sub>	4 a	ε	154 b
S <sub>3</sub>	27 c	143 c	465 d
S <sub>4</sub>	141 e	569 e	1628 f
S <sub>5</sub>	183 f	516 d	756 e
S <sub>6</sub>	39 d	79 b	203 c
S <sub>7</sub>	4 a	60 ab	106 a

Dans chaque colonne les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05) (Test de Duncan 1955).

Tableau 25 : Evolution de l'azote total de Sesbania rostrata au cours de semis initiés à différentes époques de l'année.

Semis	Azote total des plantes (g)		
	Age des plantes (semaines)		
	5	7	9
S <sub>1</sub>	0,011 a	0,084 a	0,37 c
S <sub>2</sub>	0,018 b	0,09 a	0,33 c
S <sub>3</sub>	0,04 d	0,242 b	0,727 d
S <sub>4</sub>	0,38 cd	0,797 c	1,616 f
S <sub>5</sub>	0,94 e	0,791 c	1,079 e
S <sub>6</sub>	0,018 b	0,086 a	0,219 b
S <sub>7</sub>	0,03 c	0,026 b	0,087 a

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (p = 0,05) (Test de DUNCAN 1955).

Tableau: 26. Evolution de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) de nodules caulinaires de S. rostrata au cours de semis initiés à différentes époques de l'année

Semis	ARA des plantes ( $\mu\text{moles h}^{-1}\text{pl}^{-1}$ )		
	Age des plantes (semaines)		
	5	7	9
S <sub>1</sub>	8 b	46 c	71 c
S <sub>2</sub>	2 a	25 b <sub>t</sub>	93 d
S <sub>3</sub>	21 c	156 e	164 e
S <sub>4</sub>	65 d	172 f	171 g
S <sub>5</sub>	62,5 d	109 d	144 f
S <sub>6</sub>	6 b	31 bc	40 b
S <sub>7</sub>	3 a	9 a	18 a

Dans chaque colonne les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05) (Test de Duncan 1955)

pour atteindre 25 nmoles  $C_2H_4$ /h/plante au cycle S7). L'analyse des activités mesurées en Avril-Mai et Juin met en évidence un effet très net des variations de température sur l'ARA caulinaire (cf. en particulier les variations d'ARA caulinaire à 7 semaines au niveau du semis S2 et S3) (fig.28 ,tableau 26).

#### 4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'analyse des résultats obtenus, montre que les paramètres de croissance de S. rostrata et l'activité réductrice d'acétylène de nodules caulinaires sont étroitement dépendants des conditions climatiques. La floraison peut intervenir rapidement, (4 à 5 semaines après le semis) si la durée de l'insolation est inférieure à 12h/j. Des résultats comparables ont été par la suite obtenus à l'IRRI ( Los Baños) dans des conditions d'ensoleillement proches de celles de Dakar (IRRI Annual Report, 1985).

La fixation caulinaire d'azote est particulièrement sensible aux variations de température . La température optimale étant de 31° C, c'est au cours de cette période que l'on observe un développement optimum de S. rostrata ; les semis étant initiés entre fin Mai et début Septembre (fig. 26 , tableau 24)

Si une relation a pu être établie entre la baisse de l'activité caulinaire à 7 semaines et celle de la température au mois de Mai (cycle végétatif S2 ,fig. 28) il est par contre difficile d'apprécier l'importance relative de la température et de la durée de l'insolation sur la symbiose Rhizobium- S. rostrata. Il faudrait pour cela opérer en conditions parfaitement contrôlées (phytotron).

Les mesures effectuées à la fois sur les tiges et les racines ont montré que dans les conditions d'hydromorphie permanente la fixation d'azote par S. rostrata est due essentiellement

aux nodules caulinaires ( environ 96% de l'activité totale; fig. 23-A).

Des observations analogues ont été faites par Saint Macary et al., 1985 : la culture de S. rostrata sous différents régimes hydriques avait montré que l'ARA racinaire était fortement inhibée lorsque le sol était inondé.

Il apparaît donc que le développement de S. rostrata est fortement dépendant des conditions climatiques. C'est pourquoi son utilisation comme engrais vert dans un lieu donné nécessite une étude préalable afin de définir les conditions qui permettent l'expression optimale de ses potentialités.



CHAPITRE IV

EVALUATION DE L'AZOTE FIXE PAR *SESBANIA ROSTRATA*



## 1. INTRODUCTION

L'azote est un élément essentiel pour la croissance des végétaux. Cependant son utilisation sous forme d'engrais chimiques en agriculture tropicale reste très limitée car son prix est souvent incompatible avec les disponibilités financières des agriculteurs.

La fixation d'azote par les légumineuses peut constituer une source d'azote à moindre frais dans un système de rotation cultural ou de cultures associées. Les recherches effectuées dans ce domaine visent à améliorer la fixation biologique de l'azote par les légumineuses afin de limiter l'utilisation des engrais azotés.

La quantification de l'azote fixé par la plante au cours de son cycle végétatif permet d'estimer les potentialités de la symbiose Rhizobium - légumineuse. Parmi les méthodes les plus utilisées, on peut citer la méthode des bilans d'azote, la méthode dite " par différence ", la méthode de réduction de l'acétylène, la méthode de l'équivalent engrais et les méthodes isotopiques.

L'étude que nous présentons ici a consisté à évaluer la quantité d'azote fixé par Sesbania rostrata en 53 jours en utilisant la méthode " par différence " et la méthode de dilution isotopique N-15.

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Méthodes d'évaluation de la fixation d'azote

Il existe plusieurs méthodes pour estimer la fixation d'azote dans les conditions réelles de culture au champ (LaRue et Paterson, 1981). Nous avons utilisé la méthode de dilution isotopique et la méthode par différence pour estimer la quantité d'azote fixée par S. rostrata.

#### 2.1.1. Méthode par différence

On estime selon cette méthode que la quantité d'azote fixée est égale à la différence entre la quantité totale d'azote contenue dans la biomasse d'une plante fixatrice d'azote et la quantité totale d'azote contenue dans la biomasse de la plante non fixatrice (plante dont l'azote provient uniquement du sol (Williams et al., 1977)).

Trois versions de cette méthode sont souvent utilisées selon que l'on compare :

- une légumineuse et une non légumineuse
- une légumineuse et la même légumineuse non nodulante
- une légumineuse inoculée et la même légumineuse non inoculée.

C'est cette dernière version que nous avons utilisé.

### 2.1.2. Méthode de dilution isotopique N-15

Cette méthode permet d'estimer avec précision la fixation d'azote chez les légumineuses (Bremner, 1975 ; Rennie et al., 1978 ; Rennie, 1979 ; Vose et al., 1981) et les non légumineuses (Rennie, 1980).

Le principe de la méthode est que la plante non fixatrice et la plante fixatrice d'azote utilisent dans les mêmes proportions l'azote du sol et l'azote marqué provenant de l'engrais (Fried et Broeshart, 1975 ; Fried et Middleboe, 1977). Les plantes fixatrices utilisent en plus l'azote de l'air, cette source d'azote supplémentaire entraînant une dilution de l'azote marqué au sein du système fixateur d'azote.

### 2.1.3. Dispositif expérimental

Les plantes ont été cultivées en cylindre P.V.C. de  $0,07\text{m}^2$  (dispositif décrit au paragraphe 2.3.3. du Chapitre II) à raison de 4 plantes par cylindre. Elles reçoivent l'équivalent de 40 unités d'azote sous forme d'urée N-15 d'excès isotopique 5,02%. Le sol est inondé puis maintenu sous lame d'eau lorsque les plantes atteignent 15 cm de hauteur. (Dans ces conditions de culture, la nodulation racinaire est très limitée et l'ARA correspondant négligeable. cf. fig. 23-B, chapitre III).

L'essai comporte deux traitements, avec 5 répétitions.

(1) plantes fixatrices d'azote inoculées 21 et 31 jours après le semis.

(2) plantes non fixatrices ( non inoculées).

Les analyses ont été effectuées au 53ème jour sur les parties aériennes (tiges, feuilles).

## 2.2. Détermination de la teneur isotopique en N-15 par la spectrométrie optique

### 2.2.1. Principe

La présence d'un atome de masse 15 dans une molécule d'azote gazeux, excitée par un champ électrique haute fréquence se traduit par un déplacement des bandes du spectre d'émission ; la longueur de la bande principale émise dans l'ultraviolet se situe à 297,7 nm pour les molécules  $^{14}\text{N} \ ^{14}\text{N}$ , à 298,3 nm pour les molécules  $^{14}\text{N} \ ^{15}\text{N}$  et à 298,9 nm pour les molécules  $^{15}\text{N} \ ^{15}\text{N}$ .

La séparation des différentes longueurs d'onde, peut se faire à l'aide d'un réseau de miroirs ou d'un prisme. A la fente est associée un photomultiplicateur. Le signal est amplifié puis transmis à un enregistreur ce qui permet de mesurer l'intensité de ces différentes bandes et de calculer la teneur en azote-15.

La spectrométrie optique permet d'observer des spectres de bandes caractéristiques des molécules et non un spectre de raies caractéristiques des atomes. Les longueurs d'onde étudiées étant rapprochées, ces bandes se chevauchent. Du fait d'une résolution insuffisante des pics 28, 29 et 30, les spectromètres ne fournissent pas les mesures absolues des teneurs isotopiques. Un étalonnage est donc nécessaire ; celui ci peut être obtenu en comparant les résultats obtenus à ceux fournis par un spectromètre de masse. (Fiedler et Proksch, 1972 ; Guiraud et Buscarlet, 1975).

### 2.2.2. Méthodes de calcul

Les signaux émis en spectrométrie optique sont proportionnels aux molécules  $^{28}\text{N}_2$ ,  $^{29}\text{N}_2$ ,  $^{30}\text{N}_2$ . L'abondance isotopique peut être calculée à partir de la hauteur des trois pics par la formule :

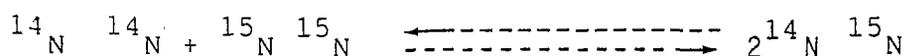
$$\% \text{ } ^{15}\text{N} = \frac{h \text{ } ^{30}\text{N}_2 + 1/2 h \text{ } ^{29}\text{N}_2}{h \text{ } ^{30}\text{N}_2 + h \text{ } ^{29}\text{N}_2 + h \text{ } ^{26}\text{N}_2} \times 100$$

(h étant la hauteur du pic correspond à la masse m).

Cette formule est valable dans tous les cas et permet de calculer la teneur isotopique. Il suffit pour cela de mesurer la hauteur des pics.

La limite de cette méthode est que pour des échantillons faiblement marqués, le nombre de molécules de type  $^{15}\text{N} \text{ } ^{15}\text{N}$  est très faible et le pic correspondant non mesurable.

Pour pallier cet inconvénient on se réfère à la propriété des isotopes qui peuvent s'échanger au sein de différentes molécules pour atteindre l'équilibre isotopique. (Thibault, 1972).



On suppose que les atomes  $^{14}\text{N}$  et  $^{15}\text{N}$  sont combinés au hasard suivant le terme de l'équation.

$$(p + q)^2 = p^2 + 2 pq + q^2$$

avec p : nombre d'atomes de masse 14

q : nombre d'atomes de masse 15

$p^2$ : probabilité d'obtenir des molécules de masse 28

$2pq$  : probabilité d'obtenir des molécules masse 29.

$q^2$  : probabilité d'obtenir des molécules de masse 30.

Soit  $R$  le rapport du nombre de molécules d'azote 29 sur le nombre de molécules d'azote 28

$$R = \frac{{}^{15}\text{N} \quad {}^{15}\text{N}}{{}^{14}\text{N} \quad {}^{14}\text{N}} = \frac{29}{28} = \frac{2pq}{p^2} = \frac{2q}{p}$$

par définition:

$$\% \quad {}^{15}\text{N} = \frac{q}{p + q} \times 100$$

et en divisant le numérateur et le dénominateur par  $p$  il vient

$$\% \quad {}^{15}\text{N} = \frac{q/p}{1 + q/p} \times 100$$

de (1) on en déduit  $q/p = R/2$  et

$$\% \quad {}^{15}\text{N} = \frac{R/2}{1 + R/2} \times 100 = \frac{100 R}{2 + R}$$

De la même façon, si on a un composé fortement enrichi on pourra mesurer le pic 30 et calculer le rapport ( $R' = \frac{30}{29}$ ).  
Un calcul semblable permet de trouver que  $\% \quad {}^{15}\text{N} = \frac{200R'}{1 + 2R'}$

### 2.2.3. Calcul du pourcentage de l'azote fixé en fonction des teneurs isotopiques en N-15

#### Dilution isotopique

Si l'on apporte la même quantité d'azote au système fixateur et au système non fixateur, le calcul de N fixé découle des relations suivantes (Rennie et al. 1976 ; Bardin et al., 1977 ; Fried et Middleboe, 1977).

-Système non fixateur (témoin)

avec:

$S_o$  = pourcentage de l'azote total de la plante  
dérivé du sol

$F_o$  = pourcentage de l'azote total de la plante  
provenant de l'engrais

$$S_o + F_o = 1 \quad (1)$$

-Système fixateur (inoculé)

avec:

$S_n$  = pourcentage de l'azote total de la plante  
dérivé du sol

$F_n$  = pourcentage de l'azote total de la plante  
provenant de l'engrais

$Y$  = pourcentage de l'azote total de la plante  
dérivé de l'atmosphère.

$$S_n + F_n + Y = 1 \quad (2)$$

L'azote du sol et de l'engrais étant absorbés dans les mêmes proportions par les plantes fixatrices et non fixatrices, on peut écrire :

$$\frac{F_o}{S_o} = \frac{F_n}{S_n} \quad (3)$$

A partir de transformations découlant des équations (1), (2) et (3) il vient

$$y = 1 - S_n - F_n \quad \text{or} \quad S_n = F_n \frac{S_o}{F_o}$$

$$y = 1 - F_n \frac{S_o}{F_o} - F_n \quad \text{or} \quad S_o = 1 - F_o$$

On obtient:

$$y = 1 - \frac{F_n}{F_o}$$

Comme les quantités d'azote marqué apportées aux plantes témoins et aux plantes inoculées est la même dans les deux cas, on a la relation suivante

$$\frac{F_n}{F_o} = \frac{E_n}{E_o}$$

avec:

$E_n$  = excès atomique des plantes fixatrices

$E_o$  = excès atomique des plantes témoins

on obtient :

$$y = 1 - \frac{E_n}{E_o}$$

#### 2.2.4. Analyse des échantillons et préparation des tubes de décharge

La méthode utilisée est inspirée de celle proposée par Martin et al. (1981).

L'azote des échantillons à analyser est successivement minéralisé, déplacé par la soude, fixé sous forme de chlorure d'ammonium en présence d'acide chlorhydrique, puis transformé en  $N_2$  dans des tubes de décharge.

##### -Préparation du matériel végétal

Les échantillons sont séchés à l'étuve à  $70^\circ C$  jusqu'à obtention d'un poids constant, puis réduits en poudre.

##### -Minéralisation

20mg environ de l'échantillon en poudre sont introduits dans un tube de minéralisation en Pyrex avec 1ml de la solution de minéralisation décrite au paragraphe 2.4. du chapitre II.

Les tubes de minéralisation sont placés dans un thermostat à sec. La digestion s'effectue pendant 2 h à 330° C.

-Obtention de NH<sub>3</sub> par diffusion.

Le digestat est laissé à refroidir, puis un petit tube contenant 1 ml de HCl 0,4 N est introduit dans la partie supérieure du tube à minéralisation de manière à reposer sur l'indentation prévue à cet effet. Après addition de 2 ml d'eau distillée au digestat le tube de minéralisation est fermé à l'aide d'un bouchon à jupe en caoutchouc. Le digestat est rendu alcalin par l'injection de 4ml de NaOH 10N à travers le bouchon à l'aide d'une seringue. La diffusion de l'ammoniac est accélérée en plaçant les tubes dans un thermostat à sec à 100° C pendant 24 heures. L'azote ainsi déplacé est fixé sous forme de NH<sub>4</sub>Cl dans le tube de 1 ml contenant HCl. Un aliquote de cette solution est utilisé pour doser colorimétriquement l'azote à l'aide du réactif de Nessler : on prélève 0,1 ml que l'on dissout dans 10 ml d'eau distillée on ajoute 0,25 ml du réactif de Nessler et on lit au spectromètre à 410 mu. La concentration d'azote est évaluée en se référant à une courbe étalon.

-Préparation des tubes de décharge

Pour déterminer la teneur en N-15, l'azote doit être transformé en azote gazeux par la méthode de Dumas (Fiedler et Proksch, 1975).

L'analyse isotopique est faite en prenant soin de piéger les gaz résiduels (CO<sub>2</sub>; H<sub>2</sub>O) issus de la transformation de l'azote ammoniacal en azote moléculaire qui entraînent soit une

surestimation de la teneur en N-15, soit gênent ou empêchent l'émission (Fiedler et Proksch, 1975 ; Leikman et al., 1968). Pour pallier ces inconvénients, la majorité des auteurs utilisent du CaO activé à 1000°C ( Goleb et Middelboe, 1968 ; Martin et al., 1981).

Une aliquote de 10 µl environ de la solution de chlorure d'ammonium obtenue précédemment est prélevée à l'aide d'un capillaire ce qui correspond à une quantité d'azote comprise entre 1 et 5 µg. Cette quantité d'azote est nécessaire à l'établissement d'une pression partielle voisine de 3mm Hg dans le tube de décharge (Fiedler et Proksch, 1975).

Après séchage à l'étuve (50°C), on dispose le capillaire, une tige de Cu O et un morceau de Ca O activé dans un tube en Pyrex (160 mm x 4 mm) scellé à son extrémité à l'aide d'un chalumeau.

Les tubes sont connectés à une rampe à vide par des tuyaux de caoutchouc " Ultravidhelium " (Verneret).

Lorsqu'un vide de 10 mbar est atteint, on procède à la désorption des molécules contaminantes en chauffant les tubes pendant 3 à 5 minutes à l'aide d'un chalumeau, puis en appliquant une décharge de 10 secondes à l'aide d'un testeur à haute fréquence.

L'évacuation est terminée lorsqu'un vide de 10 mbar est atteint. A ce stade les tubes sont scellés sous un vide dynamique à l'aide d'un chalumeau. Ils sont alors placés dans un four à moufle, à la température de 570°C pendant une nuit afin de transformer l'azote ammoniacal en N<sub>2</sub> ( réaction de Dumas).

Les tubes de décharge sont laissés 1 à 2 jours à la

température ambiante avant d'effectuer les mesures à l'aide du spectromètre optique (SOPRA GS1 dont la précision relative est de 1 à 2% lorsque l'excès isotopique atteint 0,5% (Guiraud et Fardeau, 1980 ; Lemasson et al., 1982).

### 3. RESULTATS

#### 3.1. Effet de l'inoculation sur la hauteur, le poids sec et le taux moyen d'azote total des plantes

Les mesures effectuées sur les plantes inoculées avec la souche Rhizobium ORS571 d'une part et les plantes non inoculées d'autre part, montrent que l'inoculation a un effet positif sur l'ensemble des paramètres mesurés (tableau 27).

Les augmentations dues à l'inoculation sont de 13% pour la hauteur des plantes, 23% pour le poids sec, et 78% pour l'azote total des plantes.

#### 3.2. Estimation de l'azote fixé par différence

La fixation d'azote a été estimée en comparant les traitements (1) plantes inoculées au traitement (2) plantes non inoculées. Si on désigne par  $n$  : azote total moyen du traitement (1) et  $p$  = azote total moyen du traitement (2). Avec:  $n = 5,43\text{g N}$  / cylindre et  $p = 3,05\text{g N}$  / cylindre.

On peut écrire:  $D = n - p$

$$= 5,43 - 3,05 = 2,38 \text{ g N/cylindre.}$$

Chaque cylindre a une superficie de  $0,07 \text{ m}^2$ , la quantité d'azote fixé rapportée au  $\text{m}^2$  équivaut à  $3,4\text{g/m}^2$  soit environ  $340 \text{ kg N/ha}$  en extrapolant. L'azote provenant de la fixation d'azote représente 43% de l'azote total des plantes.

#### 3.3. Teneur isotopique et pourcentage d'azote fixé

Une courbe d'étalonnage du spectromètre a été obtenue par

Tableau: 27. Effet de l'inoculation sur le développement et la teneur en azote de S. rostrata (plantes de 53 jours; 4 plantes/cylindre)

Plantes	Hauteur (m)	Poids sec (g/cylindre)	N%	N total (g/cylindre)
Non fixatrices	1,56 ± 0,10	193 ± 14	1,58 ± 0,11	3,05 ± 0,25
Fixatrices	1,76 ± 0,07	238 ± 19	2,28 ± 0,05	5,43 ± 0,41

l'intermédiaire d'une solution témoin de sulfate d'ammonium, dont les teneurs en N-15 ont été dosées au spectromètre de masse (Varian GD150) au Centre d'Etude Nucléaire de Cadarache (France).

La relation entre % N-15 réel (mesure au spectromètre de masse) et le % N-15 déterminé par spectrométrie optique est définie par la droite d'équation :

$$y = 1,31X - 0,127.$$

L'excès isotopique est déterminé à partir de cette équation.

$$E \% = 1,31X - 0,493.$$

Les valeurs  $E_0$  et  $E_n$  obtenues sont les suivantes

$$E_0 = 0,187 \text{ (plantes non fixatrices)}$$

$$E_n = 0,115 \text{ (plantes fixatrices)}.$$

### Rappels

1. La valeur  $X$  est déterminée à partir de la mesure du rapport des pics 29 et 28 ( $R = \frac{h_{29}}{h_{28}}$ )

au moyen de la formule  $x = \frac{100}{2 + R}$

2.  $E_f$  représente l'excès isotopique de l'urée marqué = 5,02.

Calcul du pourcentage d'azote fixé en fonction de la teneur isotopique :

### Plantes non fixatrices

$$\% \text{ N engrais } F_0 = \frac{E_0}{E_f} = \frac{0,187}{5,02} = 0,037 \quad (3,7\%)$$

$$\% \text{ N sol } S_0 = 1 - F_0 = 1 - 0,037 = 0,963 \quad (96,3\%)$$

Plantes fixatrices

$$\% \text{ N fixation } N_2 \quad Y = 1 - \frac{E_n}{E_o} = 1 - 0,615 = 0,385 \quad (38,5\%)$$

$$\% \text{ N engrais} \quad F_n = \frac{E_n}{E_f} = \frac{0,115}{5,02} = 0,023 \quad (2,3 \%)$$

$$\% \text{ N sol} \quad S_n = 1 - y - F_n = 0,592 \quad (59,2\%)$$

Azote fixé

$$Y = y \times N \text{ total} = 0,385 \times 5,43 = 2,09 \text{ g N/cylindre.}$$

La quantité d'azote fixé rapportée au  $m^2$  est égale à 29,4g. Par extrapolation, on obtient 300 kg N/ha. Cette valeur se rapproche de celle obtenue par la méthode par différence (tableau 28).

Tableau: 28. Estimation de la fixation d'azote par S. rostrata  
Méthode par différence et méthode de dilution isotopique.

Méthodes	Fixation de N <sub>2</sub> (g/cylindre)
Différence	2,38 ± 0,20 <sup>a</sup>
Dilution isotopique	2,15 ± 0,52 <sup>b</sup>

Soit en g/m<sup>2</sup> : (a) 33,5 ± 2,8

(b) 30,3 ± 7,3

## DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La quantité d'azote fixé par S. rostrata cultivé en micro-parcelle de 1 m<sup>2</sup> a été évaluée à 267kg N/ha par la méthode de bilan par Rinaudo et al. (1983). Nous l'avons estimée à environ 300 kgN/ha aussi bien par la méthode par différence que par la méthode de dilution isotopique.

La différence entre les dispositifs expérimentaux utilisés et la précision des méthodes d'évaluation peuvent, du moins en partie, expliquer l'écart entre les valeurs obtenues.

Nos résultats montrent que lorsque S. rostrata est cultivé sur sol submergé, l'activité réductrice d'acétylène des nodules racinaires est très faible par rapport à l'activité des nodules caulinaires, elles représentent respectivement 4% et 96% de l'ARA total (cf. Chapitre III). Ainsi donc la nodulation caulinaire apparaît comme une nécessité pour la croissance de S. rostrata cultivé sur sol submergé.

Les résultats que nous avons obtenus ont permis de mettre en évidence l'effet positif de l'inoculation des tiges sur le développement de S. rostrata.

L'évaluation de l'azote fixé par les légumineuses par les méthodes isotopiques et par différence nécessite l'utilisation de plantes témoins, qui peuvent être des graminés ou des isolignées non nodulantes de la même légumineuse. Dans le cas de S. rostrata nous avons utilisé des plantes non inoculées.

Nous avons constaté que lorsque S. rostrata était cultivé à

l'extérieur, une nodulation spontanée pouvait être observée après les pluies. Les nodules ainsi formés sont détachés dès leur apparition. Ces contaminations pourraient être limitées en inoculant les tiges des plantes témoins avec une souche de Rhizobium inefficace. La souche Nem1 que nous avons isolée par la suite (cf. Chapitre 1), forme des nodules inefficaces sur les tiges et les racines de S. rostrata, son utilisation dans l'évaluation de l'azote fixé par les méthodes isotopiques N-15 pourrait contribuer à affiner les résultats déjà obtenus.

CHAPITRE V.

UTILISATION DE *SESBANIA ROSTRATA* COMME ENGRAIS VERT



## 1. INTRODUCTION

Le coût élevé des engrais azotés est l'un des principaux facteurs qui en limitent l'utilisation dans les pays en développement.

L'utilisation de systèmes fixateurs d'azote est une des solutions permettant le maintien et l'amélioration de la fertilité des sols.

Les engrais verts sont traditionnellement utilisés de longue date en Asie du Sud Est et en Inde pour la culture du riz, qu'il s'agisse d'azolla ou de légumineuses (Dao et Thuyet, 1979; Patnaik et Rao, 1979 ; Lumpkin et Pluknett, 1982 ; Watanabe, 1982 ; Kanazawa, 1984 ; Singh, 1984 ).

De très nombreuses légumineuses ont été utilisées comme engrais vert, en particulier diverses espèces du genre Sesbania. Parmi celles-ci, S. rostrata est probablement la plus performante (Rinaudo et al., 1982 ; Roger et Watanabe, 1986). Des essais préliminaires réalisés en microparcelles de 1m<sup>2</sup> ont montré que S. rostrata peut fixer environ 267 Kg-N/ ha en 50 à 60 jours, et que son utilisation comme engrais vert permet de doubler les rendements en grains du riz (Rinaudo et al., 1982 ; 1983).

Les travaux que nous présentons dans ce chapitre ont pour objet d'illustrer les possibilités d'utilisation de S. rostrata comme engrais vert en riziculture irriguée et en cultures exondées: riz pluvial et sorgho.

Ces expériences ont été réalisées en station (ORSTOM Bel-Air) et en milieu paysan (Casamance, sud du Sénégal).

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Recherche de différents types d'inoculum

Cette expérience a consisté à rechercher un inoculum facile à préparer pour une utilisation au champ.

Quatre types d'inoculum ont été testés.

-Nodules frais : broyage de 5 g de nodules caulinaires frais dans un peu d'eau, puis passage sur tamis fin, le filtrat étant amené à 500 ml avec de l'eau (fig. 29).

-Nodules sec : même préparation à partir de 10 g de nodules caulinaires secs réduits en poudre.

-Poudre d'alginate : ce procédé permet d'inclure des Rhizobium dans des billes d'alginate qui sont séchées puis finement broyées (Mugnier, 1980)

A partir de 1g de poudre d'alginate on réalise une suspension colloïdale dans 1l de tampon phosphate 0.06M, pH:8 ( $K_2HPO_4$ , 4.3g;  $KH_2PO_4$ , 4.9g ).

-Culture de Rhizobium de 48 h diluée 10 fois.

Le titre de chaque inoculum est déterminé par comptage sur boîte sur milieu YLA.

Afin de tester l'efficacité de ces inoculums, des plantes de S. rostrata âgées de 1 mois ont été inoculées sur des portions de tiges de 25 cm avec les inoculums ainsi obtenus. Les mesures d'ARA sont effectuées 3 semaines après l'inoculation, ce qui



Fig. 29 : Préparation sur le terrain d'un inoculum de Rhizobium à partir de nodules caulinaires frais

correspond à l'optimum de l'activité réductrice d'acétylène de S. rostrata.

## 2.2. Utilisation de l'engrais vert S. rostrata pour la culture du riz en rizière de plateau

L'essai a été mis en place à Affiniam (Casamance) en rizière de plateau et réalisé en collaboration avec le groupement de jeunes paysans du village (les caractéristiques physico-chimiques du sol figurent en annexe).

Le dispositif expérimental comprend 12 parcelles de  $2\text{m}^2$  chacune avec trois traitements : azote minéral (apport d'urée correspondant à 60 kg N/ha), engrais vert S. rostrata, et le témoin sans azote (l'essai comporte 4 répétitions par traitement).

Les graines de S. rostrata sont scarifiées par abrasion mécanique (cf procédé décrit au paragraphe 2.1 du chapitre II), puis mélangées avec l'inoculum d'alginat. Elles sont semées en poquets (densité du semis  $3\text{ g/m}^2$  soit 6 g/parcelle)

L'inoculation des tiges est effectuée à 30 jours avec l'inoculum d'alginat suspendu en tampon phosphate, à l'aide d'un pulvérisateur. A 50 jours, les plantes sont fauchées, découpées en fragments de 10 à 15 cm puis enfouies dans le sol à environ 20cm de profondeur.

Des échantillons de S. rostrata sont prélevés dans chaque parcelle pour la détermination de la biomasse produite (poids frais poids sec) et les teneurs en azote correspondantes.

L'ensemble des parcelles reçoit une fumure de fond équivalent à 40kg/ha de P (phosphate tricalcique). et 60 kg/ha de K (KCl).

Des plantules de riz d'une variété locale âgées de deux semaines ont été repiquées une semaine après l'enfouissement.

### 2.3. Utilisation de l'engrais vert *Sesbania rostrata* pour la culture du sorgho en microparcelles

Cette expérience a été réalisée à la station ORSTOM Bel-Air de Dakar, sur un sol de texture très sableuse (cf caractéristiques physico-chimiques en annexe).

L'engrais vert *S. rostrata* a été cultivé à proximité du dispositif expérimental dans des parcelles de 10m<sup>2</sup>.

Les graines traitées à l'acide sulfurique concentré et rincées à l'eau, ont été semées à la volée (densité équivalente à 30 kg/ha). Les tiges sont inoculées par pulvérisation d'une culture liquide diluée de la souche de *Rhizobium* ORS571, quatre semaines après le semis. Les plantes sont fauchées à 8 semaines, pesées et découpées en fragments de 10 à 15 cm, et enfouies dans les parcelles destinées à recevoir l'engrais vert, à une profondeur de 20cm environ. Un échantillonnage est préalablement effectué pour la détermination du poids sec et de la teneur en azote de la biomasse enfouie.

Le dispositif expérimental est constitué de 16 parcelles de 4m<sup>2</sup> disposées en carré latin (soit 4 répétitions par traitement)

Deux doses d'engrais vert sont utilisées :

$$S1 = 3,75 \text{ kg/m}^2 \text{ soit } 37,5 \text{ T/ha (poids frais)}$$

$$S2 = 7,5 \text{ kg/m}^2 \text{ soit } 75 \text{ T/ha (poids frais).}$$

Ces doses correspondent respectivement à 200 et 400 Kg-N/ha.

L'ensemble des traitements reçoit une fumure de fond:

40 kg/ha de P (phosphate tricalcique) et 60 kg/ha de K (KCl). Le traitement azote minéral reçoit l'équivalent de 150 kg/ha d'azote sous forme d'urée.

Le sorgho (variété CV 151-252) est semé sur l'ensemble des parcelles suivant un écartement de (20 x 20 cm). La récolte est effectuée 90 jours environ après le semis. Les rendements en grains et en pailles sont évalués après séchage et battage. L'azote total est déterminé suivant la méthode de Kjeldhal à l'aide du système de dosage Büchi (principe décrit au paragraphe 2.4 du Chapitre III).

#### 2.4. Utilisation de l'engrais vert *Sesbania rostrata* pour la culture du sorgho en milieu paysan

Cette expérience a été réalisée à Balandine (Casamance) avec la collaboration du groupement de jeunes paysans du village. (cf. caractéristiques physico- chimiques du sol en annexe)

##### 2.4.1. Culture de *S. rostrata*

Après scarification par abrasion, les graines sont mélangées à de l'inoculum d'alginate en poudre puis semées à la volée à une densité équivalente à 30 kg/ha.

Les tiges sont inoculées à 30 jours avec un inoculum préparé à partir d'un broyat de nodules frais prélevés au collet des plantes (technique décrite au paragraphe 2.1. de ce chapitre). L'enfouissement a lieu à 50 jours. Afin d'opérer dans des conditions aussi proches que possible de la jachère, nous n'avons effectué ni désherbage ni traitement phytosanitaire.

#### 2.4.2. Technique d'enfouissement de l'engrais vert et culture du sorgho

##### -Technique d'enfouissement de *S. rostrata*

Le billonnage est une technique de travail du sol très répandue en Casamance (Sud du Sénégal). Elle consiste à enfouir l'herbe en place sous le billon au moment de sa mise en place. Le billonnage est effectué à l'aide d'un outil spécifique appelé Kayendo (fig. 30).

Cette technique a été utilisée pour le travail du sol et l'enfouissement de l'engrais vert (fig. 31).

##### -Culture du sorgho

Le sorgho est cultivé dans des parcelles de (2 x 5 m) comportant deux billons de (0,4 x 5 m) chacun, soit une surface totale de 4m<sup>2</sup>.

Le dispositif expérimental comporte quatre traitements (1) azote minéral (apport d'urée correspondant à 60 kg/ha); (2) fumure organique (déjections d'animaux cf. caractéristiques physico-chimiques en annexe); (3) *S. rostrata* engrais vert; (4) témoin sans azote. L'ensemble des parcelles reçoit l'équivalent de 60kg/ha de P (phosphate tricalcique) et 40kg de K (KCl).

Une semaine après l'enfouissement de l'engrais vert, le sorgho (variété CV3), est semé sur billon en poquets avec un écartement de 20 cm. Le sorgho est récolté 90 jours après le semis. L'évaluation des rendements et la teneur en azote de la paille et des grains sont effectués après séchage.

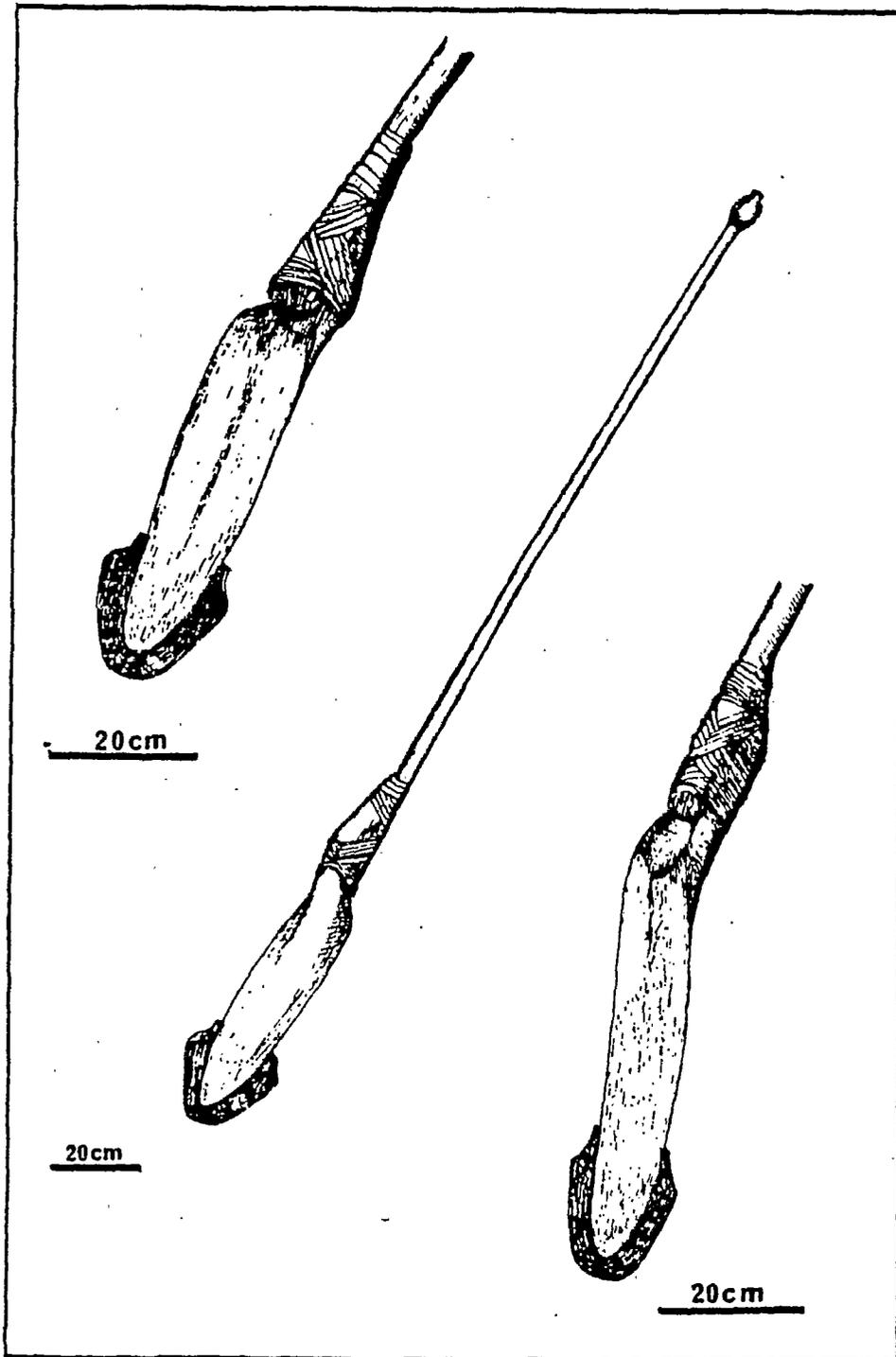


Fig. 30 : "Kayendo " (d'après Pelissier 1966)  
Outil utilisé pour le travail du sol en Casamance  
(Sud du Sénégal)

A



B



Fig. 31 A et B Enfouissement de l'engrais vert S. rostrata en billon à l'aide du Kayendo en milieu paysan

## 2.5. Utilisation de l'engrais vert *S. rostrata* en culture irriguée du riz

Une première expérience effectuée en microparcelles de 1m<sup>2</sup> avait montré qu'utilisé comme engrais vert, *S. rostrata* permettait de multiplier les rendements en riz par un facteur compris entre 2 et 3 (Rinaudo et al., 1982, 1983). Il s'agissait alors d'un essai réalisé sur sol de Bel-Air dont la texture est très sableuse.

Nous avons effectué une expérimentation de même type en microparcelles de 1m<sup>2</sup> mais cette fois sur sol de texture très lourde, le sol de Tilène est un sol alluvial hydromorphe représentatif des cuvettes de décantation du Delta du fleuve Sénégal (cf. caractéristiques physico-chimiques en annexe). De plus nous avons effectué deux cultures de riz consécutives.

Cette expérimentation a comporté trois traitements avec 6 répétitions (1) aucun apport d'azote, (2) 100 unités d'azote minéral apporté sous forme d'urée (20 g d'urée par parcelle) (3) culture et enfouissement de *S. rostrata* en engrais vert. Pour chaque culture de riz les microparcelles ont reçu en deux fois 33 unités de K et 60 unités de P (25,6g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 63g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> /m<sup>2</sup>).

Le semis de *S. rostrata* est effectué en lignes espacées de 20 cm, (environ 100 plantes/m<sup>2</sup>). Les plantes sont inoculées à 3 et 5 semaines par pulvérisation des tiges avec une culture de *Rhizobium* ORS571, puis coupées et enfouies à 2 mois.

Le repiquage du riz (variété cv.IKP) a été effectué 1 semaine après enfouissement avec des plantules de 2 semaines.

Pour la seconde culture de riz nous avons choisi une variété

de riz plus tolérante au froid, CV KM 998. Le repiquage du riz a été effectué avec des plantules de 3 semaines.

Pour les deux récoltes ont été déterminés : le poids de matière sèche des grains, de la paille, et l'azote total.

### 3. RESULTATS

#### 3.1. Efficiencie de différents types d'inoculum

Les résultats obtenus ont été reportés dans le tableau 29. Les activités les plus fortes sont obtenues avec l'inoculum liquide classique (culture bactérienne) et avec l'inoculum préparé à partir de nodules frais. Il en est de même pour le titre, et le nombre de nodules.

L'inoculum obtenu à partir de nodules frais présente l'avantage de pouvoir être préparé aisément sur le terrain : à partir de 5g de nodules on obtient 10 litres d'une suspension dont le titre est d'environ  $10^8$  bactéries/ml. L'inoculum préparé à partir de nodules secs ou l'inoculum d'alginate sont moins efficaces, mais ils doivent être considérés comme un moyen de conservation des Rhizobium.

#### 3.2. Effet de l'engrais vert S. rostrata sur les rendements de différentes cultures

##### 3.2.1. Rendement du riz cultivé en rizière de plateau

La quantité de biomasse produite par S. rostrata a été estimée à environ 1,7kg/m<sup>2</sup> poids frais et la quantité d'azote à 80kg-N/ha en 50 jours.

On constate (fig. 32 et tableau 30) qu'un apport de l'équivalent de 50 Kg d'azote minéral n'a que très peu d'effet sur le poids sec des pailles et des grains et sur leur teneur en azote.

En revanche l'engrais vert S. rostrata permet des augmenta-

Tableau :29. Effet de divers types d'inoculum sur la nodulation et l'ARA caulinaire de S. rostrata (inoculation à 4 semaines ; mesures à 7 semaines sur des portions de tige de 25 cm)

Inoculum		Nodulation		A R A
Nature	Titre (Nbre bactéries/ml)	Nbre nodules	Poids sec mg	( $\mu$ moles $C_2H_4/h$ )
Nod. frais	$3,8 \times 10^9$	424	661	154
Nod. secs	$1,4 \times 10^7$	315	338	60
Alginate	$1,6 \times 10^6$	89	205	33
Culture	$8,5 \times 10^8$	350	586	141

N.B. Chaque valeur est la moyenne de 4 répétitions

Fig. 32: Effet de l'engrais vert de *S. rostrata* sur les rendements du riz en rizière de plateau (Affiniam Casamance)

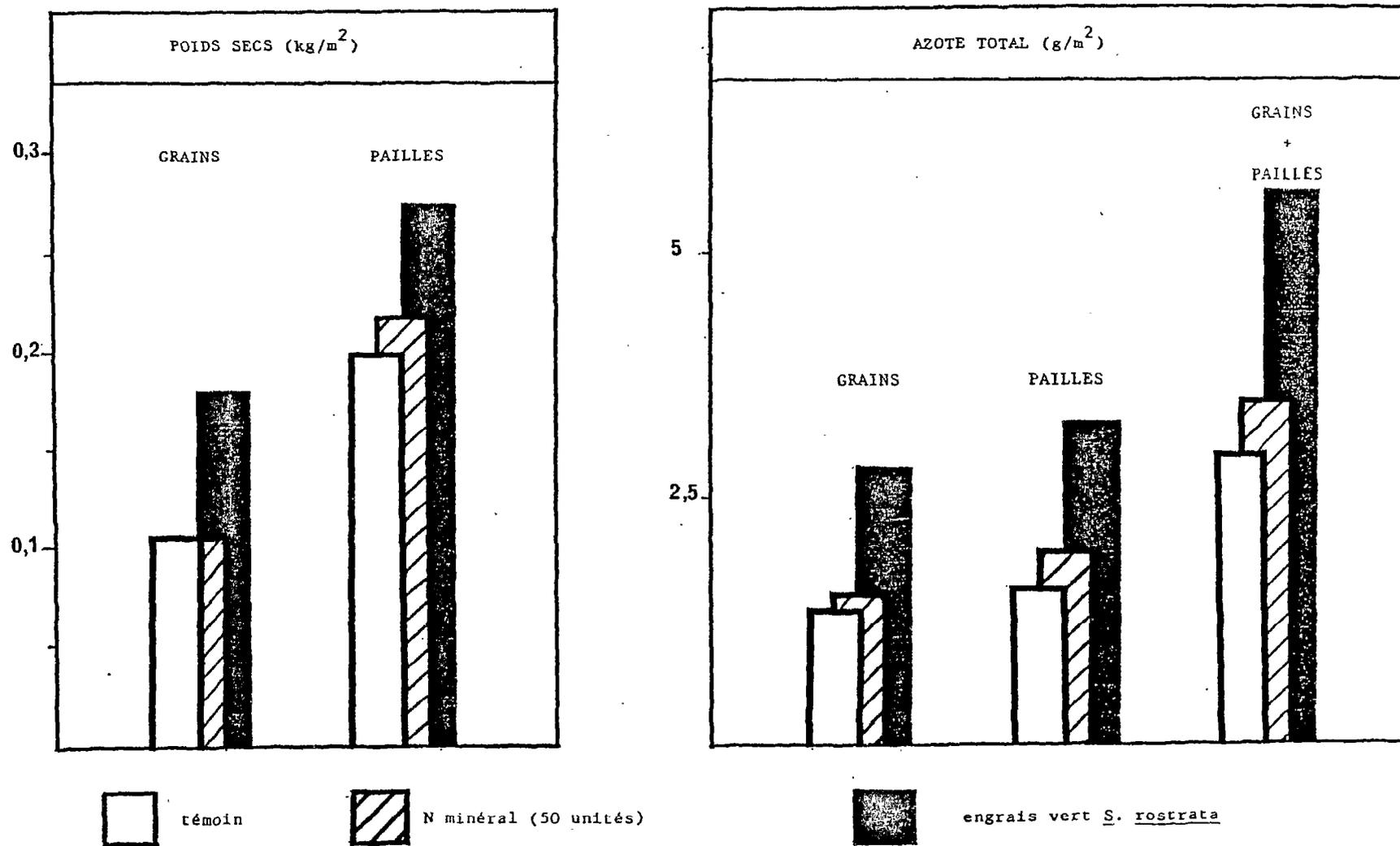


Tableau :30. Effet de l'engrais vert sur les rendements du riz cultivé en rizière de plateau (Affiniam - Casamance)

Traitements	Paille		Grain		Paille + Grain
	PS(g/m <sup>2</sup> )	N (g/m <sup>2</sup> )	PS(g/m <sup>2</sup> )	N(g/m <sup>2</sup> )	N(g/m <sup>2</sup> )
Témoin	399,3 a	3,1 a	211,5 a	2,7 a	5,7 a
50 unités N-urée	436,5 a	3,9 a	212,6 a	3,0 a	6,9 a
<u>S. rostrata</u> engrais vert	548,5 b	6,5 b	359,3 b	5,6 b	12,1 b

Dans chaque colonne les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05) (Test de Duncan 1955).

tions des rendements en grain et en paille ainsi que des teneurs en azote . On observe notamment un doublement de l'azote total des parties aériennes des parcelles ayant reçu l'engrais vert par rapport aux parcelles témoins. ( 12,17 et 5,78 gN/m<sup>2</sup> respectivement).

### 3.2.2. Rendements du sorgho cultivé en microparcelles

Les résultats obtenus (fig. 33-34 et tableau 31) mettent en évidence l'effet bénéfique de l'engrais vert de S. rostrata sur les rendements du sorgho.

Afin d'étudier l'influence de la quantité de biomasse enfouie sur le développement du sorgho, nous avons utilisé deux doses d'engrais vert, correspondant respectivement à 9,35 et 18,7 T/ha de matière sèche. On observe que l'incorporation au sol de S. rostrata aux deux doses utilisées a un effet comparable à un apport de 150 unités d'azote minéral sur la productivité du sorgho : les rendements en pailles et grains et leurs teneurs en azote, sont environ le double de ceux des parcelles témoins.

Les quantités d'azote incorporées sous forme d'engrais vert étaient très importantes : de l'ordre de 200 et 400 Kg /ha d'azote. L'utilisation d'une dose double est dans ce cas superflue.

### 3.2.3. Rendements du sorgho en milieu paysan

Dans la figure 35 nous avons représenté la pluviométrie par décade durant la culture de S. rostrata (entre le 13 Juin et le 1 Août 1985). La quantité de biomasse produite a été estimée à environ 1 kg (poids frais) par m<sup>2</sup> ce qui correspond à environ 60 kg-N/ha. L'irrégularité des pluies pendant la culture de S. rostrata pourrait expliquer la faiblesse de ces résultats.

Fig. 33 : Effet de l'engrais vert de *S. rostrata* sur les rendements du sorgho cultivé en microparcelles (Station ORSTOM Bel Air)

Sorgho CV 151-252

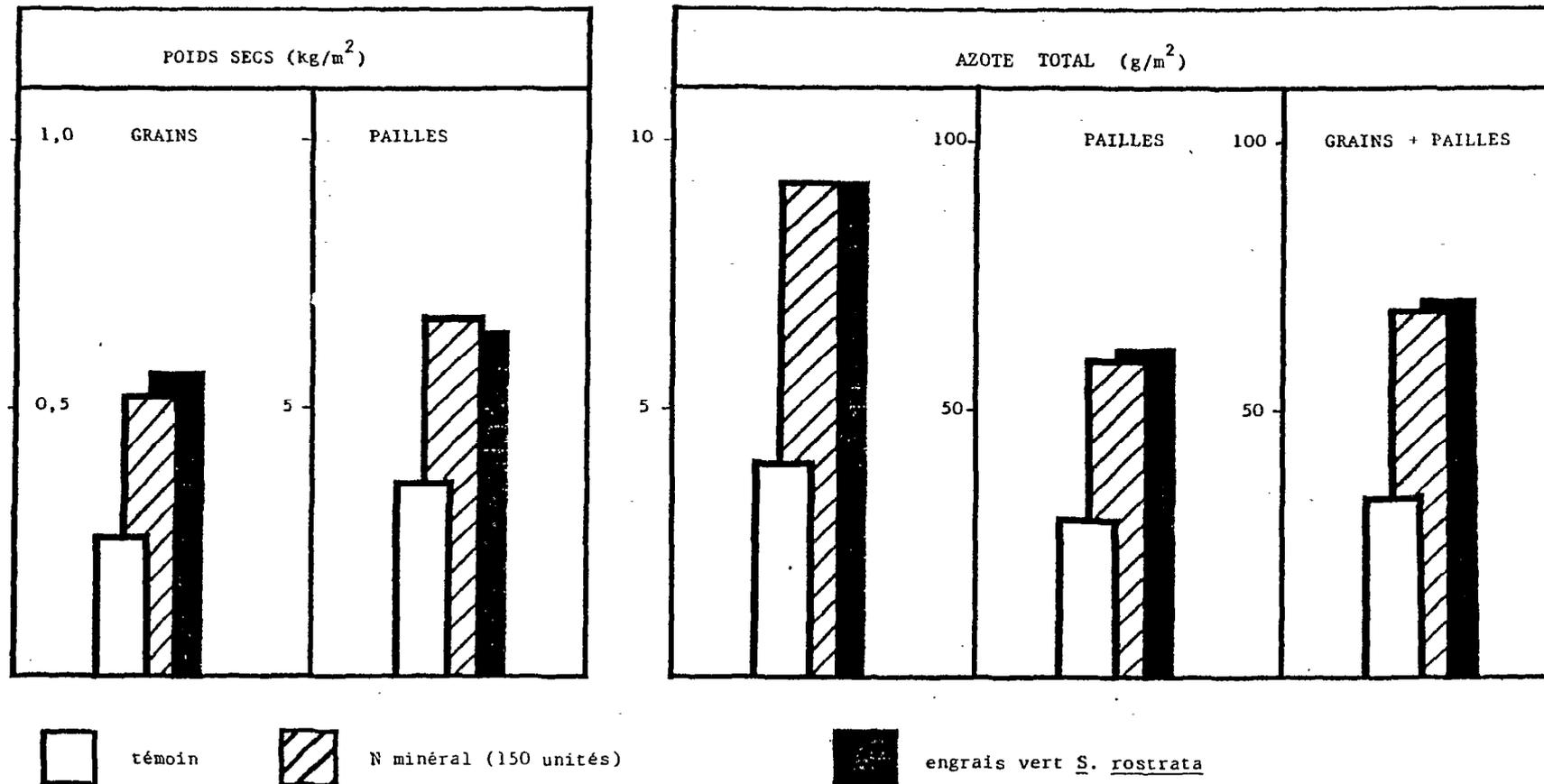
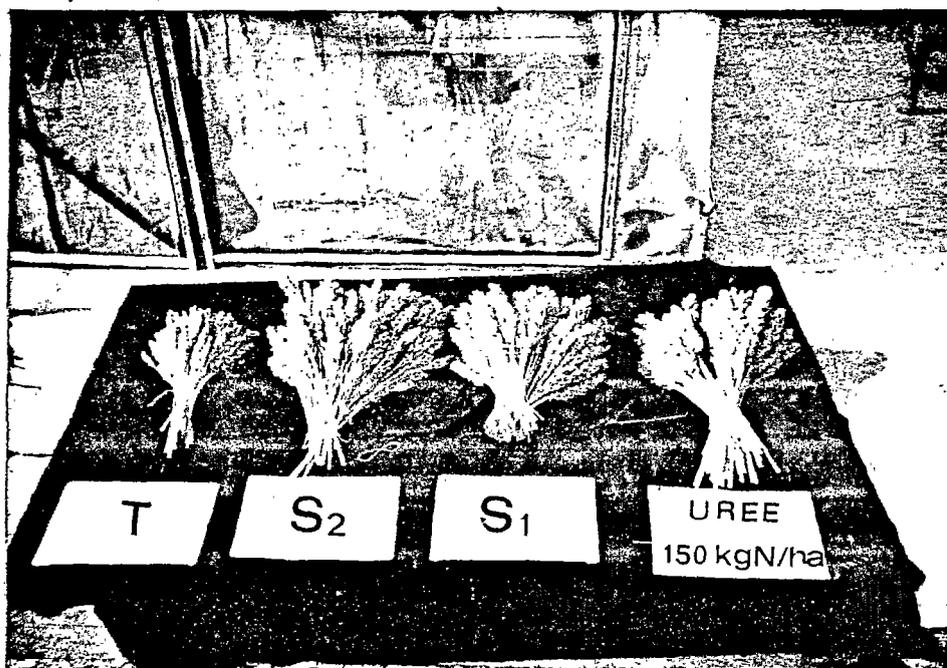


Fig. 34 : Effet de l'engrais vert sur la culture du sorgho



Sorgho à 45 jours



Rendements en grains

Tableau : 31. Effet de l'engrais vert sur les rendements du sorgho cultivé en microparcelles (Station ORSTOM Bel-Air)

Traitements	Paille		Grain		Paille + Grain
	PS (g/m <sup>2</sup> )	N (g/m <sup>2</sup> )	PS (g/m <sup>2</sup> )	N (g/m <sup>2</sup> )	N (g/m <sup>2</sup> )
Témoin	900 a	7,3 a	260 a	4,0 a	11,3 a
150 unités N.urée	1685 b	15,9 b	522 b	9,5 b	25,4 b
<u>S. rostrata</u> I*	1610 b	15,5 b	525 b	9,5 b	25,0 b
<u>S. rostrata</u> II**	1660 b	17,0 b	569 b	9,0 b	26,0 b

\* S. rostrata I : 9,35 t/ha (poids sec)

\*\* S. rostrata II: 18,7 t/ha (poids sec)

Dans chaque colonne les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05) (Test de Duncan 1955).

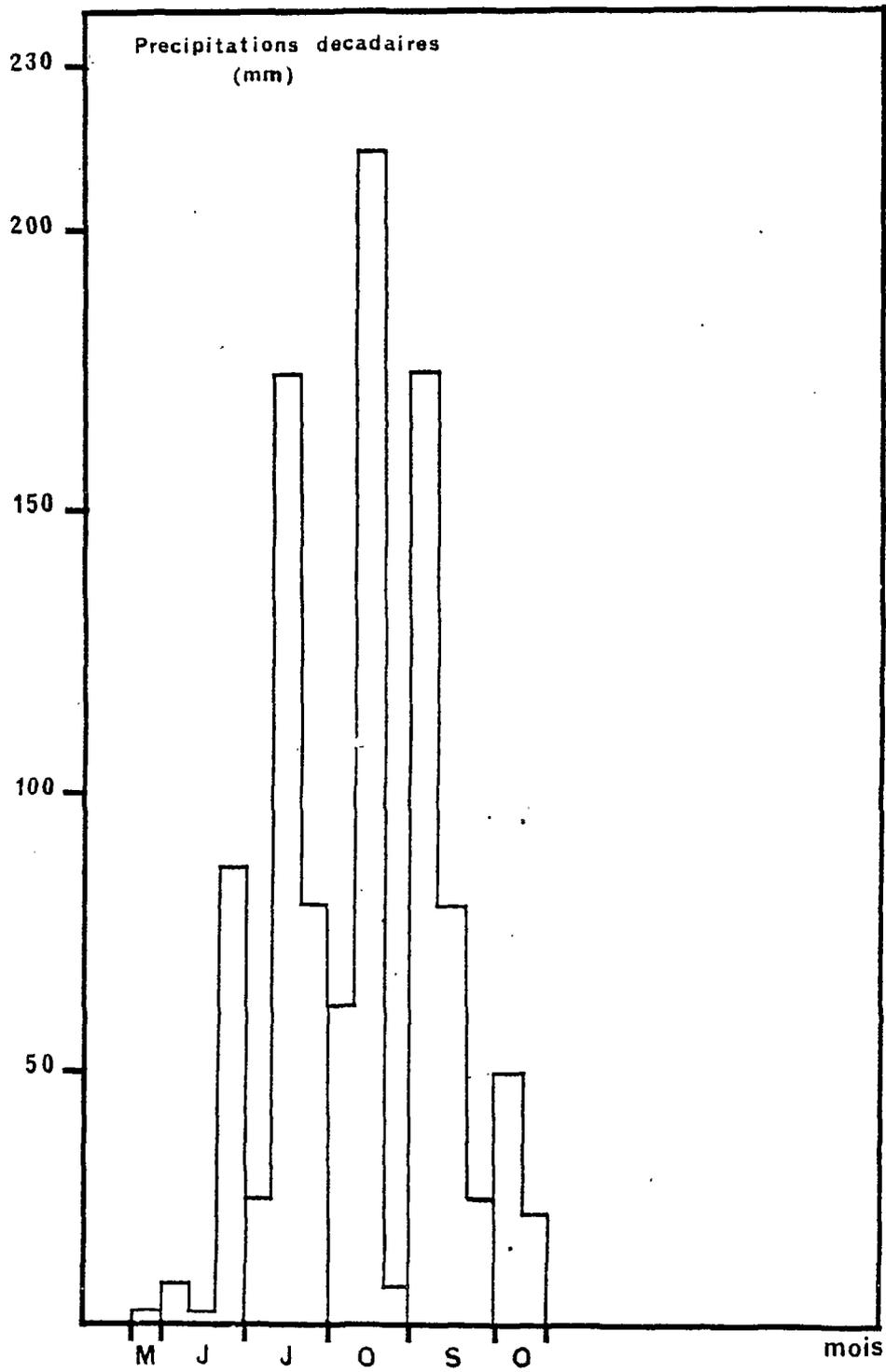


Fig. 35 : Niveau des précipitations à Balandine durant la croissance de S. rostrata

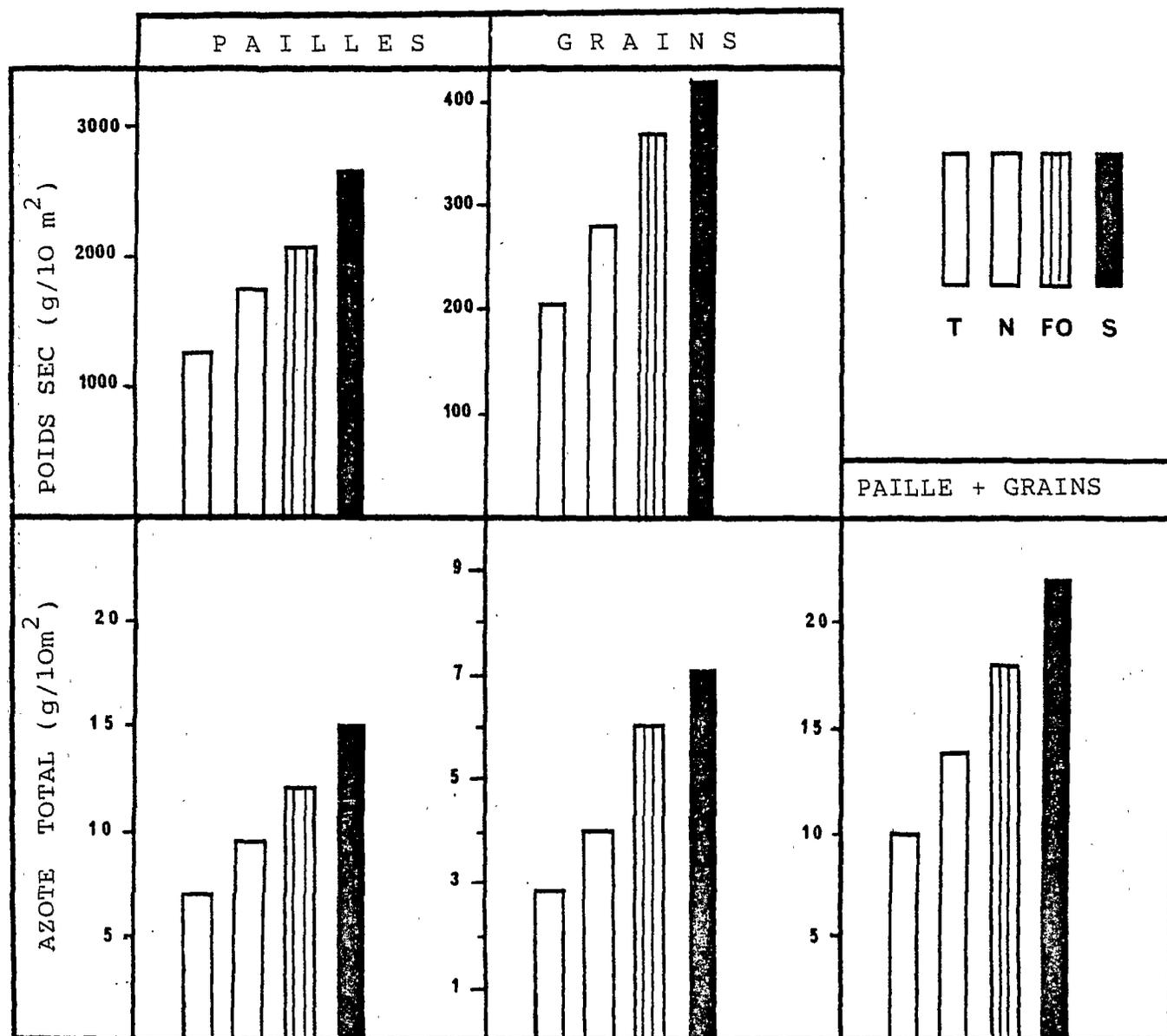


Fig. 36 : Effet de l'engrais vert sur les rendements du sorgho en milieu paysan (Balandine Casamance) (sorgho C.V.3)

Tableau 32. Effet de l'engrais vert sur les rendements du sorgho cultivé en milieu paysan (Balandine - Casamance)

Traitements	Paille		Grain		Paille + Grain
	PS(g/m <sup>2</sup> )	N(g/m <sup>2</sup> )	PS(g/m <sup>2</sup> )	N(g/m <sup>2</sup> )	N (g/m <sup>2</sup> )
Témoin	318,0 a	1,75 a	52,5 a	0,73 a	2,48 a
100 unités N.urée	478,0 b	2,6 b	76,0 b	0,85 ab	3,45 ab
Fumure organique	507,0 b	3,0 b	87,5 cb	1,42 bc	4,42 bc
<u>S. rostrata</u> engrais vert	662,0 c	3,7 c	105 c	1,95 c	5,65 c

Dans chaque colonne les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05) (Test de Duncan 1955).

L'engrais vert S. rostrata a un effet plus marqué sur les rendements du sorgho, que l'azote minéral apporté à une dose équivalente à 100 unités d'azote et la fumure organique (déjections d'animaux). Par rapport aux parcelles témoins, on observe, un doublement du poids sec des grains et des pailles ainsi que de la teneur en azote (fig. 36 et tableau 32).

Les rendements en grains obtenus en milieu paysan sont plus faibles que ceux que nous avons obtenus en microparcelles en station. (figure 34 et tableau 30). La différence des rendements observée pourrait s'expliquer d'une part, par la différence des écartements des semis (40 x 20 cm) en milieu paysan contre (20 x 20) en microparcelles ainsi que par la faiblesse de la biomasse de l'engrais vert enfouie ; d'autre part des attaques de saute-relles ont été observées au moment de l'épiaison du sorgho.

Cependant l'analyse des résultats obtenus sont significatifs et confirment l'effet bénéfique de l'engrais vert S. rostrata sur la culture du sorgho (fig. 36 et tableau 32).

#### 3.2.4. Rendements de deux cultures successives de riz irrigué

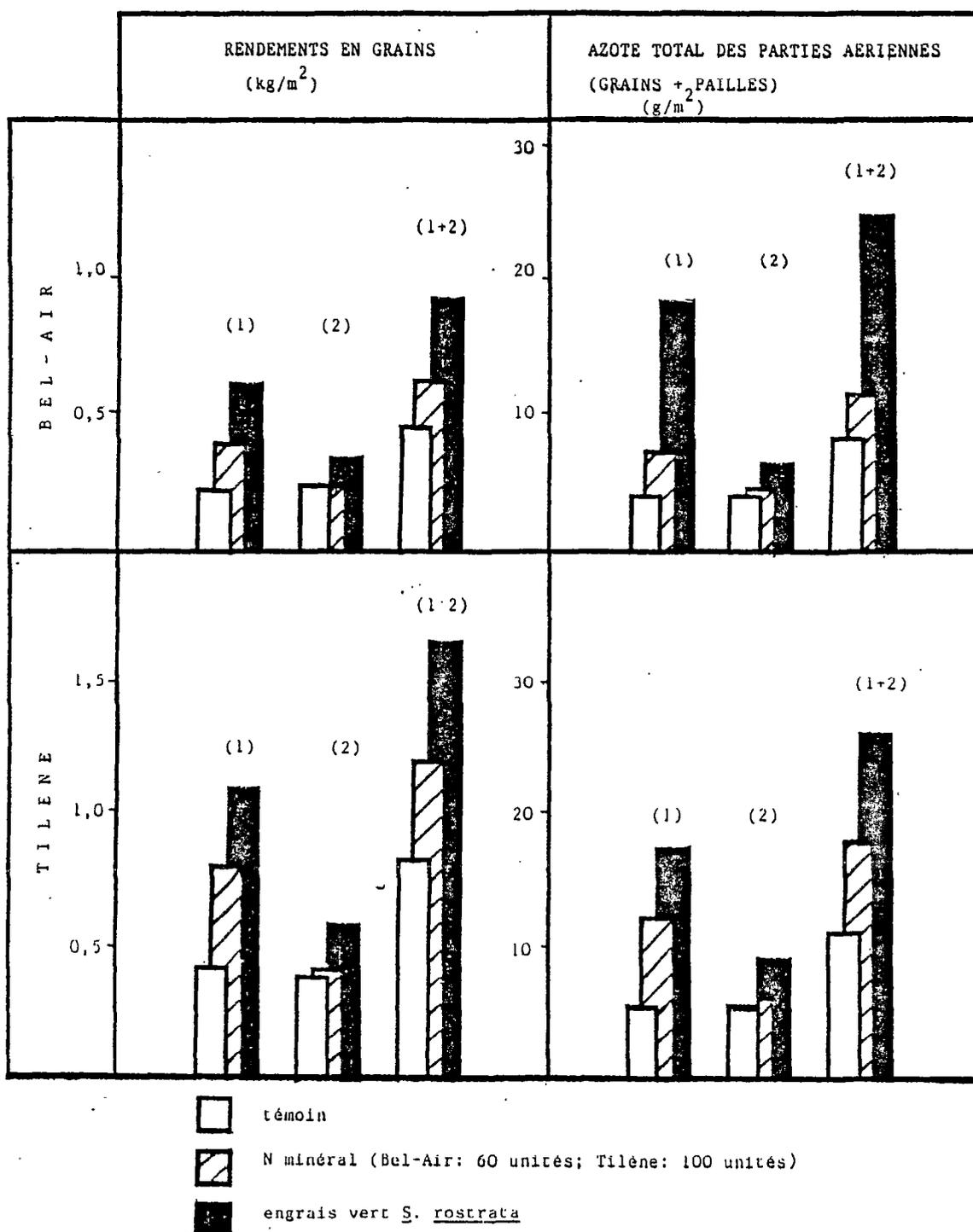
Les résultats obtenus sur sol de Tilène (texture argileuse) sont comparables à ceux obtenus par Rinaudo et al., (1982) sur sol de Bel-Air de texture sableuse. On observe des différences importantes entre les parcelles ayant reçu l'engrais vert, et les parcelles témoins les rendements en grains sont 2,5 fois supérieurs à ceux des parcelles témoins après la première culture de riz ; pour une seconde culture de riz, les rendements sont 1,5 fois supérieurs. (fig 37 et 38 ; tableau 33).

Fig. 37: Effet de l'engrais vert sur les rendements du riz irrigué cultivé en microparcelles (Station ORSTOM BEL-AIR)

- Comparaison des rendements sur sol argileux (Tilène) et sableux (BEL-AIR)

- Effet sur deux cultures successives de riz

(1) : CVIKP ; (2) : KM 998



**Tableau 33.** Effet de l'engrais vert sur la productivité du riz irrigué  
 (Deux cultures successives de riz sur sol de Tilène en microparcelles de 1m<sup>2</sup>)  
 (Station ORSTOM Bel-Air)

Traitements	Rendements en grains (g/m <sup>2</sup> )			Teneur en azote (g/m <sup>2</sup> )						
	(1)	(2)	(1 + 2)	Grains		Pailles		Grains + Pailles		
				(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1 + 2)
Témoin	415 a	391 a	806 a	3,34 a	3,66 a	2,02 a	1,95 a	5,37 a	5,61 a	10,98 a
100 unité N-urée	784 b	405 a	1189 b	6,49 b	3,6 a	5,47 b	2,16 a	11,99 b	5,76 a	17,75 b
Engrais vert <u>S. rostrata</u>	1081 c	569 b	1650 c	10,84 c	6,07 b	6,4 b	2,85 b	17,24 c	8,92 b	26,16 c

(1) Première culture de riz (CV IKP)

(2) Deuxième culture de riz (CV KM 998)

Dans chaque colonne les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05) (Test de Duncan 1955).



Fig. 38 : Effet de l'engrais vert *S. rostrata* sur les rendements du riz irrigué cultivé en microparcelles (Station ORSTOM BEL-AIR)

#### 4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Une nodulation spontanée des tiges peut être observée lorsque le sol renferme le Rhizobium spécifique. Cette nodulation est souvent limitée à la base des tiges et ne permet pas l'expression optimale des potentialités fixatrices de la plante. Il convient donc le plus souvent d'inoculer. Parmi les différents types d'inoculum testés, l'inoculum réalisé à partir d'un broyat de nodules frais est particulièrement intéressant : il peut être facilement préparé et utilisé au champ (fig. 29).

Les résultats obtenus avec le riz pluvial et le sorgho montrent que S. rostrata utilisé comme engrais vert peut être bénéfique non seulement dans le cas de cultures irriguées, mais aussi dans le cas de cultures exondées. On observe généralement un doublement du rendement en grain par rapport au témoin. Ces résultats ont été confirmés lors d'expérimentations réalisées par Camara et Diarra (1985); Mateugue(1985); I.R.R.I. (1986).

Compte-tenu de l'effet résiduel sur la deuxième culture (augmentation des rendements de l'ordre de 30%), l'effet global de l'engrais vert sur deux cultures de riz est de doubler les rendements en grains aussi bien sur sol argileux que sur sol sableux (fig. 39) (Rinaudo et Moudiongui, 1986).

Les expériences réalisées en milieu paysan, donnent lieu à des rendements en grains (riz et sorgho) inférieurs aux rendements obtenus en microparcelles. Cette faiblesse des rendements pourrait s'expliquer non seulement par la différence des conditions de culture, mais aussi par la quantité d'engrais

vert produite et enfouie, (elle est en moyenne de  $1\text{kg/m}^2$  poids frais en milieu paysan contre  $3,5\text{ kg/m}^2$  poids frais en microparcelles). L'irrégularité des pluies pendant la première période de l'expérience réalisée à Balandine (fig. 35) semble avoir limité la production de biomasse de S. rostrata. Ainsi donc la disponibilité en eau peut constituer un facteur limitant pour le développement de S. rostrata.

L'utilisation du Kayendo en milieu paysan a permis d'enfouir l'engrais vert sur billon, cette pratique présente l'avantage de s'intégrer au travail habituel du sol, qui consiste à enfouir l'herbe en place sous les billons au moment de la préparation du sol.

Cependant dans des conditions optimales de croissance la quantité de biomasse produite par S. rostrata peut atteindre  $40\text{ T/ha}$  (poids frais). C'est pourquoi l'utilisation de cet engrais vert à grande échelle devra faire appel à des moyens plus lourds tels que la culture attelée ou mécanisée.

CONCLUSION GENERALE



CONCLUSION GENERALE

Des souches de Rhizobium isolées à partir de S. rostrata provenant de différentes localités du Sénégal, ont été caractérisées par diverses techniques, puis comparées à la souche ORS571 précédemment isolée de S. rostrata par Dreyfus et Dommergues (1981).

La fixation symbiotique de l'azote par les légumineuses dépend de la plante, du microsymbiote et des conditions de l'environnement. Nous avons examiné l'effet de l'azote combiné sur la nodulation caulinaire et racinaire de S. rostrata, et sur l'activité réductrice d'acétylène. Les observations faites, ont pu être complétées par l'étude de la structure et de l'ultrastructure de nodules caulinaires développés en présence d'azote combiné.

Nous avons ensuite étudié l'effet de certains facteurs climatiques sur les différents paramètres de la symbiose entre Rhizobium et S. rostrata au cours de cycles végétatifs successifs initiés à différentes époques de l'année.

Afin d'évaluer les potentialités fixatrices de S. rostrata in situ nous avons utilisé la méthode de dilution isotopique N-15 pour évaluer la quantité d'azote fixé en 53 jours.

S. rostrata a été utilisé comme engrais vert pour la culture irriguée du riz, et en culture exondée (riz et sorgho). Des

essais ont été mis en place en station (ORSTOM Bel-Air) puis en milieu paysan en (Casamance Sud du Sénégal).

## PRINCIPAUX RESULTATS

### 1. Caractérisation de souches de Rhizobium isolées de Sesbania rostrata

Les techniques d'analyse que nous avons utilisées ont permis de mettre en évidence des différences importantes entre 8 des 9 souches que nous avons isolées et la souche de Rhizobium ORS571 déjà décrite (Dreyfus, 1982). La souche, Bam1 est la seule à présenter les mêmes caractères phénotypiques que Rhizobium ORS571.

- Une seule souche (Bam1) est sensible aux phages RS1 et RS2, spécifiques de Rhizobium ORS571.

- La souche GN15 est résistante au chloramphénicol et sensible à la novobiocine, la souche GN17 est résistante à la furadantine.

- Les souches GN15, GN17 et Bam1 ont le même contenu plasmidique que ORS571 (5,5  $10^6$  Dalton), les souches GN11 et Zig1 ont le même contenu plasmidique ( $12 \cdot 10^6$  Dalton). Un plasmide de  $8 \cdot 10^6$  Dalton a été mis en évidence chez la souche F9. les souches Nem1, Bam2 et GN20 ne contiennent pas de plasmide.

- L'étude des parentés immunologiques a permis de mettre en évidence trois groupes de Rhizobium. Les souches possédant des antigènes de surface reconnus par les anticorps anti

ORS571 (Nem1, F9, Bam1, et GN15) ; les souches non reconnues par l'anticorps anti ORS571 (GN20, Zig1, GN11) et la souche GN17 qui présente une fluorescence intermédiaire.

- L'étude de l'activité nitrogénase en condition de dérégulation a permis de mettre en évidence trois groupes de Rhizobium selon leur sensibilité à l'oxygène : quatre souches (GN11, GN15, Bam1 et Bam2) présentent une activité nitrogénase maximale en présence de 3% d'oxygène comme ORS571. Par contre les souches GN 17, GN20, F9 et Zig1 présentent une activité nitrogénase maximale en présence de 5% d'oxygène. La souche Nem1 est la seule à ne pas présenter d'activité réductrice d'acétylène aux deux tensions d'oxygène.

L'aptitude à fixer l'azote en culture libre semble être une caractéristique commune aux souches de "Rhizobium de tiges".

## 2. Effet de l'azote combiné sur la symbiose entre Rhizobium S. rostrata

L'effet de l'azote combiné sur la symbiose entre Rhizobium et S. rostrata a été étudié au moyen de plusieurs dispositifs de culture de plante. Les résultats obtenus ont montré que la présence de l'azote combiné influe sur la nodulation de S. rostrata, la nodulation caulinaire étant cependant moins affectée par l'azote combiné que la nodulation racinaire.

A l'aide de la microscopie photonique et de la microscopie électronique nous avons montré que la dernière étape du processus d'infection de la nodulation caulinaire (libération des

bactéries contenues dans le cordon d'infection dans le cytoplasme des cellules du méristème nodulaire) était bloquée par de fortes doses d'azote combiné (12 mM-N )

### 3. Fixation caulinaire d'azote par *S. rostrata* au cours de cycles végétatifs initiés à différentes époques de l'année

Des cycles végétatifs successifs de *S. rostrata* ont été initiés à différentes époques de l'année.

Cette étude a montré que la croissance et l'activité fixatrice dépendaient étroitement des conditions climatiques (température et photopériode notamment). D'autre part, il est apparu qu'en condition d'hydromorphie permanente, la fixation d'azote était due essentiellement aux nodules caulinaires (96% environ de l'activité totale).

### 4. Evaluation de l'azote fixé par *S. rostrata*

Pour estimer l'azote fixé par *S. rostrata* nous avons utilisé la méthode " par différence " et la méthode de dilution isotopique N-15. Les résultats obtenus ont montré que *S. rostrata* a des potentialités fixatrices d'azote exceptionnelles : de l'ordre de 30gN/m<sup>2</sup>, soit 300kg N/ha par extrapolation.

### 5. Utilisation de *S. rostrata* comme engrais vert

Une nodulation spontanée des tiges peut être observée mais en général elle ne permet pas l'expression optimale des potentialités fixatrices de la plante, et il est donc souhaitable d'inoculer. Parmi les types d'inoculum que nous avons testé, l'inoculum réalisé à partir de broyat de nodules frais possède

L'avantage d'être facile à préparer et utilisé au champ.

Les résultats obtenus avec le riz pluvial et le sorgho ont montré que S. rostrata utilisé comme engrais vert peut être bénéfique non seulement dans le cas de culture irriguée du riz, mais également dans le cas de cultures exondées (riz et sorgho).

Les expériences réalisées en milieu paysan ont montré que la disponibilité en eau constituait l'un des principaux facteurs limitant le développement de S. rostrata. Nous avons estimé la production de biomasse en milieu paysan (Casamance) à environ  $1\text{kg/m}^2$  alors que nous avons obtenue  $3,5\text{ kg/m}^2$  en microparcelles en station. Les quantités d'azote enfouies ont été estimées à environ  $60\text{ kg/ha}$  en milieu paysan et  $200\text{ kg/ha}$  en station.

L'enfouissement de l'engrais vert en billon à l'aide de Kayendo reste pour l'instant la méthode la plus adaptée en Casamance. Cependant l'utilisation de l'engrais vert à grande échelle devrait faire appel à des outils de travail plus lourds comme la culture attelée, ou mécanisée.



BIBLIOGRAPHIE



BIBLIOGRAPHIE

- Allen, E.K. & Allen, O.N. (1950). Biochemical and symbiotic properties of the Rhizobia. Bacteriological Reviews 14 : 273-330.
- Appleby, C.A. (1974). Leghemoglobin. In : The Biology of Nitrogen Fixation, Quispel A., (ed.), North Holland, Amsterdam. pp. 520-554.
- Atkins, C.A., Pate, J.S. & Layzell, D.B. (1979). Assimilation and transport of nitrogen in non nodulated (NO<sub>2</sub>-grown) Lupinus albus L. Plant Physiol. 64 : 1078-1082.
- Atkins, C.A., Pate, J.S., Griffiths, J. & White S.T. (1980). Economy of nodulated and non-nodulated (NO<sub>2</sub>-grown) cowpea (Vigna unguiculata (L) Walp). Plant Physiol. 66 : 978-983.
- Avisar, Y.T. & Nadler, K.D. (1978). Stimulation of tetrapyrrole formation in Rhizobium japonicum by restricted aeration. J. Bacteriol., 135 : 782-789.
- Bardin, R., Domenach, A.M. & Chalamet, A. (1977): Rapports isotopiques naturels de l'azote II. Applications à la mesure de la fixation symbiotique de l'azote in situ. Rev. ecol. Biol. Sol. 14 : 395-402.
- Bauer, W.D. (1981). Infection of legumes by Rhizobia Ann. Rev. Plant. Physiol. 32 : 407-449.
- Becker, M., Alazard, D. & Ottow, J.C.G. (1986). Mineral nitrogen effect on nodulation and nitrogen fixation of the stem-nodulating legume Aeschynomene afraspera. Z. Pflanzen-ernaehr. Bodenk. 149 : 485-491.
- Bender, G.L., Plazinski, J. & Rolfe, B.G. (1986). Asymbiotic acetylene reduction by a fast Rhizobium strain with nitrogenase structural genes located on a symbiotic plasmid. Appl. Environ. Microbiol. 51 : 868 - 871.
- Bergersen, F.J. (1978). Leghaemoglobin, oxygen supply and nitrogen fixation : studies with soybean nodules. In : Limitation and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics. Dobereiner, J., Burris, R.H., & Hollaender, A. (eds), New York & London : Plenum Press, pp. 274-261.
- Berhaut, J. (1976). Flore illustrée du Sénégal. Clairafrique Dakar p.56.

- Beringer, J.E., Brewin, N.J., Johnston, A.W.B. (1980). The genetic analysis of Rhizobium in relation to symbiotic nitrogen fixation. *Heredity* 45 : 161-186.
- Bethlenfalvay, G.J. & D.A. Phillips (1978). Interaction between symbiotic nitrogen fixation, combined-N application and photosynthesis in Pisum sativum. *Physiol. Plant.* 42 : 119-123.
- Bisseling, T., Bos, R.C. Van Den & Kammen, A. Van (1978). The effect of ammonium nitrate on the synthesis of nitrogenase and the concentration of leghemoglobin in pea root nodules induced by Rhizobium leguminosarum. *Biochim. Biophys. Acta.* 539 : 1-11.
- Bogusz, D., Kortt, A.A. & Appleby, C.A. (1987). Sesbania rostrata root and stem nodule leghemoglobins : Purification, and relationships amongst the seven major components. *Arch. Biochem., sous presse.*
- Buikema, W.J., Szeto, W.W., Lemley, P.V. Orme Johnson, W.H., & Ausubel F.M. (1985). Nitrogen fixation specific regulator genes of Klebsiella pneumoniae and Rhizobium meliloti share homology with the general nitrogen regulatory gene ntr C of K. pneumoniae nif DNA and characterized. *Mol. Gen. Genet.* 174 : 59-66.
- Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. (1974). *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Bremmer, J.M. (1975). Use of nitrogen-tracer techniques for research on nitrogen fixation. In : *Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics*, Ayanaba, A. & Dart, P.J. (eds), John Wiley & Sons, Chichester pp. 335-352.
- Camara, I., Diara, H. (1985). Evaluation de la valeur agronomique de Sesbania rostrata comme source d'azote en riziculture irriguée dans la vallée du Fleuve Sénégal. Séminaires sur les arbres fixateurs d'azote et sur la biologie des sols. CRDI-FIS-ORSTOM-NFTA. 17-25 Mars 1986, Dakar - Sénégal.
- Carroll, B.J. & Greshoff, P.M. (1983). Nitrate inhibition of nodulation and nitrogen fixation in white clover. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 110 : 77-88.
- McComb, J.A., Elliot, J., Dilworth, M.J. (1975). Acetylene reduction by Rhizobium in pure culture. *Nature (London)* 256 : 409-410.

- Corbin, D., Barran, L. & Ditta, G. (1983). Organization and expression of Rhizobium meliloti nitrogen fixation genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 3005-3009.
- Cutting, J. & Schulman, H.M. (1972). The control of heme synthesis in soybean root nodules. Biochem. Biophys. Acta, 261 : 321-327.
- Dao The Tuan & Tran Quang Thuyet (1979). Use of Azolla in rice production in Vietnam, In : Nitrogen and rice. The International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines pp. 395-405.
- Darbyshire J.F. (1966). Studies on the physiology of nodule formation IX. The influence of combined nitrogen glucose light intensity and day length on root hair infection. Ann. Bot. 30, 120 : 623-638.
- Darrow, R.A. & Knotts, R.R. (1977). Two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. Biochem. Biophys. Res. Comm. 275 : 554-559.
- Dart, P.J. (1977). Infection and development of leguminous nodules. In : A treatise on nitrogen fixation . Hardy, R.W.F. & Silver, W.S. (eds), Wiley, J. & Sons New York pp. 367-412.
- Dazzo, F.B. and Brill, W.J. (1978). Regulation by fixed nitrogen of host symbiot recognition in the Rhizobium-Clover Symbiosis. Plant Physiol. 62 : 18-21.
- Dilworth, M.J. (1966). Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from Clostridium pasteurianum. Biochem. Biophys. Acta. 127 : 285-294.
- Donald, R.G.K. & Ludwig R.A. (1984). Rhizobium sp. ORS571 ammonium assimilation and nitrogen fixation. J. Bacteriol. 158 : 1144-1151.
- Donald, R.G.K., Nees, D.W., Raymond, C.K., Loroch, A.I. & Ludwig, R.A. (1986). Characterization of three genomic loci encoding Rhizobium sp. strain ORS 571 N fixation genes. J. Bacteriol. 165 : 72-81.
- Downie, J.A., Ma, Q.S., Wells, B., Knight, C.D., Hombrecher G. & Johnston, A.W.B. (1984). Cloning of the symbiotic region of Rhizobium leguminosarum : the nodulation genes are between the nitrogenase genes and a nif A-like gene. Embo J. 2 : 947-952.
- Dreyfus, B.L. & Dommergues Y.R. (1980). Non-inhibition de la fixation d'azote atmosphérique par l'azote combiné chez une légumineuse à nodules caulinaires, Sesbania rostrata. C.R. Hebd. Scéances Acad. Sci. 291 : 767-770.

- Dreyfus, B.L. & Dommergues Y.R. (1981). Nitrogen-fixing nodules induced by Rhizobium on the stem of the tropical legume, Sesbania rostrata. FEMS Microbiol. Lett. 10 : 313-317.
- Dreyfus, B.L. (1982). La symbiose entre Rhizobium et Sesbania rostrata, légumineuse à nodules caulinaires. Thèse de Doctorat d'Etat. Université Paris VII.
- Dreyfus, B.L., Elmerich, C. & Dommergues Y.R. (1983). Free-living Rhizobium strain able to grow on N<sub>2</sub> as the sole nitrogen source Appl. Environ. Microbiol. 45 : 711-713.
- Dreyfus, B., Garcia, J.L. & Gillis, M. (1987). Characterization of Azorhizobium caulinodans gen. nov. sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from Sesbania rostrata. Soumis à publication à Int. J. Syst. Bacteriol.
- Duhoux, E. & Dreyfus, B. (1982). Nature des sites d'infection par le Rhizobium de la tige de la légumineuse Sesbania rostrata Brem. C.R. Hébd. Séances Acad. Sci. 294 : 407-411.
- Duhoux, E. (1984). Ontogénèse de nodules caulinaires de Sesbania rostrata (légumineuse). Can. J. Bot. 62 : 982-994.
- Eady, R.R., Smith, B.E., Cook, K.A. & Postgate, J.R. (1972). Nitrogenase of Klebsiella pneumoniae. purification and properties of the component proteins. Biochem. J. 128 : 655-675.
- Eaglesham A.R.J. & Szalay, A.A. (1983). Aerial stem nodules on Aeschynomene spp. Plant Sci. Lett. 10 : 313-317.
- Eckhardt, T. (1978). A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid 1 : 584-588.
- Elmerich, C., Dreyfus, B.L., Reysset, G. & Aubert, J.P. (1982). Genetic analysis of nitrogen fixation in a tropical fast-growing Rhizobium. EMBO J. 1 : 499-503.
- Fiedler, R. & Proksch, G. (1972). Emission spectrometry for routine analysis of N-15 in agriculture. Plant soil 36: 371-378
- Fiedler, R., Proksch, G., (1975). The determination of nitrogen-15 by emission and mass spectrometry in biochemical analysis : a review. Anal. Chem. Acta. 78 : 1-62.
- Franche, C. & Reynaud, P.A. (1985). Characterisation of several tropical Anabaena et Nostoc strains : morphological and physiology properties plasmid content. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol 137 A : 179-197.

- Fried, M. & Broeshart, H. (1975). An independant measurement of the amount of nitrogen fixed by a legume crop. *Plant Soil* 43: 707-701.
- Fried, M. & Middleboe, V. (1977). Measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop. *Plant Soil* 47 : 713-715.
- Gebhardt, C. & Bergersen, F.J. (1983). Continuous culture of a Rhizobium strain (ORS571) fixing nitrogen in culture with new and unusual characteristics. Veeger, C. & Newton, W.E. (eds), Nijhoff & Junk, The Hague. p. 254.
- Gibbins, A. M. & Gregory, K. E. (1972). Relatedness among Rhizobium and Agrobacterium species determined by tree methods of nucleic acid hybridization. *J. Bacteriol.* 111:129-141
- Gibson, A.H. (1976). Recovery and compensation by nodulated legumes to environmental stress. In : *Symbiotic nitrogen fixation in plants* Nutman, P.S. (eds), Cambridge : Univ. Press pp. 385-403.
- Gibson, A.H. & Pagan, J.D. (1977). Nitrate effects on the nodulation of legumes inoculated with nitrate-reductase deficient mutants of Rhizobium. *Planta* 134 : 17-22.
- Gibson, A.H., Scowcroft, W.R. & Pagan, J.D. (1977). Nitrogen fixation in plants : an expanding horizon ? In : *Recent developments in nitrogen fixation*, Newton, W. Postgate, J.R. & Rodriguez Barrueco (eds), Academic Press, London New York, San Francisco 387-417.
- Goleb, J.A., & Middelboe, V. (1968). optical nitrogen-15 analysis of small samples with a mixture of helium and xenon to sustain the discharge in an electrodeless tube. *Anal. chim. Acta.* 43 : 229-234.
- Graham, P.H. (1964). The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. *J. Gen. Microbiol.* 35 : 511-571.
- Guiraud, G. & Buscarlet (1975). Comparaison entre spectrométrie de masse et spectrométrie d'émission pour l'analyse isotopique de l'azote IJARDI. 26 : 187-193.
- Guiraud, G. & Fardeau, J.C. (1980). Détermination isotopique par spectrométrie optique de composés faiblement enrichis en azote-15. *Analysis* 4 : 148-152.
- Guiraud, G. (1984). Contribution du marquage isotopique à l'évaluation des transferts d'azote entre les compartiments organiques et minéraux dans les systèmes sol-plantes. Thèse de Doctorat d'Etat. Université Paris VI.

- Ham, G.E., Lawn, R.J. & Brun, W.A. (1976). Influence of inoculation, nitrogen fertilizers and photosynthetic source-sink manipulations on field-grown soybean. In : Symbiotic nitrogen fixation in plants, Nutman, P.S. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, London ; New York ; Melbourne, pp. 421-439.
- Hardy, R.W.F., Holsten, R.D., Jackson, E.K. & Burns, R.C. (1968). The acetylene assay for N fixation ; Laboratory and field evaluation Plant Physiol. 43 : 1185-1207.
- Hardy, R.W.F. & Havelka, U.D. (1976). Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field-grown legume with emphasis on soybeans. In : Symbiotic nitrogen fixation in plants. Nutman, P.S. (eds), Cambridge University Press, London pp. 421-439.
- Harper, J.E. & Gibson, A.H. (1984). Differential nodulation tolerance to nitrate among legume species. Crop Science. 24 : 797-801.
- Haugland, R. and Verma, D.P.S. (1981). Interspecific plasmid and genomic DNA sequence homologies and localization of nif genes in effective and ineffective strains of Rhizobium japonicum. J. Mol. Appl. Genet. 1 : 205-217.
- Heberlein, G., De Ley, J. & Tijtgat, R. (1967). Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of Agrobacterium, Rhizobium, Chromobacterium. J. Bacteriol. 94 : 116-124.
- Hinson, K. (1975). Nodulation response from nitrogen applied to soybean half-root system. Agron. J. 67, 799-804.
- Holsters, M., Van Den Eede, G., Goethals & Van Montagu M., Dreyfus, B. (1987). Nodulation genes of the stem nodulating Sesbania rostrata symbiont, strain ORS 571. In : Molecular genetics of plant-microbe interactions. Verma, D.P.S., Brisson, N. (eds), Martinus Nijhoff, Dordrecht ; Boston ; Lancaster pp. 208-210.
- Houwaard, F. (1978). Influence of ammonium chloride on the nitrogenase activity of nodulated pea plants (Pisum sativum). Appl. Environ. Microbiol. 35 : 1061-1065.
- Houwaard, F. (1980). Influence of ammonium and nitrate nitrogen on nitrogenase activity of pea plants as affected by light intensity and sugar addition. Plant and Soil 34 : 271-282.

- International Rice Research Institute (1985). Annual Report for 1984. P.O. Box 933, Manila, Philippines. 548 p.
- International Rice Research Institute (1986). Annual Report for 1985. P.O. Box 933, Manila, Philippines. 555 p
- Israel, D.W., Howard, R.L., Evans, J. & Rekosh, D.K. (1974). Purification and characterization of the molybdenum-iron protein component of nitrogenase from soybean nodule bacteroids. *J. Biol. Chem.* 249 : 500-508.
- Jackson, M.L. (1958). Soil chemical analysis ; Prentice-Hall, Inc Englewood Cliffs, New Jersey. pp. 197.
- Jarvis, B.D.W., Gillis, M. & De Ley, J. (1986). Intra- and intergeneric similarities between the ribosomal ribonucleic acid cistrons of Rhizobium and Bradyrhizobium species and some related bacteria. *Int. J. Syst. bacteriol.* 36 : 129-138.
- Jordan, D.C. & Allen, O.N. (1974). *Bergey's manual of determinative bacteriology* 8th ed., pp. 261-264.
- Jordan, D.C. (1982). Transfer of Rhizobium japonicum Buchanan 1980 to Bradyrhizobium gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plant. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32 : 136-139.
- Kanazawa, N., (1984). Trends and economic factors affecting organic manures in Japan. In : Organic mater and rice pp. 557-567. The International Rice Research Institutue, Los Banos, Philippines.
- Kefford, N.P., Brockwell, J. & Zwar, J.A. (1960). The symbiotic synthesis of auxin by legumes and nodules bacteria and its role in nodule development. *Aust. J. Biol. Sci.* 13 : 456-467.
- Kishinevsky, B., Bar-Joseph, M. (1978). Rhizobium strain identification in Arachis hypogaea nodules by enzyme-linked immunosorbent assay (E.L.I.S.A.). *Can. J. Microbiol.* 24 : 1537-1543.
- Keister, D.L. (1975). Acetylene reduction by pure cultures of Rhizobia. *J. Bacteriol.* 123 : 1265-1268.
- Kennedy, I.R., Rigaud, J. & Trinchant, J.C. (1975). Nitrate reductase from bacteroids of Rhizobium japonicum : enzyme characteristics and possible interaction with nitrogen fixation. *Biochem. Biophys. Acta.* 397 : 24-35.
- Keyser, H.H., Bohlool, B.B., Hu, T.S., Weber, D.F. (1982). fast-growing Rhizobia isolated from root nodules soybean. *Science*, 215 : 1631-1632.

- Kondorosi, E., Banfalvi, Z. & Kondorosi, A. (1984). Physical and genetic analysis of a symbiotic region of Rhizobium meliloti identification of nodulation genes. *Mol. Gen. Genet.* 193 : 445-452.
- Kush, A., Elmerich, C. & Aubert, J.P. (1985). Nitrogenase of Sesbania Rhizobium strain ORS 571 : Purification, properties and "Switch-off" by ammonia. *J. Gen. Microbiol.* 131 : 1765-1777.
- De Lajudie, P., Bogusz, D. (1984). Isolation and characterization of two bacteriophages of a stem-nodulating Rhizobium strain from Sesbania rostrata. *Can. J. Microbiol.* 30 : 521-525.
- De Lajudie, P., Huguët, T. (1987). Plant gene expression during effective and ineffective nodule development of the tropical stem-nodulated legume Sesbania rostrata. In : *Molecular Genetics of Plant-microbe interaction.* Verma, D.P.S. & Brison, N. (eds), Martinus Nijhoff, Dordrecht ; Boston Lancaster pp. 130-132.
- LaRue, T.A. & Patterson, T.G. (1981). How much nitrogen do legumes fix? *Advances in Agronomy* 34:15-38 .
- Latimore, Jr., Giddens, J. & Ashly, D.A. (1977). Effect of ammonium and nitrate nitrogen upon photosynthate supply and nitrogen by soybeans. *Crop. Sci.* 17 : 399-404.
- Legocki, R.P., Eaglesham, A.R.J. & Szalay, A.A. (1983). Stem nodulation in Aeschynomene : A model system for Bacterium-plant interactions. In : *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction.* A. Pühler (ed.), Springer Verlag Berlin, pp. 210-219.
- Leickman, J.P., Middelboe, V. & Proksch, G. (1968). Analyse isotopique de l'azote par spectroscopie optique pour de faibles teneurs en N-15. *Anal. Chim. Acta* 40 : 487-502.
- Lemasson, L., Pages, J. & Guiraud, G. (1982). Routine N-15 analysis on small samples by emission spectrometry. *Analisis* 10 : 23-30.
- De Ley, J. (1969). DNA Base composition and hybridization in the taxonomy of phytopathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathology.* 6 : 63-90.
- Libbenga, K.R. & Torrey, J.G. (1973). Hormone induced endoreduplication prior to mitosis in cultured pea root cortex cells. *Amer. J. Bot.* 60 : 293-299.

- Lie, T.A. (1974). Environmental effects on nodulation and symbiotic nitrogen fixation. In : The biology of nitrogen fixation. Quispel, A. (ed.), North Holland Publishing Company, Amsterdam. pp. 555-582.
- Lison, L. (1960). Histochimie et cytochimie animale. Principes et Méthodes. Gauthier-Villars, Paris.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.
- Ludwig, R.A. (1978). Control of ammonium assimilation in Rhizobium 32 H1. J. Bacteriol. 135 : 114-123.
- Ludwig, R.A. (1986). Rhizobium sp. strain ORS571 grows synergistically on N and nicotinate as N sources. J. Bacteriol. 165: 304-307.
- Lumpkin, T.A. & Plucknett, D.L. (1982). Azolla as green manure. Westview Tropical Agriculture series. Westview Press, Boulder Co, USA, 230 pp.
- Van Mannelje, Z. (1967). A re-examination of the taxonomy of the genus Rhizobium and related genera using numerical analysis. Antonie Van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol. 33 : 477-491.
- Martin, F., Maudinas, B., Chemardin, M. & Gadal, P. (1981). Preparation of submicrogram nitrogen samples for isotope analysis by the GS1 emission spectrometer. IJARI 32 : 215-217.
- Marcker, K.A. (1982). The organisation of the leghemoglobin genes upon the soybean chromosome. In : Proceeding of 1<sup>st</sup> international symposium on Molecular Genetics of the Bacteria Plant interaction. University of Bielfeld.
- Martinez de Drets, G. & Arias, A. (1972). Enzymatic basis for differentiation of Rhizobium into fast and slow-growing groups. J. Bacteriol. 109 : 467-470.
- Masterson, R.V., Russell, P.R. & Atherly, A.G. (1982). Nitrogen fixation (nif) genes and large plasmid of Rhizobium japonicum. J. Bacteriol. 152 : 928-931.
- Mateugue, D. (1985). Utilisation de Sesbania rostrata comme engrais vert. Séminaires sur les arbres fixateurs d'azote et sur la biologie des sols. C.R.D.I.-FIS-ORSTOM-NFTA : 17-25 Mars 1986 Dakar Sénégal.
- Meyers, J.A., Sanchez, D., Elwell, L.P., Falkows, S. (1976). Simple agarose gel electrophoresis method for identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 127 : 1529-1537.

- Moffett, M.L. & Colwell, R.R. (1968). Adansonian analysis of the Rhizobiacea. J. Gen. Microbiol. 51 : 245-266.
- Moudiongui, A., Rinaudo, G. (1987). Effect of ammonium nitrate on nodulation and nitrogen fixation (Acetylene reduction) of the tropical legume Sesbania rostrata, à paraître dans Mircea Journal Appl. Microbiol. Biotech.
- Munns, D.N. (1968). Nodulation of Medicago sativa in solution culture. III. Effects of nitrate on root hairs and infection. Plant Soil. 29 : 33-49.
- Munns, D.N. (1977). Mineral nutrition and the legume symbiosis. In : A treatise on dinitrogen fixation. Hardy, R.F.W. & Gibson, H.A. (eds.), Wiley, J. & Sons, New York, pp. 353-391.
- Mughogho, S.K., Batianos, A., Christianson, B. & Vlek, P.L.G. (1986). Management of nitrogen and phosphorus fertilizers in Sub-Saharan Africa. Mokwunge, A.U. and Vlek, P.L.G. (eds), Martinus Nijhoff, The Hague pp. 117-172.
- Mugnier, J. (1980). Procédé d'inclusion de Rhizobium dans des polymères. Application à l'inoculation du soja. Thèse de Doctorat de 3ème Cycle Université de Lyon.
- Mc Neil, D.L. (1982). Variation in ability of Rhizobium japonicum strains to nodulate soybean and maintain fixation in the presence of nitrate. Appl. Environ. Microbiol. 45 : 856-861.
- Nelson, L.M. (1983). Variation in ability of Rhizobium leguminosarum isolate to fix symbiotically in the presence of ammonium nitrate. Can J. Microbiol. 29 : 1626-1633.
- Oghoghorie, C.G.O & Pate, J.S. (1971). The nitrate syndrome of the nodulated field pea (Pisum arvens L.) Technique for measurement and evaluation in physiological terms. Plant Soil Spec. vol. : 185-202.
- Olsson, J.E. & Rolfe, B.G. (1985). Stem and root nodulation of the tropical legume Sesbania rostrata by Rhizobium strains ORS 571 and WE7. J. Plant Physiol. 121 : 199-210.
- Paau, A.S. & Cowles, J.R. (1981). Bacteroid distribution in alfalfa nodules upon dark induced senescence and subsequent partial rejuvenation. Physiol. Plant., 52 : 43-46.
- Pagan, J.D., Child, J.J, Scowcroft, W.H. & Gibson, A.A. (1975). Nitrogen fixation by Rhizobium cultured on a defined medium. Nature (London) 25 : 406-407.

- Pandey, R.K. & Morris, R.A. (1983). Effect of leguminous green manuring on crop yields rice-based cropping systems. Paper presented at the International Rice Research Institute, Los Banos Philippines 152 pp.
- Pate, J.S., & Dart, P.J. (1961). Nodulation studies in legume IV. The influence of inoculation strain and time of application of ammonium nitrate on symbiotic response. *Plant Soil* 15: 329-346.
- Pate, J.S., Layzell, D.B. & Atkins, C.A. (1979). Economy of carbon and nitrogen in a nodulated and non nodulated ( $\text{NO}_3$ -grown) legume. *Plant Physiol.*, 64, 1083-1088.
- Patnaik, S. & Rao, M.V. (1979). Source of nitrogen and rice production. In : Nitrogen and rice, pp. 25-44. The International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
- Pelissier P. (1966). Les paysans du Sénégal. Les civilisations agraires du Cayor à la Casamance, pp. 740. Edité par le Ministère de l'Education Nationale et le CNRS. France
- Rennie, D.A., Paul, E.A. & Johns, L.E. (1976). Natural nitrogen-15 abundance of soil and plant samples. *Can. J. Soil. sci.* 56 : 43-50.
- Rennie, R.J., Rennie, D.A. & Fried, M. (1978). Concepts of N-15 usage in dinitrogen fixation studies. In : Isotope and biological dinitrogen fixation. A.I.E.A. Vienne. 107-133.
- Rennie, R.J. (1979). Comparison of N-15 aided methods for determining symbiotic dinitrogen fixation. *Rev. Ecol. Biol. Sol* 16 : 455-463.
- Rennie, R.J. (1980). N-15 isotope dilution as a measure of dinitrogen fixation by Azospirillum brasilense associated with maize. *Can. J. Bot.* 58 : 21-24.
- Reynolds, E.S (1963). The use of lead citrate at high pH one electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17 : 208.
- Rigaud, J. & Puppo, A. (1977).. Effect of nitrite upon leghemoglobin and interaction with nitrogen fixation. *Biochem. Biophys. Acta* 497 : 702-706.
- Rigaud, J. (1981). Comparison of the efficiency of nitrate and nitrogen fixation in crop yield. In : Nitrogen and carbon metabolism. Bewley, J.D. (ed), Martinus. Nijhoff The Hague pp. 17-48.

- Rinaudo, D., Dreyfus, B. & Dommergues, Y. (1982). Sesbania rostrata as green manure for rice in West Africa. In : B.N.F. Technology for Tropical Agriculture. Graham, P.H., & Harris, S.C. (eds), pp 441-445.
- Rinaudo, G. Dreyfus, B. & Dommergues, Y. (1983). Sesbania rostrata green manure and the nitrogen content of rice and soil. Soil. Biol. Biochem. 15 : 111-113.
- Rinaudo, G. & Moudiongui, A. (1985). Fixation d'azote par Sesbania rostrata, son utilisation comme engrais vert. A paraître dans Bulletin Agronomique de l'Université de Gembloux Belgique.
- Roger, P.A. & Watanabe, I. (1986). Technologies for utilizing biological nitrogen fixation in wetland rice : potentialities, current usage, and limiting factors. Fert. Research 9 : 39-77.
- Rosenberg, C., Casse-Delbart, F., Ilona Dusha, David, M. & Boucher, C. (1982). Megaplasmids in the plant-associated bacteria Rhizobium meliloti and Pseudomonas solanacearum. J. Bacteriol. 150 : 402-406.
- Rys, G.J. & Phung, T. (1984). Effect of nitrogen form and counterion on establishment of the Rhizobium trifolii - Trifolium repens symbiosis. J. Exp. Bot. 35. 161 : 1-8.
- Sabatini, D.C., Bensch, K. & Barnett, R.J. (1963). Cytochemistry of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. J. Cell. Biol. 17 : 19.
- Saint Macary, H. Marqueses, E.P., Torres, R.O. & Morris, R.A. (1985). Effect of flooding on growth and nitrogen fixation of two Sesbania species. Philipp. J. Crop. Sci. 10 : 17-20.
- Scheitzer, L.E. & Harper, J.E. (1980). Effect of light dark and temperature on root nodule activity (acetylene reduction) of soybeans. Plant Physiol. 65 : 51-56.
- Schmidt, E.L., Bankole, R.O. & Bohlool, B.B. (1968). Fluorescent antibody approach to the study of Rhizobia in soil. J. Bacteriol. 95, 1987-1992.
- Singh, N.T. (1984). Green manures as source of nutrients in rice production. In : Organic Matter and Rice, pp. 217-228. The International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
- Skotnicki, M.L. & Rolfe, B.G. (1978). Transfer of nitrogen fixation genes from a bacterium with the characteristics of both Rhizobium and Agrobacterium. 133 : 518-526.

- Shanmugam, K.T., O'Gara, F., Andersen, K. & Valentine, R.C. (1978). Biological nitrogen fixation. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 29 : 263-276.
- Small, J.G.C. & Léonard, O.A. (1969). Translocation of <sup>14</sup>C labeled photosynthate in nodulated influenced by nitrate nitrogen. *Amer. J. Bot.* 56 : 187-194.
- Sprent, J.I. (1971). Effects of water stress on nitrogen fixation in root nodules. *Plant and Soil*, Special volume, 225-228.
- Stanley, J., Brown, G.G. & Verma D.P.S. (1985). Slow growing Rhizobium comprises two highly divergent symbiotic types. *J. Bacteriol.* 163 : 148-154.
- Streeter, J.G. (1981). Effect of nitrate in the rooting medium on carbohydrate composition of soybean nodules. *Plant Physiol.* 68 : 840-844.
- Tanner, J.W. & Anderson, J.C. (1964). External effect of combined nitrogen on nodulation. *Plant. Physiol.* 39 : 1039-1043.
- Thornton, H.G. (1936). The action of sodium nitrate upon the infection of lucerne root-hairs by nodule bacteria. *Proc. Roy. Soc. London* 13. 119 : 474-492.
- Thibault, P. (1979). Calcul des teneurs isotopiques de l'oxygène et du gaz carbonique. Analyses au spectromètre de masse dans des conditions de non équilibre et d'équilibre isotopique C.R. du Colloque International. Les isotopes de l'oxygène. Cadarache 4- 9/9/72, 51-62.
- Truchet, G.L. & Dazzo, F.B. (1982). Morphogenesis of lucerne root nodules incited by Rhizobium meliloti in the presence of combined nitrogen. *Planta* 154 : 352-360.
- Tsien, H.C., Dreyfus, B.L. & Schmidt, E.L. (1983). Initial stages in the morphogenesis of nitrogen-fixing stem nodules of Sesbania rostrata. *J. bacteriol.* 119 : 986-999.
- Turgeon, B.G. & Bauer, W.D. (1981). Early events in the infection of Soybean by Rhizobium japonicum. Time course and cytology of the initial infection process. *Can. J. Bot.* 60 : 152-161.
- Van Kammen, A. (1984). Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter* 2 : 43-45.
- Vincent, J.M. (1970). A manual for practical study of root nodule bacteria. International Biological Programme Handbook N 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- Vincent, J.M. (1977). Rhizobium - general microbiology. In : A treatise on dinitrogen fixation. Hardy, R.W.F. & Silver W.S.(eds.), Wiley, J. & Sons, New York, pp. 277-366.
- Verma, D.P.S. & Bal, A.K. (1976). Intracellular site of synthesis and localization of leghemoglobin in root nodules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (11), 3843-3847.
- Vose, P.B., Ruschel, A.P., Victoria, R.L., Tsai Saito, S.M., Matsui, E. (1981). <sup>15</sup>-Nitrogen as a tool in biological nitrogen fixation research. In : Biological nitrogen fixation for tropical agriculture. Graham, P.H. & Harris, S.E. (eds) Centro International de Agricultura Tropical, Cali, Columbia. pp. 575-592.
- Watanabe, I. (1982). Azolla-Anabaena symbiosis-its physiology and use in tropical agriculture. In : Microbiology of Tropical Soils. Dommergues, Y.R. & Diem, H.G. (eds.) Njihoff, M. & Junks W. pp. 169-185.
- Williams W.A., Jones, M.B. & Delwiche C.C. (1977). Clover nitrogen fixation measurment by total nitrogen difference and nitrogen-15. A value in lysimeters. Agrom. J. 69 : 6 1023-1024.
- Wong, P.P. (1980). Nitrate and carbohydrate effects on nodulation and nitrogen fixation (acetylene reduction) activity of lentil (Lens esculenta Moench). Plant. Physiol. 66 : 78-81.
- Yatazawa, M. & Susilo, H. (1980) Development of upper stem nodules in Aeschynomene indica under experimental conditions. Soil Sci. Plant Nutr. 26 : 317-319.

ANNEXES



1. Caractéristiques Physicochimique  
des sols

	Bel-Air	Tilène	Balandine	Affiniam
Argile	3,8%	57,8%	5%	7%
Limon fin	1,4%	12,9%	5,8%	1,4%
Limon grossier	0,7%	4,9%	23,3%	4,3%
Sable fin	48,4%	10,5%	46,9%	57,1%
Sable grossier	44,5%	7,8%	17,7%	28%
pH eau	7,7	6,0	6,0	8,3
pH KCl	7,0	5,0	5,5	6,5
Carbone	4‰	11,6‰	10,70‰	4,25‰
Azote	0,26‰	0,63‰	0,4‰	0,34‰
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> total	0,37‰	0,24‰	0,1‰	0,15‰

2. Caractéristiques chimiques de la fumure organique (Déjection d'animaux).

Carbone	% <sub>o</sub>	82
Azote	% <sub>o</sub>	10,8
C/N		8
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> total	% <sub>o</sub>	5,05

NOM : MOUDIONGUI		DATE de SOUTENANCE.
Prénom : Adako		29 09 87
TITRE : <i>SESBANIA ROSTRATA</i> , légumineuse à nodules caulinaires : FIXATION SYMBIOTIQUE D'AZOTE ET UTILISATION COMME ENGRAIS VERT:		
NATURE :	SPECIALITE :	NUMERO D'ORDRE :
Thèse de Doctorat	Ecologie microbienne.	93-97
Col. B. - Lyon : T 50/210/19 / et bis		CLASSE :
RESUME :		
<p>Des souches de <i>Rhizobium</i> isolées de <i>Sesbania rostrata</i> provenant de différents lieux géographiques du Sénégal, ont été analysées. Leur comparaison avec la " souche de tige " de référence ORS 571 a permis de mettre en évidence des différences au niveau des parentés immunologiques, du contenu plasmidique, de l'activité nitrogénase en condition de dérepression, et de l'efficacité de la symbiose. L'azote combiné, ammoniacal ou nitrrique affecte à la fois la nodulation et l'activité réductrice d'acétylène des nodules caulinaires et racinaires, mais les nodules racinaires sont plus affectés que les nodules caulinaires. L'étude cytologique des nodules caulinaires en microscopie électronique a montré qu'en présence de fortes doses d'azote combiné la dernière phase du processus de l'infection caulinaire (libération des bactéries du cordon d'infection dans le cytoplasme des cellules du méristème nodulaire) est bloquée. Des cycles végétatifs successifs initiés toutes les deux semaines tout au long de l'année ont permis de montrer que chez <i>S. rostrata</i> le développement et la fixation d'azote sont très sensibles aux conditions climatiques en particulier à la photopériode et la température. Les potentialités fixatrices de <i>S. rostrata</i> ont été évaluées par deux méthodes, la méthode par différence et la méthode de dilution isotopique N-15. La quantité d'azote fixée par <i>S. rostrata</i> en 53 jours a été évaluée à environ 300 kg N/ha. Il est apparu que <i>S. rostrata</i> utilisé comme engrais vert peut être bénéfique non seulement pour la culture irriguée du riz, mais également en culture exondée (riz et sorgho). Les essais correspondants ont été effectués en station (ORSTOM Dakar) et en milieu paysan (Casamance Sud du Sénégal).</p>		
MOTS-CLES : Azote-15 ; Azote combiné ; Engrais vert ; Fixation d'azote ; Nodules caulinaires ; <i>Sesbania rostrata</i> ; <i>Rhizobium</i> .		
Laboratoire(s) de recherches : Microbiologie ORSTOM-DAKAR		
Directeur de Recherches : G. RINAUDO		
Président du Jury : Pr. R. BARDIN		
Composition du Jury : J. BALANDREAU ; A. MOIROUD ; G. RINAUDO ; H. SAINT MACARY.		