

N 327

Nom de l'organisme bénéficiaire

Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer
(O.R.S.T.O.M.)

Laboratoire de Biologie des Sols, Centre ORSTOM de Dakar,
Sénégal.

Y. Dommergues et B. Dreyfus

FIXATION D'AZOTE PAR UNE LEGUMINEUSE A NODULATION
CAULINAIRE, SESBANIA ROSTRATA

B

Compte rendu de fin d'étude
d'une recherche financée
par la Délégation Générale
à la recherche scientifique
et technique

Act. : Ecologie et Aménagement
Rural

Décision d'Aide: n°81 G1451 du 2 décembre 1981

Notification le 7 décembre 1981

Date : décembre 1982



Fonds Documentaire IRD
Cote: B* 21429 Ex: 1

ex-1

11

RESUME SIGNALETIQUE

Sesbania rostrata est une légumineuse possédant à la fois des nodules caulinaires et racinaires. Son Rhizobium spécifique, qui est capable de croître en culture libre aux dépens de l'azote moléculaire comme source d'azote, se prête remarquablement bien aux études génétiques. L'infection des sites de nodulation (prédéterminés) comporte une phase intercellulaire et une phase intracellulaire. Un procédé d'inoculation des nodules de tige a été mis au point. Des essais à relativement grande échelle ont permis de vérifier l'indépendance du système fixateur d'azote Sesbania rostrata vis-à-vis de l'azote combiné du sol. Utilisé comme engrais vert, Sesbania rostrata triple le rendement du riz même dans le cas de sols très pauvres.

TABLE DES MATIERES

Résumé signalétique	2
Chap. I. Introduction	4
Chap. II. Conduite de la recherche	5
Chap. III. Analyse et interprétation des résultats.....	7
Chap. IV. Conclusions	10

CHAPITRE. I. INTRODUCTION

Sesbania rostrata est une légumineuse possédant à la fois nodules caulinaires (de tige) et racinaires, et caractérisée par un potentiel fixateur d'azote très élevé. L'étude de ce système présente à la fois un intérêt fondamental considérable en raison des propriétés remarquables de la plante-hôte et de son Rhizobium spécifique (que, pour des raisons de commodité, nous dénommons ici Rhizobium sesbaniae) et un intérêt agronomique indiscutable puisqu'il a été établi que l'utilisation de Sesbania rostrata comme engrais vert permet de doubler ou même tripler les rendements du riz en l'absence d'engrais azoté. C'est pourquoi nous avons sollicité, il y a un an, une aide pour conduire une étude intégrée de Sesbania rostrata. Nous avons alors proposé un programme portant sur 2 ans (1982 et 1983) et comportant les trois volets suivants :

1. Etude de Rhizobium sesbaniae : taxonomie, physiologie, génétique;
2. Etude du système symbiotique

Etablissement de la symbiose (étude cytologique et biochimique du processus d'infection et de nodulation); fonctionnement de la symbiose à l'échelle cellulaire en se fondant sur l'utilisation de modèles expérimentaux constitués par des cultures tissulaires in vitro; fonctionnement de la symbiose à l'échelle de la plante entière (évaluation de la fixation de N_2 ; influence de l'azote combiné).

3. Application: utilisation de Sesbania rostrata comme engrais vert: mise au point d'une méthode d'inoculation; étude agronomique.

Une aide nous a été effectivement accordée dans le cadre de l'action ECAR sous le n°81G1451; mais cette aide a porté sur une année seulement (du 7 décembre 1981 au 6 décembre 1982).

Les chapitres suivants présentent les résultats obtenus au cours de cette année.

CHAPITRE II. CONDUITE DE LA RECHERCHE

Le déroulement des travaux a été favorisé par le fait que le sujet de recherche abordé a intéressé vivement plusieurs laboratoires en France et à l'étranger et que nous avons pu établir des collaborations fructueuses dans plusieurs domaines :

1. Etude de Rhizobium Sesbaniae

- collaboration avec l'Institut Pasteur de Paris (génétique du Rhizobium)

2. Etude de la symbiose

- collaboration avec le laboratoire de Science du Sol de l'Université du Minnesota (étude cytologique du processus d'infection),
- collaboration avec le laboratoire de Cytophysiologie de l'Université de Dakar (culture cellulaire in vitro)

3. Etude au champ

- collaboration avec l'Institut Sénégalais de Recherche Agricole (influence de l'utilisation de Sesbania rostrata utilisé comme engrais vert sur les rendement du riz).

Un certain nombre de difficultés ont été rencontrées :

- 1) dans le domaine de l'équipement: absence de lyophilisateur ; absence de fermenteur à régulation automatique;
- 2) dans le domaine des missions: absence des crédits pour voyages de chercheurs dans les laboratoires avec lesquels nous collaborons;
- 3) difficultés de culture de Sesbania rostrata en saison sèche; le problème pourrait être résolu par installation d'un éclairage de complément dans une serre spéciale (crédits demandés par ailleurs);
- 4) insuffisance du personnel de surveillance des cultures (jardiniers);
- 5) en outre il y a lieu de noter que le projet soumis correspondait à une période de 24 mois mais l'aide accordée a porté seulement sur une période de 12 mois, ce qui handicapera certainement le développement des recherches envisagées pour l'année 1983.

Malgré toutes ces difficultés nous sommes parvenus à obtenir une moisson de résultats particulièrement originaux et prometteurs. En outre de nouvelles perspectives ont été ouvertes dans le domaine des légumineuses à nodules caulinaires.

- Les objectifs suivants ont été entièrement atteints :
 - Taxonomie et physiologie de Rhizobium Sesbaniae.
 - Etude cytologique des différentes étapes de l'infection de tiges.
- Ont été partiellement atteints les objectifs suivants :
 - Etude génétique de R. Sesbaniae.
 - Etude quantitative de la fixation d'azote.
 - Les cultures tissulaires in vitro ont été obtenues; mais les tentatives d'infection intracellulaire de ces tissus ont échoué comme d'ailleurs celles de tous les autres chercheurs qui se sont penchés sur ce problème.

CHAPITRE III. ANALYSE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

1. Etude taxonomique physiologique et génétique de *Rhizobium sesbaniae*

Sesbania rostrata possède à la fois des nodules racinaires et des nodules caulinaires. Les souches de *Rhizobium* isolées de nodules de tige sont capables de former des nodules à la fois sur les racines et la tige de *S. rostrata*, alors que les souches de *Rhizobium* isolées de nodules racinaires ne peuvent en général, noduler la tige.

Les *Rhizobium sesbaniae* (souches de tige) constituent un groupe distinct à la fois des *Rhizobium* à croissance rapide et des *Rhizobium* à croissance lente; ils sont plus proches des *Rhizobium* à croissance lente que des *Rhizobium* qui nodulent les racines de *S. rostrata*. Les *Rhizobium sesbaniae* (souches de tige) constituent sans doute une nouvelle espèce de *Rhizobium*.

L'étude physiologique a montré que la souche de tige ORS571 est capable de croître en culture libre aux dépens de l'azote moléculaire comme seule source d'azote. Cette propriété, unique parmi tous les *Rhizobium* connus, a rendu possible l'obtention des mutants nif^- de la souche ORS571 en utilisant les méthodes de la génétique classique. Des gènes de la souche sauvage intervenant dans la fixation d'azote du *Rhizobium* ont été clonés dans un plasmide. Après conjugaison et transmission de ce plasmide à un mutant nif^- , une complémentation génétique a été observée à la fois en culture libre et dans les nodules de la plante.

2. Etablissement de la symbiose

L'étude de l'infection de la tige par les *Rhizobium* spécifiques a mis en évidence un processus d'infection unique parmi les légumineuses connues. L'infection de la tige de *S. rostrata* se fait uniquement à l'emplacement des sites prédéterminés, appelés sites de nodulation, et qui correspondent à des ébauches racinaires. Dans un premier stade, les *Rhizobium* se multiplient dans les espaces intercellulaires des

cellules de la base de l'ébauche racinaire. Ultérieurement, des cordons d'infection se développent et libèrent les Rhizobium dans les cellules de la plante-hôte où ils sont inclus à l'intérieur de membranes d'origine végétale, appelées membranes-enveloppes.

L'étude des processus de reconnaissance n'a pas donné les résultats escomptés, étant donné qu'il ne nous a pas été possible de mettre en évidence des quantités appréciables de lectines.

On a tenté d'obtenir un modèle expérimental de l'infection en faisant appel aux cultures tissulaires in vitro. On a effectivement obtenu des cultures de cals de nodules de tige dont l'étude ultramicroscopique est achevée. Ces cals renferment des poches intercellulaires où les Rhizobium sesbaniae se multiplient, offrant une analogie certaine avec les poches d'infection observées in planta. Mais nous n'avons pas obtenu d'infection intracellulaire des cals.

3. Fonctionnement de la symbiose

Les essais conduits en "vraie grandeur" ont permis de confirmer le fait (mis en évidence antérieurement au laboratoire) que l'azote combiné n'inhibe pas la nodulation caulinaire.

4. Application : utilisation de Sesbania rostrata comme engrais vert.

1. Méthode d'inoculation.

Dans le cadre d'un contrat de recherche avec Rhône-Poulenc Recherche nous avons mis au point une méthode d'inoculation originale, adaptable d'ailleurs aux autres légumineuses à nodules caulinaires. Cette méthode a fait l'objet d'une demande de dépôt de brevet par l'intermédiaire de l'ANVAR au mois d'octobre 1982.

2. Effet de S. rostrata-engrais vert sur le rendement du riz

Un essai au champ (parcelles de 25m²) effectué en collaboration avec l'Institut Sénégalais de Recherche Agronomique (ISRA) à la Station de Djibélor en Casamance, a confirmé les résultats obtenus l'année

précédente, mais en se plaçant dans le cas de sols très pauvres. Le rendement en riz (grain) est passé de 1,5 T dans les parcelles témoin à 4,5 T dans les parcelles dans lesquelles on avait enfoui l'engrais vert Sesbania rostrata.

CHAPITRE IV. CONCLUSIONS

Les résultats obtenus dans le cadre de la présente étude ont montré clairement que Sesbania rostrata associé à son Rhizobium spécifique constituait effectivement un nouveau système fixateur d'azote. En effet, les Rhizobium de tige diffèrent, par maints caractères et en particulier par leur aptitude à croître en culture libre aux dépens de l'azote moléculaire, de tous les autres Rhizobium actuellement connus. En outre les caractéristiques de la nodulation de tige (en particulier le mode d'infection), la non-inhibition par l'azote combiné, et le potentiel fixateur d'azote élevé, font que la symbiose Sesbania-Rhizobium diffère sur de nombreux points des autres symbioses Rhizobium-légumineuses à nodules racinaires.

De par ces propriétés remarquables, la symbiose Rhizobium-Sesbania est un modèle unique parmi les légumineuses qui permet d'envisager le développement ultérieur de recherches fondamentales et appliquées.

1. Recherches fondamentales

Les recherches fondamentales pourront être orientées dans deux directions: l'étude des gènes *nif* et *nod* du Rhizobium de tige et l'étude du transfert à d'autres légumineuses de l'aptitude à noduler sur la tige.

1.1. Etude des gènes *nif* et *nod* du Rhizobium de tige

Etant donné qu'il est désormais possible d'isoler directement sur boîte de Petri des mutants *nif*⁻ de la souche ORS571, on pourra caractériser par complémentation génétique les différents mutants obtenus et on pourra en particulier construire des diploïdes à partir d'une banque de gènes.

Une complémentation interspécifique des mutants *nif*⁻ de la souche ORS571 devrait aussi permettre, directement sur milieu de culture, l'analyse génétique et biochimique de gènes qui normalement ne s'expriment qu'en association avec la plante, comme c'est le cas chez tous les Rhizobium tempérés à croissance rapide.

1.2. Transfert à d'autres plantes de l'aptitude à noduler sur la tige.

L'état actuel des connaissances en biologie moléculaire de la plante fait qu'il est encore impossible de localiser les gènes de Sesbania rostrata, responsables de la présence d'ébauches racinaires sur la tige, d'autant plus que ces gènes doivent être nombreux et localisés dans différents chromosomes de la plante. Pour le moment, les seules possibilités sont donc la fécondation interspécifique et l'obtention d'hybrides in situ ou in vitro avec des espèces proches de Sesbania rostrata, ou encore la fusion de protoplastes entre Sesbania rostrata et différentes espèces de légumineuses.

Une autre possibilité pourrait être le transfert de plasmide Ti d'Agrobacterium tumefaciens ou Ri d'Agrobacterium rhizogenes à une souche de Rhizobium de tige, afin d'obtenir sur les tiges de diverses légumineuses la formation de racines qui pourraient alors être nodulées. Ceci suppose au préalable l'élargissement du spectre d'hôte du Rhizobium de tige.

Enfin on peut envisager d'étendre l'étude initiée sur Sesbania rostrata à d'autres légumineuses à nodulation caulinaire tropicales appartenant notamment au genre Aeschynomene.

2. Recherches appliquées

Les résultats des expériences sur l'utilisation de Sesbania rostrata comme engrais vert en riziculture ont montré qu'il était possible de faire passer, en rizière, les rendements en riz de 1,5 à 4,5 tonnes de grains par hectare. La symbiose Rhizobium-Sesbania est donc, par son potentiel fixateur d'azote élevé, directement applicable à la riziculture et permettrait de supprimer tout apport coûteux d'engrais azotés. Les essais concernant aussi bien les problèmes de sélection de souches de Rhizobium et d'inoculation, que les études agronomiques et la sélection de cultivars de Sesbania rostrata

moins photopériodiques que celui dont nous disposons actuellement devront être entrepris non seulement en Afrique mais aussi en Asie.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Avant l'octroi de l'aide

- DREYFUS, B. and DOMMERGUES, Y.R. (1981). Nitrogen-fixing nodules induced by Rhizobium on the stem of the tropical legume Sesbania rostrata. FEMS Microbiol. Letters, 10, 313-317.
- DREYFUS, B.L. and ELMERICH, C. (1981). A free-living Rhizobium sp able to grow on N₂ as sole nitrogen source. 8th North American Conference, 2-7 Aug. Winnipeg.
- DREYFUS, B.L. and DOMMERGUES, Y.R. (1981). Stem nodules on the tropical legume, Sesbania rostrata. In: Current Perspectives in Nitrogen Fixation. (A.H. Gibson and W.E. Newton eds.) Australian Academy of Science, Canberra. P. 471.
- DREYFUS, B. and 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. Acad. Sciences Paris. D, 291, 767-770.

Depuis l'octroi de l'aide

- DREYFUS, B., ELMERICH, C. and DOMMERGUES, Y.R.
A free-living Rhizobium able to grow on N₂ as nitrogen source. Applied and Environ. Microbiol (Sous presse).
- DUHOUX (E) et ALAZARD (D). 1982. Culture in vitro de nodules de Sesbania rostrata: mode d'infection des tissus néoformés et comparaison avec l'infection chez la plante. C.R. Acad. Sci. Paris. (Sous presse).
- DUHOUX, E. and DREYFUS, B. (1982). Nature des sites d'infection par le Rhizobium de la tige de la légumineuse Sesbania-rostrata, Brem. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris. Série III, 407.
- RINAUDO, G., DREYFUS, B. and DOMMERGUES, Y.R. (1982). Sesbania rostrata as a green-manure for rice in West Africa. In: Proc. Workshop on Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. Cali, Colombia.
- RINAUDO, G., DREYFUS, B. and DOMMERGUES, Y.R. (1982). Sesbania rostrata green manure and rice. IRRN 7 : 17-18.

RINAUDO, G., DREYFUS, B. and DOMMARGUES, Y.R. (1982). Influence of Sesbania rostrata green-manure on the nitrogen content of rice crop and soil. Soil Biology and Biochemistry. (Sous presse).

BREVET

Action : Ecologie et aménagement rural

N° de la décision d'aide : 81.G.1451 du 2 décembre 1981

Organisme bénéficiaire :

Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer
(ORSTOM).

Laboratoire :

Laboratoire de Biologie des Sols
Centre O.R.S.T.O.M.
B.P. 1386 Dakar, Sénégal.

Responsable Scientifique :

Y. DOMMERGUES

Objet de la décision :

Fixation d'azote par une légumineuse à
nodules caulinaires, Sesbania rostrata

Un projet de brevet intitulé "Procédé d'inoculation des légumineuses à nodules caulinaires" réalisé dans le cadre de la présente aide et dans celui d'un contrat d'association avec Rhône-Poulenc Recherches a été transmis à l'ANVAR pour étude au mois d'octobre 1982.

Nom des inventeurs : B. Dreyfus; G. Rinaudo; Y. Dommergues.

Action : Ecologie et aménagement rural

Organisme bénéficiaire

Office de la Recherche Scientifique
et Technique Outre-Mer
(ORSTOM)

N° de la décision d'aide :

81.G.1451 du 2 décembre 1981

Laboratoire

Laboratoire de Biologie des Sols
Centre ORSTOM
B.P. 1386 Dakar, Sénégal

Durée : 12 mois

Montant : 200.000 F TTC.

Responsable Scientifique :

Y. Dommergues

Nombre de chercheurs ayant participé :

Cinq.

Objet de la décision :

Fixation d'azote par une légumineuse
à nodules caulinaires, Sesbania rostrata

Objectifs visés à l'origine :

- 1/ Etude de la symbiose
 - Etude quantitative
 - Infection des tiges
 - Cultures tissulaires in vitro

- 2/ Etude de Rhizobium Sesbaniae
 - Taxonomie
 - Physiologie
 - Etude génétique

3/ Application : utilisation de Sesbania rostrata comme engrais vert en riziculture.

Objectifs atteints

1) Etude de Rhizobium Sesbaniae

Taxonomie (objectifs visés entièrement atteints)

Physiologie (objectifs visés entièrement atteints)

Etude génétique (objectifs visés partiellement atteints)

2) Etude de la symbiose

Etude quantitative (partiellement)

Infection des tiges (entièrement)

Cultures tissulaires in vitro (très partiellement)

Le projet soumis devait porter sur 24 mois; mais l'aide accordée a porté seulement sur 12 mois. Il est normal, dans ces conditions, que tous les objectifs visés n'aient pas été entièrement atteints. Toutefois, on peut considérer que compte tenu du peu de temps écoulé depuis l'initiation de l'aide (fin 1981), les résultats sont non seulement très satisfaisants mais ils ouvrent la voie à de nouvelles recherches.

Diffusion du compte-rendu de fin d'étude : aucune objection

Publications : voir annexe

Brevet : demande de dépôt de brevet actuellement à l'étude à l'ANVAR.

Suite de la recherche

Les recherches entreprises doivent être développées dans les directions suivantes :

1. Poursuite des recherches sur Sesbania rostrata

1.1. Sur le plan fondamental

- Génétique du Rhizobium

- Etude de la transmission à d'autres espèces du caractère de nodulation caulinaire.

1.2. Sur le plan appliqué

Perfectionnement de la technique d'utilisation de Sesbania rostrata en riziculture dans différentes zones écologiques tropicales.

2. Démarrage de l'étude d'autres systèmes fixateurs d'azote à
nodulation caulinaire (Aeschynomene sp).

Une aide complémentaire de la DGRST est absolument indispensable
à la poursuite des recherches à un rythme accéléré de façon à ce que
nous conservions l'avance que nous avons acquise par rapport aux
équipes étrangères.

CONCLUSION GENERALE

Les résultats de nos travaux ont suscité à juste titre un intérêt
considérable à la fois sur le plan fondamental (écologie, physiologie
et génétique du Rhizobium impliqué) et sur le plan appliqué (possibi-
lité de doubler ou tripler les rendements en rizière). L'effort
entrepris doit être poursuivi et amplifié en faisant appel à l'approc
génétique, biochimique et agronomique.