THÈSE

PRÉSENTÉE

A L' UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE I

Laboratoire de Biologie des sols (ORSTOM-Dakar)

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR DE SPÉCIALITÉ

(biochimie et biologie cellulaire-option microbiologie)

PAR

Patrick JARA

LE CONTINUUM

RHIZOBIUM japonicum - *RHIZOBIUM* cowpea

SOUTENUE LE 2 OCTOBRE 1981 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. J.P. BELAICH — Président

Y.R. DOMMERGUES, J. RIGAUD, J.C. SENEZ — Examinateurs

A MA FEMME,
A MES PARENTS.

Les travaux qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisés au laboratoire de biologie des sols de l'ORSTOM à Dakar (Sénégal).

Que Monsieur Dommergues qui m'a fait profiter de sa compétence et de son expérience trouve ici l'expression de ma très sincère reconnaissance.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Boureau pour son aide technique et sa précieuse collaboration dans l'élaboration de ce manuscrit, ainsi que Monsieur Diem pour ses remarques pertinentes.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Belaïch qui a bien voulu présider le Jury, ainsi qu'à Monsieur Rigaud et Monsieur le Professeur Senez qui m'ont fait l'honneur de juger cette thèse.

Je tiens également à remercier tous les techniciens du laboratoire de Dakar en particulier Monsieur Diawara pour la dactylographie de ce manuscrit.

SOMMAIRE

GLOSSAIRE

INTRODUCTION

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE CONCERNANT LA SPECIFICITE DE LA SYMBIOSE SOJA - *RHIZOBIUM*

I. Généralités
II. Contrôle de la spécificité dans les différentes étapes de la nodulation
1) Prolifération des *Rhizobium* dans la rhizosphère
2) Attachement des *Rhizobium* aux racines
3) Courbure des poils absorbants
4) Pénétration du *Rhizobium* dans le poil absorbant et formation du cordon d'infection
5) Conclusions sur le contrôle de la spécificité
III. La classification actuelle des *Rhizobium*
1) Classification du genre *Rhizobium*
2) Limites de la classification actuelle
3) Propositions pour une nouvelle classification
4) Conclusions sur la taxonomie des *Rhizobium*

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES

I. Souches de *Rhizobium* et milieux de culture
1) Isolement de *Rhizobium* à partir des nodules
2) Milieux de culture
II. Etude de taxonomie numérique
1) Etude morphologique
2) Tests classiques
3) Tests nutritionnels
4) Etude de la croissance
5) Analyse numérique
6) Composition en bases de l'ADN
III. Identification des nodules par immunofluorescence
1) Principe
2) Préparation des anticorps fluorescents
3) Contrôle de la spécificité des anticorps fluorescents
4) Préparation et marquage des frottis nodulaires

IV. Culture des plantes
1) Stérilisation et germination des graines
2) Dispositifs de culture
3) Inoculation
4) Dénombrement des *Rhizobium* dans le sol

V. Lectines
1) Purification de la lectine de soja cv. Malayan
2) Essais de liaison des lectines au *Rhizobium*
3) Attachement des *Rhizobium* au poil absorbant

VI. Méthodes analytiques
1) Activité réductrice d'acétylène (ARA)
2) Méthode des différences
3) Détermination du poids sec
4) Dosage de l'azote minéral
5) Dosage des protéines
6) Analyse statistique

CHAPITRE III. OBTENTION ET CARACTERISATION DES SOUCHES DE *RHIZOBIUM* NODULANT SOJA ET COWPEA

I. Obtention de *Rhizobium* natifs nodulant le soja
1) Principe
2) Résultat

II. Etude de taxonomie numérique sur les souches de *R.* cowpea de *R. japonicum* et de *Rhizobium* natifs
1) Principaux caractères communs
2) Caractères discriminants
3) Analyse numérique

III. Discussion

CHAPITRE IV. MISE EN EVIDENCE DU CONTINUUM *Rhizobium japonicum* - *Rhizobium* cowpea

I. Etude du spectre d'hôte de *R.* cowpea, de *R. japonicum* et des *Rhizobium* natifs
1) Principe
2) Spectre de nodulation
3) Spectre d'effectivité
4) Spécificité de la plante-hôte dans le cas du soja

II. Discussion

CHAPITRE V. PERFORMANCES SYMBIOTIQUES DE *R. japonicum* ET *R.* cowpea M SUR LE SOJA

I. Comparaison des performances symbiotiques de *R. japonicum* et *R.* cowpea M sur le soja cv. Malayan

1) Principe

2) Cinétique de la nodulation

3) Cinétique de la fixation de N_2

II. Influence de la température sur les performances symbiotiques de *R. japonicum* et *R.* cowpea M dans le cas du soja cv. Malayan

1) Effet global de la température sur la symbiose Malayan-*Rhizobium*

2) Effet de la température sur la nodulation par *R. japonicum* et *R.* cowpea M

3) Effet de la température sur la fixation de N_2 par *R. japonicum* et *R.* cowpea M

III. Performances symbiotiques de *R. japonicum* et de *R.* cowpea M sur le soja cv. Malayan et cv. 44A73 cultivés au champ

1) Principe

2) Résultats sur le soja cv. Malayan

3) Résultats sur le soja cv. 44A73

IV. Discussion

CHAPITRE VI. COMPETITION ENTRE *R. japonicum* et *R.* cowpea M POUR LA NODULATION DU SOJA

I. Mise en évidence de la compétitivité de *R. japonicum* vis-à-vis de *R.* cowpea M pour la nodulation du soja

1) Compétition entre souches introduites et souches préexistantes dans le sol

2) Compétition entre souches introduites simultanément pour la nodulation du soja cv. Malayan

3) Inhibition de la nodulation des souches de *R.* cowpea M sur le soja cv. 44A73

II. Discussion

CHAPITRE VII. RECHERCHE DE L'ORIGINE DE LA COMPETITIVITE DE *R. japonicum* VIS-A-VIS DE *R.* cowpea M POUR LA NODULATION DU SOJA cv. MALAYAN

I. Rôle de la vitesse de nodulation dans la compétition

1) Principe

2) Résultat

II. Rôle de la reconnaissance du *Rhizobium* dans la compétition
1) Préparation de la lectine de soja cv. Malayan
2) Liaison de quelques souches de *R. japonicum* et de *R.* cowpea à la lectine de soja cv. Malayan
III. Discussion

CHAPITRE VIII. SURVIE DE *R. japonicum* et de *R.* cowpea M DANS UN SOL AFRICAIN
I. Comparaison de la survie de *R. japonicum* et de *R.* cowpea dans le cas d'un sol africain
1) Dénombrement des *Rhizobium* vivants
2) Comparaison des performances symbiotiques du soja cv. Malayan sans réinoculation ou avec réinoculation du sol
II. Discussion

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXE I. Analyse physico-chimiques des sols de Bel air et Coular

ANNEXE II. Cycle végétatif du soja et photopériodisme.

"The morphology of the bacteria taken directly from the nodules varies with the species of legume, the conditions of infection and growth, the age and size of the nodule, and the portion of the nodule examined. These bacteria cells are so characteristic, so varied and so beautiful in form as to be pleasing objects of study".

HARRISON et BARLOW (1906)

GLOSSAIRE

COMPETITIVITE (competitiveness) : aptitude d'une souche de *Rhizobium* à noduler une plante-hôte en présence d'autres souches de *Rhizobium* ayant la même spécificité ; une souche très compétitive par définition forme 100% des nodules sur une plante donnée.

CULTIVAR : variété cultivée d'une espèce végétale. La notion de cultivar est le parallèle de la notion de souche en microbiologie.

EFFECTIVITE (effectiveness) : (ou efficacité). Aptitude d'une souche à fixer l'azote dans le nodule. Il existe divers degrés dans l'effectivité, une souche de *Rhizobium* peut être ineffective, peu effective, effective ou très effective.

ESPECE DE *RHIZOBIUM* : la notion d'espèce chez le genre *Rhizobium* est fondée sur le caractère d'infectivité vis-à-vis des légumineuses. Une espèce est constituée par l'ensemble des souches de *Rhizobium* infectant la ou les espèces de légumineuses, qui constituent un groupe d'inoculation croisée.

GROUPE D'INOCULATION CROISEE : ensemble des plantes-hôtes nodulées par une même espèce de *Rhizobium*.

INFECTIVITE (infectiveness) : aptitude d'une souche à induire la formation de nodule. La notion d'infectivité n'implique pas que la souche considérée soit effective.

GLOSSAIRE (suite)

LECTINES : (du latin *legere* : choisir) définies à l'origine comme des protéines hémagglutinantes ou glycoprotéines. Ces protéines ont la propriété de se lier spécifiquement à un carbohydrate donné. Les lectines ont d'abord été isolées de graines végétales, mais on sait maintenant qu'elles sont très répandues dans le règne végétal et animal, qu'elles n'agglutinent pas toutes les hématies, et qu'elles joueraient un rôle dans tous les processus de reconnaissance cellulaire.

LEGHEMOGLOBINE : chromoprotéine responsable de la coloration rouge visible à l'intérieur d'un nodule effectif. C'est une molécule "symbiotique", car la partie protéique ou apohémoglobine est codée par la plante-hôte et l'hème est un produit de synthèse du *Rhizobium*.

NITROGENASE : complexe enzymatique responsable de la réduction de l'azote atmosphérique, formé de deux protéines la molybdoprotéine et l'azoprotéine.

NODULATION : résultat de la succession d'évènements se traduisant par l'apparition d'un nodule (ou nodosité) On parle de "nodulation homologue" lorsque la plante-hôte, appartenant à un groupe d'inoculation croisée donné, est nodulée par une souche de *Rhizobium* isolée d'une plante appartenant à ce groupe. Quand la souche est issue d'un autre groupe on parle de "nodulation hétérologue".

GLOSSAIRE (suite et fin)

PERFORMANCES SYMBIOTIQUES : ensemble des deux principaux caractères du système fixateur symbiotique, à savoir l'aptitude à noduler et l'aptitude à fixer l'azote atmosphérique.

SPECIFICITE : ce caractère peut se rapporter à la souche ou à la plante-hôte.

1) Spécificité de la souche (strain specificity) : propriété d'une souche définie par son spectre d'hôte. Une souche est très spécifique quand elle a un spectre d'hôte réduit, une souche est peu spécifique quand elle a unn large spectre d'hôte.

2) Spécificité de la plante-hôte (host specificity) aptitude d'une plante à être nodulée par un nombre plus ou moins important de souches de *Rhizobium*.

SPECTRE D'HOTE : ensemble des plantes-hôtes nodulées par une même souche de *Rhizobium*. La notion de spectre d'hôte est plus restrictive que la notion de groupe d'inoculation croisée, puisqu'elle concerne une souche et non une espèce de *Rhizobium*.

INTRODUCTION

La symbiose légumineuse - *Rhizobium* se traduit par la formation de nodules, fixateurs d'azote, sur les racines de la plupart des légumineuses. Cette symbiose est caractérisée par une spécificité plus ou moins marquée entre les deux partenaires; la symbiose trèfle - *Rhizobium* par exemple est spécifique car certaines souches de *R.trifolii* ne nodulent que quelques cultivars. Par contre, la symbiose pois - *Rhizobium* est moins spécifique car une souche nodulant le pois peut aussi noduler la lentille ou la vesce.

Les *Rhizobium* sont classés en espèces sur la base de cette spécificité d'infection; à chaque espèce correspond un groupe d'inoculation croisée, comprenant les légumineuses susceptibles d'être nodulées par une même souche. De plus, les *Rhizobium* sont subdivisés en deux groupes en fonction de leur vitesse de croissance sur gélose nutritive et de deux autres caractères biochimiques.

L'objet de notre étude concerne les souches de *Rhizobium* nodulant le soja. Le soja (*Glycine max*) est une espèce de légumineuse qui représente, à elle seule, un groupe d'inoculation croisée et qui est nodulée par *Rhizobium japonicum*. Cependant, il est connu depuis longtemps (SEARS 1923) que le soja peut être nodulé par des souches de *Rhizobium*, également à croissance lente comme les souches de *R. japonicum*, mais associées à un autre groupe d'inoculation croisée: le groupe cowpea qui correspond à des légumineuses tropicales.

L'étude de la nodulation du soja par *R. japonicum* et par *R.* cowpea présente un double intérêt à la fois académique et appliqué. Dans notre travail, nous avons cherché à atteindre les objectifs fondamentaux suivants :

(1) approfondir nos connaissances sur le groupe des *Rhizobium* cowpea qui forment une espèce très mal définie et dont l'écologie a été peu étudiée.

(2) confirmer ou infirmer la classification actuelle des *Rhizobium* à croissance lente qui consiste à séparer les souches de *R. japonicum* et de *R.* cowpea pour en faire deux espèces bien distinctes.

(3) mieux connaître les mécanismes qui régissent le contrôle de la spécificité dans la symbiose soja - *Rhizobium*. Ce problème est compliqué par le fait que la spécificité de la symbiose est déterminée non seulement par la souche de *Rhizobium* elle même, mais aussi par certains

gênes de la plante hôte. Sur le plan expérimental, nous avons donc été amené à faire porter notre étude sur plusieurs cultivars de soja (en fait trois) susceptibles de présenter un comportement différent en ce qui concerne ce caractère de spécificité.

D'un point de vue appliqué, nous avons tenté de répondre aux question posées par l'introduction de la culture du soja dans les sols de l'Afrique de l'Ouest :
(1) Les populations natives de *Rhizobium* tropicaux, qui existent dans ces sols sont-elles capables de noduler effectivement le soja, ou bien est-il nécessaire d'y introduire des souches de *R. japonicum* ?
(2) Dans le second cas, la présence de ces *Rhizobium* natifs peut-elle affecter l'efficacité de la symbiose soja - *R. japonicum* ?
C'est alors un problème de compétition entre souches introduites et souches natives.

La revue bibliographique du chapitre I comporte un brefrappel sur les différentes étapes de la nodulation, une mise au point de nos connaissances sur la spécificité de la symbiose soja - *Rhizobium*, et un aperçu des problèmes liés à la classification actuelle des *Rhizobium*.

Nous avons constitué, dans un premier temps, une collection de souches natives de *Rhizobium* tropicaux capables de noduler le soja cv. Malayan, puis nous les avons comparées aux souches typiques de *R. japonicum* et de *R.* cowpea par une étude de taxonomie numérique (chapitre III) et par une étude de leur spectre d'hôte (chapitre IV).

Dans le chapitre V, nous avons comparé les performances symbiotiques des différentes combinaisons soja - *Rhizobium* pour déterminer la meilleure combinaison fixatrice de N_2. Puis dans les chapitres VI et VII, nous avons étudié le problème de la compétition entre *R. japonicum* et *R.* cowpea.
Enfin dans le chapitre VIII, nous avons abordé le problème de la survie de *R. japonicum* et de *R.* cowpea dans le cas d'un sol africain.

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE CONCERNANT LA SPECIFICITE DE LA SYMBIOSE SOJA-*RHIZOBIUM*

I - GENERALITES

Le processus qui aboutit à la formation de nodules fixateurs de N_2 sur les racines du soja englobe une succession complexe d'évènements, commençant par la prolifération des *Rhizobium* au niveau des poils absorbants racinaires (cas considéré comme le plus fréquent). On peut schématiquement diviser ce processus, dont la chronologie chez le soja est représentée dans le tableau I, en quatre stades :

(1) stade de pré-infection, qui englobe la multiplication des *Rhizobium* dans la rhizosphère, leur attachement aux racines, l'induction de la courbure des poils absorbants, et enfin la pénétration du *Rhizobium* dans le poil avec la formation du cordon d'infection. Ces différentes étapes seront détaillées plus loin.

(2) stade d'infection ou d'initiation du nodule, au cours duquel le cordon d'infection progresse à travers les cellules de la zone corticale de la racine, les bactéries se divisant en s'alignant les unes derrière les autres. A ce stade, le cordon est composé de deux couches distinctes : une couche fibrillaire externe de nature végétale et une couche amorphe interne qui présente autour du cytoplasme bactérien une membrane plasmique, une paroi et une couche visqueuse hyaline vraisemblablement de nature polysaccharidique. La présence des cordons d'infection dans les cellules-hôtes provoque le déclenchement de l'organogénèse de la nodulation, avec la multiplication des cellules méristématiques. Deux hypothèses, qui d'ailleurs ne sont pas contradictoires, ont été jusqu'à présent avancées pour expliquer cette induction :

(a) Plusieurs chercheurs (PUPPO et al 1974, HENSON et al 1976, SYONO et al 1976) ont mis en évidence l'existence de phytohormones dans les nodules et, en accord avec l'hypothèse de LIBBENGA (1973), pensent que l'induction de la morphogenèse est sous le contrôle de phytohormones d'origine bactérienne.

(b) Des expériences d'élimination et de transfert de plasmides chez *Rhizobium* (HIGASHI 1967, JOHNSTON et al 1978) et la présence de gros plasmides (CASSE et al 1979) suggèrent que ces plasmides pourraient s'intégrer dans le génôme de l'hôte et déclencher le signal inducteur de la nodulation.

Tableau I : Chronologie de la nodulation chez le soja (*Glycine max*) d'après les observations de BERGERSEN (1958), BIEBERDORF (1938), CARLSON (1969).

(*) temps absolu variable avec les conditions de culture, la date d'infection, le cultivar de soja et d'autres facteurs.

Age du nodule en jours (*)	Etapes de la nodulation
0	- début de l'invasion du poil absorbant par *Rhizobium*.
1-2	- le cordon infectieux atteint la base des cellules épidermiques et entre dans le cortex.
3-4	- petite quantité de cellules infectées dans le primordium nodulaire.
5	- très rapide division des cellules bactériennes et des cellules méristématiques pendant 2 semaines.
7-9	- apparition du nodule sur la racine.
12-18	- la croissance des tissus nodulaires continue ; les tissus infectés deviennent roses à la fin de cette période (apparition de léghémoglobine) et la fixation d'azote commence.
23	- la plupart des divisions cellulaires ont cessé ; le nodule continue à croître par élargissement des cellules végétales ; période de fixation d'azote intense.
28-37	- le nodule atteint sa taille maximale (3 à 6 mm de diamètre), maturation des tissus vasculaires ; la fixation d'azote se poursuit jusqu'au début de la dégénérescence du nodule.
50-60	- dégénérescence du nodule.

Après ramification du cordon d'infection, dont les branches peuvent envahir la presque totalité des couches corticales,les *Rhizobium* sont relachés et envahissent les cellules végétales.

(3) Stade de développement du nodule et de maturation des bactéroïdes. Après 2 semaines de division des cellules végétales, ce qui entraîne l'élimination des cordons d'infection,le nodule grossit par élargissement des cellules végétales ; celles-ci peuvent contenir plusieurs milliers de bactéries qui se sont rapidement divisées et progressivement différenciées en bactéroïdes (BERGERSEN et BRIGGS 1958). Dans les cellules-hôtes de soja, les bactéroïdes sont regroupés en petits îlots entourés d'une seule membrane de séquestration.

A l'inverse des *Rhizobium* à croissance rapide (trèfle, luzerne ou pois), les bactéroïdes de *R.japonicum* ou *R.*cowpea subissent peu de changement de taille par rapport aux cellules végétatives, les principaux changements étant l'altération du matériel nucléaire et l'augmentation du nombre et de la taille des inclusions de poly-β-hydroxybutyrate ou de glycogène, et des granulations de polyphosphates.

A titre indicatif, un nodule de soja âgé de 3 semaines contient environ 2×10^9 bactéroïdes (TSIEN et al 1977) qui constituent jusqu'à 25 à 30 % de la matière sèche nodulaire(BERGERSEN 1974).

(4) stade de la fixation de N_2. L'apparition de la fonction fixatrice de N_2 du nodule est étroitement corrélée à l'apparition de léghémoglobine dans les tissus médullaires du nodule. La léghémoglobine assure une faible pression d'oxygène dans le tissu fixateur et facilite la diffusion d'oxygène vers les bactéroïdes (WITTENBERG et BERGERSEN 1974) ;la phosphorylation oxydative est ainsi fortement augmentée et l'ATP produit est réduit en ADP au niveau du complexe nitrogénasique des bactéroïdes. Dans les nodules,la nitrogénase catalyse la réaction suivante :

$$N_2 + 12\ ATP + 6\ \bar{e} + 8\ H^+ \xrightarrow[Mg^{++}]{\text{nitrogénase}} 2\ NH_4^+ + 12\ ADP + 12\ P_i$$

La figure 1 représente la chaîne des transporteurs d'électrons permettant la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac au niveau de la nitrogénase.

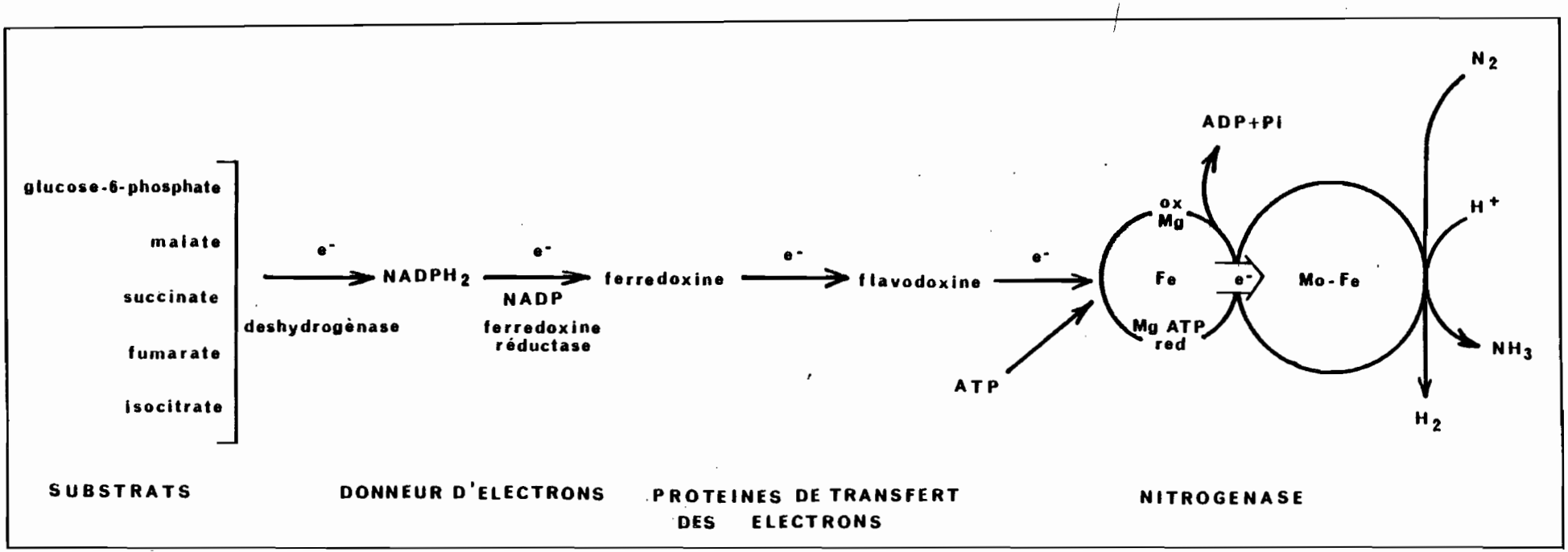


Figure 1: Schéma de transfert des électrons dans les bactéroïdes de nodules de soja, d'après SLOGER (1976).

Les électrons nécessaires à la nitrogénase proviennent essentiellement des produits de l'assimilation chlorophyllienne des feuilles mais d'après SCHUBERT et EVANS (1976) 40 à 70 % seulement des électrons disponibles dans les nodules serviraient à la réduction de N_2, le reste étant utilisé pour former de l'hydrogène suivant la réaction :

$$4\ ATP + 2\ \bar{e} + 2\ H^+ \xrightarrow[Mg^{++}]{\text{nitrogénase}} H_2^+ + 4\ ADP + 4\ P_i$$

La production d'H_2 nécessite une quantité significative d'énergie, perdue aux dépens de la fixation de N_2. Cependant, tous les nodules de légumineuses ne produisent pas d'H_2 ou en produisent très peu ; en outre, certaines souches de *Rhizobium* possèdent une hydrogénase qui catalyse la formation de H^+ à partir de l'H_2 produit par la nitrogénase ce qui permet de recouvrir en partie l'énergie perdue.

Il est probable que la présence d'une hydrogénase augmente l'efficience de la fixation de N_2 (PHILLIPS 1980).

L'énergie nécessaire, d'une part à la fixation de N_2 et d'autre part à l'assimilation du NH_3 formé, provient de la photosynthèse. La dépendance des légumineuses vis-à-vis de la lumière et de la photosynthèse a été démontrée par l'existence de fluctuations diurnes de l'activité fixatrice de N_2 (MINCHIN et PATE 1974). BACH et al (1958) ont montré que les produits photosynthétiques des feuilles de soja étaient rapidement transportés au niveau des nodules.

La figure 2 illustre les relations entre les produits de la photosynthèse, la fixation de N_2 et l'assimilation du NH_3.

II - CONTROLE DE LA SPECIFICITE DANS LES DIFFERENTES ETAPES DE LA NODULATION

En accord avec LI et HUBBEL (1969), nous considérons que la spécificité dans la symbiose légumineuse-*Rhizobium* peut s'exercer au cours des quatre étapes de pré-infection, que nous allons examiner successivement:

1) Prolifération des *Rhizobium* dans la rhizosphère

NUTMANN (1965) a émis l'hypothèse que la rhizosphère d'une

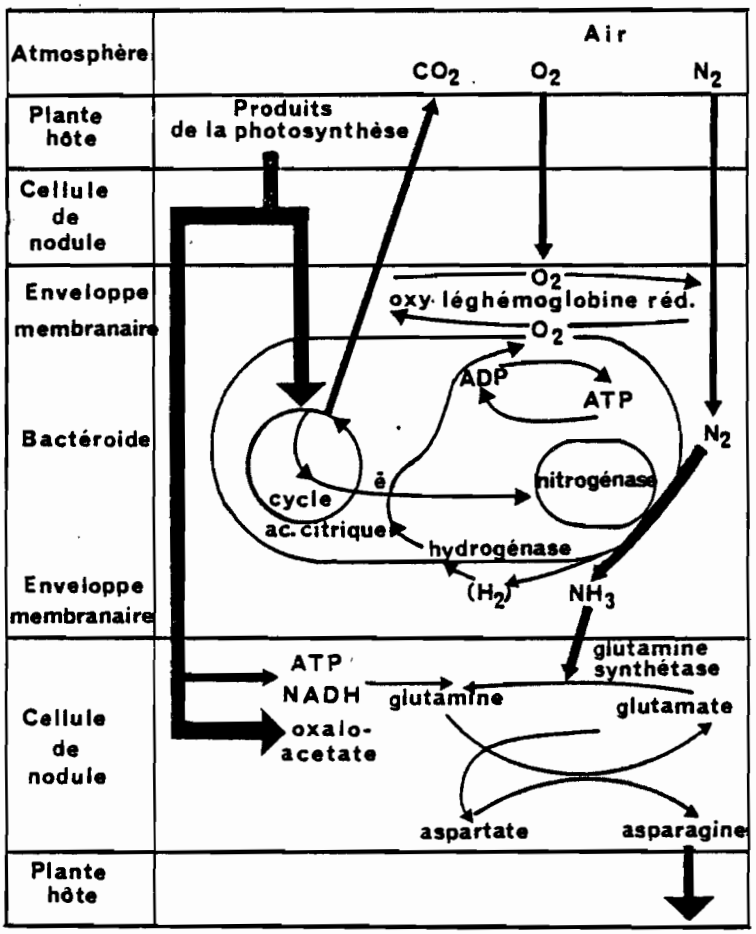


Figure 2: *Principales voies métaboliques associées à la fixation de N_2 dans un nodule de légumineuse, d'après BERGERSEN (1980).*

légumineuse favorise la multiplication de son *Rhizobium* symbiotique préférentiellement aux bactéries saprophytiques ou aux autres *Rhizobium* du sol.

De nombreux auteurs ont montré que la multiplication des *Rhizobium* est en général plus importante dans la rhizosphère d'une légumineuse que d'une non-légumineuse (YAO et VINCENT 1969) ou que dans le sol non rhizosphérique (ROVIRA 1961, ROBINSON 1967, NUTMAN 1970).

Cependant, cette réponse des *Rhizobium* dans la rhizosphère d'une légumineuse peut s'expliquer par un chimiotactisme exercé par les exsudats racinaires, mais qui d'après ROBINSON (1967) n'est pas spécifique.

En outre, REYES et SCHMIDT (1979) ont montré que la présence de sojas ne stimulait pas davantage la prolifération rhizosphérique de la souche USDA 123 que celle d'autres souches de *R.japonicum*, cette souche étant pourtant prépondérante et très compétitive dans certains sols aux USA.

En fait, il ne semble pas y avoir de stimulation pouvant expliquer la spécificité d'hôte au cours de cette étape (DART 1977).

2) Attachement des *Rhizobium* aux racines

Après leur établissement dans la rhizosphère, certains *Rhizobium* s'attachent à la surface des poils absorbants racinaires.

REPORTER et al (1975), BOHLOOL et SCHMIDT (1976) ont décrit l'existence d'une polarité de liaison chez *R.japonicum*. La nature de la substance responsable de la liaison des deux partenaires symbiotiques et le degré de spécificité lié à cet attachement ont fait et font encore l'objet de nombreuses investigations (ALBERSHEIM 1975, BAUER et BHUVANESWARI 1978, BERINGER 1978). L'hypothèse de l'intervention des lectines dans la reconnaissance du *Rhizobium* spécifique par la plante-hôte a été avancée (HAMBLIN et KENT 1973).

a) "L'hypothèse lectines"

L'hypothèse de l'intervention des lectines implique que la reconnaissance du *Rhizobium* au niveau des sites d'infection s'effectue par liaison des lectines de la plante à un carbohydrate unique, situé exclusivement à la surface du *Rhizobium* spécifique, suivant une réaction du type antigène-anticorps (DAZZO 1978).

Les lectines ou phytohémagglutinines sont des glycoprotéines qui ont la propriété de se lier à certains carbohydrates présents à la surface de cellules bactériennes ou d'hématies,leur spécificité de carbohydrate variant suivant la plante d'origine (Tableau II). Par exemple la lectine de soja a des affinités pour le galactose ou le N-acetyl-D-galactosamine, mais n'en a aucune pour le glucose.

Tableau II : Spécificité de carbohydrate des lectines de quelques légumineuses.

Origine de la lectine	Spécificité de carbohydrate	Références
Glycine max	N-acétyl-D-galactosamine	LIENER et PALLANSCH (1952)
Arachis hypogaea	N-acétyl-D-galactosamine	LOTAN et al (1975)
Trifolium repens	2 désoxy-D-glucose	DAZZO et BRILL (1977)
Pisum sativum	D-mannose	ENTLICHER et al (1970)
Lens culinaris	D-mannose, D-glucose	TICHA et al (1970)
Lotus tetragonolobus	α-L-fucose	WATKINS et MORGAN (1952)

b) Corrélation entre la liaison des lectines au *Rhizobium* et la spécificité d'hôte

L'hypothèse de l'intervention des lectines dans l'établissement de la spécificité est fondée sur les premières observations de BOHLOOL et SCHMIDT (1974) qui ont montré, en utilisant de la lectine de soja fluorescente, que cette lectine s'attachait sélectivement aux *R.japonicum* et non aux *Rhizobium* hétérologues incapables de noduler le soja.

IL s'agit là d'une hypothèse encore controversée . En faveur de cette hypothèse, citons à titre d'exemple les travaux de WOLPERT et ALBERSHEIM (1976) et BHUVANESWARI et al (1977) qui ont confirmé la corrélation entre la capacité des souches de *Rhizobium japonicum* à noduler le soja et leur liaison à la lectine, et qui ont montré que cette liaison était réversible et pouvait être inhibée par un haptème tel que le N-acétyl-D-galactosamine.

A l'encontre de "l'hypothèse lectines", CHEN et PHILLIPS (1976) et LAW et STRIJDOM (1977) n'ont pas trouvé de semblable corrélation, puisqu'ils ont montré que certaines souches de *Rhizobium* hétérologues,

ne nodulant pas le soja, pouvaient néanmoins s'attacher à la lectine de soja.

c) Les lectines au niveau des racines

La principale objection à toutes ces études de corrélation est qu'elles utilisent des lectines extraites à partir des graines et non des racines ; les résultats obtenus positifs ou négatifs sont donc indirects et supposent l'identité entre les lectines de graine et de racine.

Or, GATEHOUSE et BOULTER (1980) ont récemment montré que la lectine de pois (*Pisum sativum*) préparée à partir de graines ou de racines est antigéniquement identique, mais que sa spécificité de carbohydrate diffère.

Par contre, PUEPPKE et al (1978) ont montré que la lectine de soja dans les racines est la même que celle des graines, mais qu'elle n'est plus délectable dans les racines quand les plantes sont âgées de 2 à 3 semaines ; cependant, ces mêmes auteurs admettent que la lectine peut se trouver en microquantité au niveau des sites d'infection et que les techniques de dosage utilisées ne sont pas assez fines pour permettre sa détection dans les racines.

Récemment, STACEY et al (1980) ont mis en évidence la présence d'une lectine identique à celle des graines de soja au niveau des poils absorbants des racines de *Glycine max* et de *G.ussuriensis* (plante considérée comme l'ancêtre du soja moderne, NAGATA 1959) et ils ont montré que la liaison polaire de *R.japonicum* aux racines de *G.ussuriensis* était spécifiquement inhibée par un haptène (D-galactose) de la lectine de graine. Ces auteurs concluent que les *R.japonicum* peuvent se lier spécifiquement à la lectine au niveau des poils absorbants racinaires de soja.

d) Récepteurs des lectines à la surface des *Rhizobium*

Une autre voie de recherche pour valider ou non "l'hypothèse lectines" concerne la purification des récepteurs de ces lectines et leur localisation à la surface du *Rhizobium*. L'utilisation de lectines de soja marquées à l'isothiocyanate de fluorescéine a permis la localisation des récepteurs au niveau des polysaccharides capsulaires de

R.japonicum (MORT et BAUER 1980, TSIEN et SCHMIDT 1981).

SANDERS et al (1978), NAPOLI et ALBERSHEIM (1980) ont sélectionné plusieurs mutants de *R.leguminosarum* produisant beaucoup moins d'exopolysaccharides que la souche parentale et étant incapables de noduler leur plante-hôte ; les révertants de chaque mutant ont retrouvé leur production normale d'exopolysaccharides et leur capacité à noduler.

MORT et al (1981) ont montré que la nodulation de mutants de *R.japonicum*, dont la capsule et la liaison à la lectine de soja sont altérées, n'a lieu que si ces mutants synthétisent rapidement leur capsule au contact des racines de soja.

La purification des récepteurs polysaccharidiques et leur conjugaison à un fluorochrome doit permettre de localiser *in vivo* les sites de liaison aux lectines et de montrer la concordance de ces sites aux sites de nodulation.

e) Conclusions sur le rôle des lectines dans la reconnaissance soja-*Rhizobium*

Le soja produisant une protéine, la lectine, qui réagit biochimiquement et spécifiquement avec des polysaccharides du *Rhizobium* homologue, il est probable que cette interaction constitue le principal déterminant ou au moins le déterminant initial de la spécificité d'hôte dans cette association.

D'après BOHLOOL et SCHMIDT (1976), l'attachement du *Rhizobium* au poil absorbant ne serait pas en lui-même spécifique ; il se ferait par l'intermédiaire d'un corps polaire extracellulaire, de nature fibrillaire et polysaccharidique (TSIEN et SCHMIDT,1977), et serait suivi par un stade de liaison hautement spécifique du *Rhizobium* homologue aux lectines.

DAZZO (1975) a proposé un modèle pour représenter la liaison de la lectine de trèfle au *Rhizobium trifolii*. (voir figure 3)

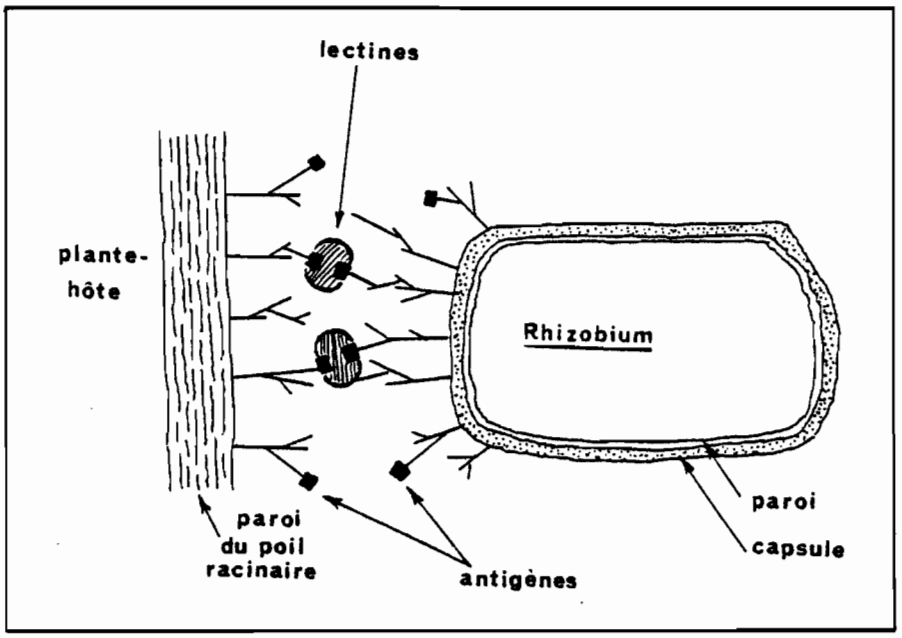


Figure 3: Représentation schématique du mécanisme de reconnaissance de l'hôte par les Rhizobium selon l'hypothèse de DAZZO et al (1975).

3) Courbure_des_poils_absorbants

Après l'attachement des *Rhizobium* à la surface des poils absorbants, le *Rhizobium* homologue induit par un mécanisme encore hypothétique une déformation des poils absorbants racinaires chez la légumineuse-hôte. Cette déformation se traduit par une courbure du poil dont l'accentuation dépend de la partie racinaire infectée, de la plante et de la souche de *Rhizobium* (MC COY 1932, SAHLMAN et FAHRAEUS 1963, LI et HUBBEL 1969).

La déformation des poils absorbants est localisée au niveau des sites de nodulation (NUTMAN 1959) et d'après VINCENT (1974) seule une courbure accentuée du poil (d'angle supérieure à 360°) correspond à une interaction presque aussi spécifique que la formation des nodules.

La nature de l'agent inducteur de cette déformation n'est pas encore définie avec certitude ; CHEN (1938), LJUNGGREN (1961), SOLHEIM (1973) ont montré que le filtrat stérile d'une culture du *Rhizobium* homologue peut engendrer la déformation des poils absorbants moins intensément que le *Rhizobium* lui-même, mais plus intensément que le filtrat obtenu à partir de souches hétérologues (YAO et VINCENT 1969). D'après les résultats de YAO et VINCENT (1976), deux fractions actives seraient impliquées dans la courbure : l'une de nature protéique, partiellement dialysable, stable à la chaleur est trouvée dans le filtrat de culture et l'autre fraction, non dialysable, n'est active qu'en présence du *Rhizobium*.

La spécificité liée à la courbure des poils absorbants semble être sous le contrôle des deux partenaires symbiotiques.

Il est à noter cependant que l'infection du *Rhizobium* par le poil absorbant n'est pas la seule voie possible; en effet, dans de nombreuses associations avec des légumineuses tropicales, comme *Arachis* (CHANDLER 1978), *Stylosanthes* (NUTMAN et al 1978) ou avec la légumineuse à nodules caulinaires, *Sesbania rostrata* (DREYFUS et DOMMERGUES 1981), le *Rhizobium* pénètre au niveau des cellules épidermiques racinaires *(Arachis, Stylosanthes)* ou au niveau des méristèmes dormants de tige *(Sesbania rostrata)*.

4) Pénétration_du_*Rhizobium*_dans_le_poil_absorbant_et_formation_du_cordon_d'infection

Après la courbure de l'extrémité du poil absorbant, il y a

formation d'un cordon d'infection qui progresse ensuite vers l'intérieur de la racine (DART 1977).

Deux hypothèses sont avancées pour expliquer le mode de pénétration du *Rhizobium* : la première suppose l'entrée de la bactérie, sous une forme coccoïde, par l'intermédiaire d'un pore situé entre les microfibrilles cellulosiques du poil (NUTMANN 1956), ou grâce à des enzymes hydrolytiques telles que des pectinases (HUBBEL et al 1978) ou des cellulases (MARTINEZ-MOLINA et al 1979). La seconde hypothèse suggérant la pénétration par invagination de la paroi, rendue plus souple à l'endroit de la courbure (NAPOLI et HUBBEL 1975), semble plus satisfaisante car ce processus permet l'exclusion de toute autre cellule bactérienne et explique ainsi l'existence d'un sérotype unique dans la majorité des nodules (DART 1977).

Ces deux hypothèses néanmoins ont une caractéristique commune, à savoir l'intervention d'enzymes hydrolytiques qui solubiliseraient la paroi au sommet du poil absorbant. Récemment, HUBBEL et al (1978) ont mis en évidence la présence de ces enzymes chez de nombreuses espèces de *Rhizobium* et suggèrent que la spécificité de cette étape serait liée à la grande diversité de substrats et de dispositifs de régulation de ces enzymes (ALBERSHEIM 1969).

Une autre étape, très sélective, concerne la progression du cordon d'infection et l'initiation de la nodulation. En effet, le pourcentage d'infections qui aboutissent à la formation d'un nodule est très faible et dépend encore à la fois de la plante-hôte et de la souche de *Rhizobium* (DART 1977).

Enfin, un degré extrême de spécificité est atteint avec l'avortement du cordon d'infection (BROUGHTON 1978).

5) Conclusions sur le contrôle de la spécificité

L'association légumineuse-*Rhizobium* implique une succession d'évènements, étroitement dépendants les uns des autres, et auxquels se rattachent des degrés de spécificité divers.

La colonisation des racines et la courbure des poils absorbants sont sous le contrôle des deux partenaires, la seconde étape étant plus spécifique que la première. La reconnaissance des deux partenaires, si elle fait réellement intervenir les lectines, est certainement le

Tableau III : Classification en espèces du genre *Rhizobium*, d'après BREED et al (1957).

Espèces	Vitesse de croissance	Zone claire sur lait tournesolé	Production d'acides ou d'alcalis sur milieu standard(*)	Plantes-hôtes	Nom usuel du groupe d'inoculation croisée
R. leguminosarum	Rapide	+	Ac	*Pisum, Lens, Lathyrus, Vicia*	Pois
R. trifolii	Rapide	+	Ac	*Trifolium*	Trèfle
R. phaseoli	Rapide	+	Ac	*Phaseolus vulgaris*	Haricot
R. meliloti	Rapide	+	Ac	*Melilotus, Medicago, Trigonella*	Luzerne
R. japonicum	Lente	-	Alc	*Glycine max*	Soja
R. lupini	Lente	-	Alc	*Lupinus, Ornithopus*	Lupin
R. cowpea	Variable	Variable	Variable	*Vigna, Desmodium, Arachis, Centrosema, Stylosanthes etc.*	Cowpea

(*) Ac: acidification, Alc: alcalinisation, d'après NORRIS (1955).

principal déterminant de la spécificité d'hôte. Enfin le devenir du cordon d'infection est une étape très sélective.

Puisque le contrôle de la spécificité semble s'exercer au minimum à trois étapes de l'infection, cette spécificité ne doit pas être obligatoirement déterminante en une seule étape pour permettre toutes les combinaisons possibles existant entre les légumineuses et les *Rhizobium*.

III - IMPERFECTIONS DANS LA CLASSIFICATION ACTUELLE DES *RHIZOBIUM*

1) Classification du genre *Rhizobium*

Les genres *Rhizobium* et *Agrobacterium* appartiennent à la famille des *Rhizobiaceae* , dans l'ordre des Eubactériales. La classification en espèces du genre *Rhizobium* (tableau III) proposée par BREED et al (1957) est toujours en vigueur.

FRED et al (1932) ont exposé le concept des groupes d'inoculations croisées, qui est à la base de cette classification en espèces. Ce concept implique que chaque espèce de *Rhizobium* ne nodule qu'avec les plantes appartenant à son groupe d'inoculation croisée et qu'un *Rhizobium* isolé d'une plante de ce groupe nodule toutes les autres plantes de ce même groupe.

Si cette classification est utile pour les agronomes, puisqu'on y retrouve les principales légumineuses cultivées, son principe est à présent remis en question par de nombreux microbiologistes.

2) Limites de la classification actuelle

Les plus importantes objections et contradictions concernant cette classification, basée sur l'infectivité, sont les suivantes :

a. Insuffisances des tests de nodulation

La famille des légumineuses dans laquelle on a recensé plus de 14 000 espèces (TUTIN 1958) est, parmi les différents groupes végétaux supérieurs, un des plus riches en espèces et un des plus diversifiés (VINCENT 1974).

D'après ALLEN et ALLEN (1961), 8 à 12 % seulement de ces légumineuses ont été examiné pour la présence ou l'absence de nodulation et un pourcentage encore plus faible de légumineuses (0,3 à 0,4 %) a

Tableau IV: Incidence de la nodulation dans les sous-familles des légumineuses.

Sous-famille	Nombre d'espèces (*)	Espèces examinées (*)	% d'espèces nodulées (*)	Espèces utilisées dans des tests de nodulation (**)
Mimosées	1500	146	87	61
Césalpiniées	1300	115	23	6
Swartzioidées	80	0		
Papilionacées	10000	1024	93	420

(*) ALLEN et ALLEN 1961.

(**) ALLEN et ALLEN 1947.

été utilisé dans des tests d'inoculations croisées (tableau IV).

La tendance actuelle est de considérer les nouvelles souches de *Rhizobium*, isolées de plantes tropicales, comme appartenant au groupe des *Rhizobium* cowpea (GRAHAM 1976). Ce groupe qui d'ailleurs ne figure pas dans la 8ème édition du Manuel de BERGEY (1974) comporte aussi bien des *Rhizobium* à croissance lente ou à croissance rapide associés à des légumineuses tropicales , que des *Rhizobium* capables de noduler une non-légumineuse (genre *Parasponia*, TRINICK 1979).

Nous verrons plus loin (chapitre IV)que ce regroupement des *Rhizobium* tropicaux dans un seul groupe d'inoculation croisée est trop sommaire.

b. Nodulation hétérologue et spécificité d'hôte chez les *Rhizobium* à croissance lente

La nodulation hétérologue traduit la nodulation d'une plante appartenant à un groupe d'inoculation croisée par un *Rhizobium* issu d'un autre groupe.

Les exemples de nodulations hétérologues chez les *Rhizobium* à croissance lente sont particulièrement nombreux notamment chez les groupes du lupin (LANGE 1961), du soja.et de cowpea (LANGE 1966).

La spécificité de certaines combinaisons plante-hôte × souche peut se traduire par l'existence de sous-groupes dans un même groupe d'inoculation croisée, à savoir qu'un *Rhizobium* issu de ce sous-groupe ne nodule pas les autres plantes du même groupe. Par exemple, HAMATOVA (1965) a montré l'existence de combinaisons soja × *R.japonicum* qui ne forment pas de nodules ; l'existence de sous-groupes a été décrite, aussi chez *Centrosema* (BOWEN et KENNEDY 1961) et chez *Stylosanthes* (SOUTO et al 1970), plantes qui appartiennent au groupe cowpea.

c. Support génétique de la spécificité d'hôte

Selon HIGASHI (1967), le caractère qui détermine la spécificité d'hôte peut être transféré par conjugaison entre les souches de *R.trifolii* et *R.phaseoli*. Plus récemment, JOHNSTON et al (1978) ont montré que des souches de *R.phaseoli* et de *R.trifolii*, ayant reçu des plasmides de *R.leguminosarum*, étaient capables de noduler le pois en plus de leurs légumineuses-hôtes (haricot et trèfle respectivement).

Tableau V : Classification en espèces du genre *Rhizobium*, proposée par DE LEY (1968).

Espèces	Relation avec les espèces proposées par BREED et al (1957)	Flagellation	G + C %	Lait tournesolé		Taux de croissance	Caractéristiques de la nodulation
				Zone claire	Réaction acide		
R. leguminosarum	*R. phaseoli* + *R. trifolii* + *R. leguminosarum*	Péritriche	59,0-63,5	+	-	Rapide	Forme des nodules sur tout ou partie de *Trifolium*, *P. vulgaris*, *Vicia Pisum*, *lathyrus*, *lens*.
R. meliloti	inchangée	Péritriche	62-63,5	+	+	Rapide	Forme des nodules avec *Melilotus*, *Medicago*, *Trigonella*.
R. rhizogenes	*Agrobacterium rhizogenes*	Péritriche	61,0-63,0	+	-	Rapide	Provoque des maladies sur le système racinaire des pommiers et d'autres plantes.
R. radiobacter	*A. tumefaciens* *A. radiobacter* *A. rubi*	Péritriche	59,5-63,0	+	-	Rapide	Produisent fréquemment des galles sur les angiospermes
R. japonicum	*R. japonicum* + *R. lupini* + *R. cowpea*	Subpolaire	59,5-65,5	-	-	Lente	Nodulent de nombreuses légumineuses, parmi lesquels *Vigna*, *Glycine*, *Lupinus*, *Ornithopus*, *Centrosema etc.*

La possibilité d'un contrôle extrachromosomique de la spécificité d'hôte est certainement un argument majeur pour remettre en cause la classification actuelle basée précisément sur cette propriété.

3) Propositions pour une nouvelle classification

Des méthodes classiques, utilisées pour la taxonomie des autres groupes bactériens, ont été employées pour classer les *Rhizobium*. DE LEY(1968) a proposé une nouvelle classification de la famille des *Rhizobiaceae* en regroupant le genre *Rhizobium* et certaines espèces d'*Agrobacterium* en un seul genre : *Rhizobium* (tableau V).

Pour établir cette classification, il s'est basé sur des travaux antérieurs d'analyses numériques (GRAHAM 1964, T 'MANNETJE 1967) de déterminations de GC % (DELEY et RASSEL 1965) et d'expériences d'hybridations d'ADN (HERBERLEIN et al 1967).

4) Conclusions sur la taxonomie des *Rhizobium*

GRAHAM (1976) suggère d'adopter la classification de DE LEY (1968) en attendant d'autres propositions. Pour lui, les recherches à venir doivent concerner, en priorité, le groupe des *R.* cowpea afin d'y établir d'éventuels sous-groupes et l'utilisation de tests biochimiques standardisés pour classifier et identifier les souches de *Rhizobium*.

CHAPITRE II
MATERIELS ET METHODES

I - SOUCHES DE *RHIZOBIUM* ET MILIEUX DE CULTURE

1) Isolement de *Rhizobium* à partir des nodules (VINCENT 1970)

Immédiatement après récolte ou après conservation à + 4° C sous atmosphère humide, chaque nodule est stérilisé superficiellement par immersion quelques secondes dans de l'éthanol puis quelques minutes dans 0,1% $HgCl_2$ et enfin rincé à l'eau distillée stérile.

Quand le nodule est suffisamment gros, il est simplement cassé aseptiquement et les *Rhizobium* sont récupérés par piqûre centrale du nodule, avec un filament de platine ; dans le cas de petit nodule, ce dernier est broyé dans un peu d'eau distillée stérile,et, à partir de ce broyat ou de la piqûre, on ensemence par épuisement de la gélose YMA (voir § 2) en boîte de Pétri.

Après incubation à 30° C,seules les colonies qui ont poussé en une semaine environ (*Rhizobium* à croissance lente) sont repurifiées sur gélose YMA. Quand toutes les colonies sont uniformes, la souche pure est conservée à + 4° C sur gélose inclinée YMA, en tube à vis.

Pour longue conservation, la souche est congelée à - 80° C dans un tampon phosphaté (pH 7,5), contenant 10% v.v de glycérol.

2) Milieux de culture

a. Milieu pour *Rhizobium*

Toutes les cultures liquides ont été réalisées avec le milieu YEM classique (VINCENT 1970) : mannitol 10g ; K_2HPO_4 0,5g ; $MgSO_4$ 0,2g NaCl 0,1G ; solution d'oligoéléments 1 ml ; $FeCl_3$ 4×10^{-3}g ; extrait de levure (Difco) 1,0 g ; H_2OQSP 1 litre. Le pH est ajusté à 6,8 et le milieu est autoclavé à 120° C pendant vingt minutes.

Pour la gélose YMA, 20g d'agar (Difco) sont ajoutés pour 1 litre de milieu YEM.

b. Milieu pour les plantes

Le milieu de JENSEN (1942) a été utilisé pour les cultures en tubes de GIBSON : $CaHPO_4$ 1,0g ; K_2HPO_4 0,2g ; $MgSO_4$, $7H_2O$ 0,2g ; NaCl 0,2g ; $FeCl_3$ 0,15g ; solution d'oligoéléments 1 ml ; H_2OQSP 1 litre ; Agar 16g.

Le pH est ajusté à 6,7 avec NaOH et le milieu est autoclavé à 120° C, pendant vingt minutes.

II - ETUDE DE TAXONOMIE NUMERIQUE

1) Etude morphologique

L'aspect des colonies a été déterminé après 6 jours de croissance sur YMA à 30° C. Les flagelles ont été mis en évidence par la technique de Rhodes (1958) ; l'accumulation de poly-β-hydroxybutyrate (PHB) a été révélée par coloration au noir soudan des cellules, après croissance en présence de DL-3-hydroxybutyrate (2%).

2) Tests classiques

Tous ces tests de recherche d'enzymes sont couramment utilisés en taxonomie bactérienne et ont été décrits par GARCIA (1981).

3) Tests nutritionnels

L'assimilation des substrats carbonés a été réalisée suivant STANIER et al (1966), sur milieu gélosé, dont la composition de base est la suivante : Na_2HPO_4, $12H_2O$ 3,8g ; KH_2PO_4 0,98g ; NH_4Cl 0,5g ; $MgSO_4$, $7H_2O$ 30mg ; Tris-HCl, pH 7,5, 10 ml ; solution d'oligoéléments 1 ml ; agar Noble (Difco) 15g ; H_2O distillée Q.S.P. 1 litre ; 155 substrats organiques, constituant l'unique source de carbone et d'énergie, ont été testés à raison de 2g/l pour les glucides et de 1g/l pour les autres composés, à l'exception du phénol dont la concentration a été réduite à 0,25g/l.

L'inoculation et l'appréciation des croissances ont été décrites par GARCIA (1981).

4) Etude de la croissance

Le temps de génération a été déterminé à 30° C, après croissance sur milieu YEM, avec un Biophotomètre enregistreur de BONNET-MAURY et JOUAN.

5) Analyse numérique

Les caractères sont codés 1 pour positif ou présent et 0

pour négatif ou absent. La matrice contenait au total 67 souches et 225 caractères ou 265 en comptant l'antibiogramme ; les données ont été traitées suivant la méthode de liaison complète par groupes et la séparation en phénons a été déterminée d'après le test χ^2.

Les regroupements entre individus ont été effectués sur ordinateur PDP 11, avec un programme disponible au laboratoire de microbiologie du milieu marin, de l' Université de Provence (Marseille).

6) Composition en bases de l'ADN

L'ADN des souches a été purifiée par la méthode de MARMUR (1961) et traitement au phénol des cellules bactériennes, cultivées sur milieu YEM (5 litres) à 30° C pendant 4 jours. Les teneurs en guanine et cytosine ont été estimées d'après la dénaturation thermique des ADN (MANDEL et MARMUR 1968).

III - IDENTIFICATION DES NODULES PAR IMMUNOFLUORESCENCE

Nous avons utilisé la méthode par immunofluorescence directe décrite par SCHMIDT (1968). L'identification des nodules a été réalisée dans l'étude des spectres d'hôtes (chapitre IV), dans les essais d'inoculation au champ (chapitre V) et dans les expériences de compétition (chapitre VI et VII) et de survie (chapitre VIII).

1) Principe

Le *Rhizobium* à l'état libre dans le sol ou la rhizosphère, ou sous sa forme bactéroïde, dans les tissus nodulaires, garde la même structure antigénique (GRAHAM 1969).

L'anticorps, préparé contre une souche de *Rhizobium* est spécifique de cette souche et, conjugué à un fluorochrome, il permet la visualisation directe des bactéroïdes d'un nodule par microscopie à épifluorescence.

2) Préparation des anticorps fluorescents (SCHMIDT 1968)

Nous avons préparé des anticorps contre les 5 souches suivantes: ORS 407, ORS 403, NIG, CB 756, et USDA 135 (cf tableau X).

Tableau VI: Protocole d'immunisation pour l'obtention d'anticorps.

Jours	Opération
1	injection 0,5cc I.V. (*)
2	" 1,0cc I.V.
3	" 1,5cc I.V.
4-6	repos
7	injection 1,5cc I.V.
8	" 2,0cc I.V.
9	" 2,0cc I.V.
16	détermination du titre

(*) I.V. intraveineuse.

a. Obtention des antigènes

Une culture liquide (YEM) de 5 jours est centrifugée à 5000 g, pendant 15'; les cellules sont lavées deux fois, avec de l'eau physiologique (0,85% NaCl) stérile, puis resuspendues pour obtenir 10^9 bactéries/ml. La suspension est alors chauffée à 100°C, pendant 45', pour inactiver les antigènes flagellaires puis conservée à + 4°C, en présence de 0,01% de merthiolate.

b. Obtention de l'antisérum

Deux lapins âgés de 1 mois, sont utilisés pour chaque souche de *Rhizobium*. Les antigènes sont injectés dans la veine marginale de l'oreille; le tableau VI montre le protocole d' immunisation suivi.

Une semaine après la dernière injection, le titre du sérum est déterminé par agglutination. Si le titre est supérieur ou égal à 1280, le lapin est laissé à jeun, pendant 24 heures, puis sacrifié; si le titre est inférieur des injections sous- cutanées de 2ml d'antigènes sont réalisées, chaque semaine, jusqu'à obtention du titre désiré.

Les globulines du sérum sont purifiées par des précipitations successives au sulfate d'ammonium puis dialysées contre de l'eau physiologique. Une partie de l'antisérum est alors conjugée à un fluorochrome, la partie résiduelle étant conservée à - 18°C.

c. Conjugaison des anticorps et du fluorochrome

Après détermination de la teneur en protéines des antisérums par la méthode de LOWRY et al (1951), les anticorps sont dilués avec de l'eau physiologique à 10 mg/ml de protéines. On y ajoute, alors, une solution d'isothiocyanate de fluorescéine (SIGMA), 3% des protéines à marquer, préparée dans un tampon phosphate pH 9,0; le pH est ajusté à 9,2 - 9,5 avec NaOH(0,1M) et le mélange est laissé sous agitation, pendant 6 à 10 heures, à l'abri de la lumière et en présence de merthiolate (0,01%).

L'excès de fluorochrome est éliminé par passage du mélange sur une colonne de Séphadex G50-80 (Sigma) et élution avec un tampon phosphate salin pH 7,2 (PBS), dont la composition est donnée plus loin.

Tableau VII: Tests de contrôle de spécificité des anticorps fluorescents utilisés.

Souches testées	(*) Anticorps fluorescent anti- ORS 403	ORS 407	NIG	CB 756	USDA 31	USDA 135	USDA 138
R. cowpea M.							
ORS 401	-	-	-	-	-	-	-
ORS 403	4+	-	-	-	-	-	-
ORS 405	-	-	-	-	-	-	-
ORS 406	-	-	-	-	3+	-	-
ORS 407	-	4+	-	-	-	-	-
NIG	-	-	4+	-	-	-	-
R. cowpea							
CB 756	-	-	-	4+	-	-	-
61B9	-	-	-	-	-	-	-
R. japonicum							
USDA 31	-	-	-	-	4+	-	-
USDA 110	-	-	-	-	-	-	-
USDA 123	-	-	-	-	-	-	-
USDA 135	-	-	-	-	-	4+	-
USDA 138	-	-	-	-	-	-	4+
61A72	-	-	-	-	4+	-	-
61A93	-	-	-	-	4+	-	-

(*) 4+, fluorescence maximale; 3+, fluorescence moyenne; -, pas de fluorescence.

Ces anticorps, ainsi marqués, sont conservés par fraction de 1ml à 18°C

3) Contrôle de la spécificité des anticorps fluorescents

L'utilisation de la méthode des anticorps fluorescents, pour identifier les souches de *Rhizobium* dans les nodules, implique que ces anticorps réagissent spécifiquement contre la souche ayant servi d'antigène. Les tests de spécificité ont porté sur les cinq anticorps, que nous avons préparés contre les souches citées précédemment, et sur deux anticorps, fournis par le Professeur SCHMIDT, correspondant aux souches de *R. japonicum* USDA 138 et USDA 31.
Les résultats de ces tests figurent dans le tableau VII.

D'après les résultats obtenus, on constate que tous les anticorps fluorescents sont spécifiques, excepté l'anticorps de la souche de *R. japonicum* USDA 31 qui donne une réaction croisée non seulement avec deux autres souches de *R. japonicum* mais aussi avec la souche de *R.* cowpea M ORS406.

Ce résultat n'est pas surprenant, car BOHLOOL et SCHMIDT (1976) ont déjà montré l'existence de réactions sérologiques croisées entre la souche 31 et de nombreuses autres souches de *R. japonicum*. En outre, de nombreuses réactions croisées ont été repertoriées entre les *Rhizobium* du soja, du lapin et du cowpea (GRAHAM, 1963).
et souvent avec un titre agglutinant élevé.

4) Préparation et marquage des frottis nodulaires

Pour chaque traitement élémentaire, 5 plantes sont analysées. Après avoir lavé à l'eau les systèmes racinaires, les nodules de chaque plante sont prélevés, rassemblés et dénombrés; 1/3 ou 50 nodules au maximum par système racinaire sont alors choisis au hasard.

Les nodules sont stérilisés superficiellement par immersion quelques secondes dans de l'éthanol; chaque nodule est ensuite déposé dans un tube contenant 1ml d'eau distillée stérile et écrasé à l'aide d'une tige en verre. La tige est plongée dans l'éthanol et flambée entre chaque tube.

Une goutte de chaque broyat, prélevée à l'anse de platine est déposée sur une lame de verre, préalablement nettoyée à l'éthanol,

Tableau VIII: Barèmes de stérilisation des graines de légumineuses.

Nature des graines	Agent de stérilisation	Temps de stérilisation
Glycine max	$HgCl_2$ 0,1%	3 minutes
Vigna unguiculata	$HgCl_2$ 0,1%	3 minutes
V. radiata	$HgCl_2$ 0,1%	3 minutes
Arachis hypogaea	CaClo 7%	3 minutes
Macroptilium atropurpureum	H_2SO_4 concentré	3 minutes
Acacia albida	H_2SO_4 concentré	1 heure
Stylosanthes humilis	H_2SO_4 concentré	3 minutes
Glycine ussuriensis	H_2SO_4 concentré	5 minutes

le frottis est séché à l'air et fixé à la chaleur; 20 frottis environ peuvent être déposés par lame.

Une goutte de l'anticorps fluorescent approprié étant déposée sur chaque frottis, on incube alors 30 minutes environ, sous atmosphère humide et à température ambiante. Après réaction, les lames sont rincées soigneusement à l'eau distillée, pour éliminer l'excès d'anticorps fluorescent.

La préparation est ensuite séchée et observée avec un microscope à épifluorescence modèle ZEISS, équipé d'une lampe à vapeur de mercure HBO 50W, d'un filtre d'excitation pour isothiocyanate de fluorescence XP490, d'un réflecteur FT510 et d'un filtre d'arrêt FP520. Pour observation à l'immersion (objectif 100 x) les préparations sont montées dans du glycérol entre lame et lamelle.

IV - CULTURE DES PLANTES

1) Stérilisation et germination des graines

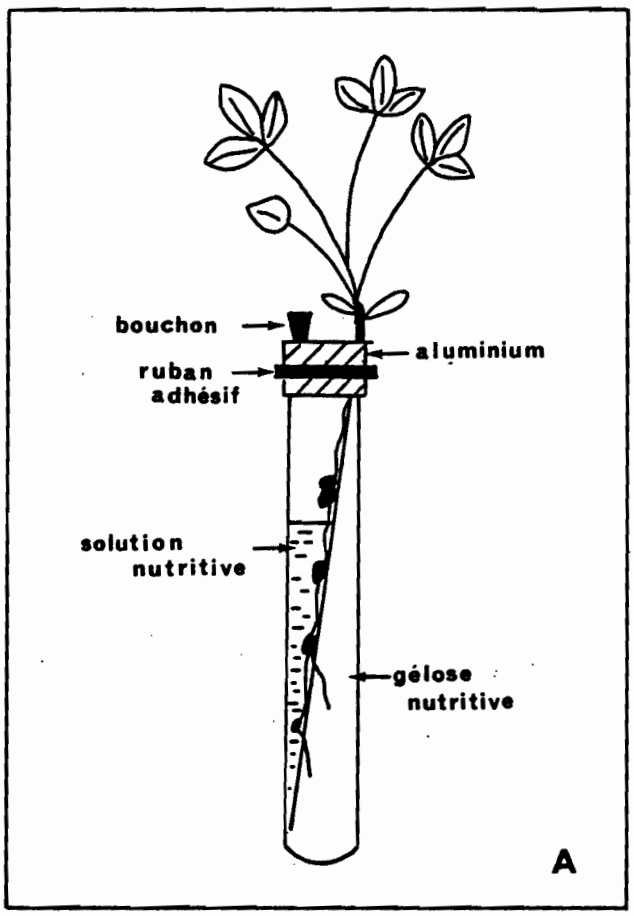
Avant chaque semis, les graines sont triées et stérilisées superficiellement par immersion dans un agent stérilisant et durant un temps donné (Tableau VIII).

Après stérilisation, les graines sont rincées abondamment à l'eau distillée stérile, où elles sont mises à gonfler pendant 1 à 2 heures; puis, elles sont déposées sur de la gélose molle (agar Difco à 9‰) en boîte de Pétri, et mises à germer à 30°C et à l'obscurité, sous atmosphère humide. Quand les graines sont suffisamment développées (2 à 3cm de longueur), celles-ci sont semées dans le sol ou dans les tubes de GIBSON.

2) Dispositif de culture (Figure 4, A et B)

a. Tube de GIBSON (1963)

Des tubes à essai de 18mm de diamètre, avec 16ml de milieu JENSEN gélosé, ont été utilisés pour les petites graines (*Acacia, Macroptilium, Stylosanthes, Glycine ussuriensis*) et des tubes de 30mm de diamètre, avec 60ml de milieu, ont été utilisés pour les plus grosses graines, (*Vigna, Arachis*, Soja).
Les tubes sont laissés sous abri, et les plantules sont récoltées



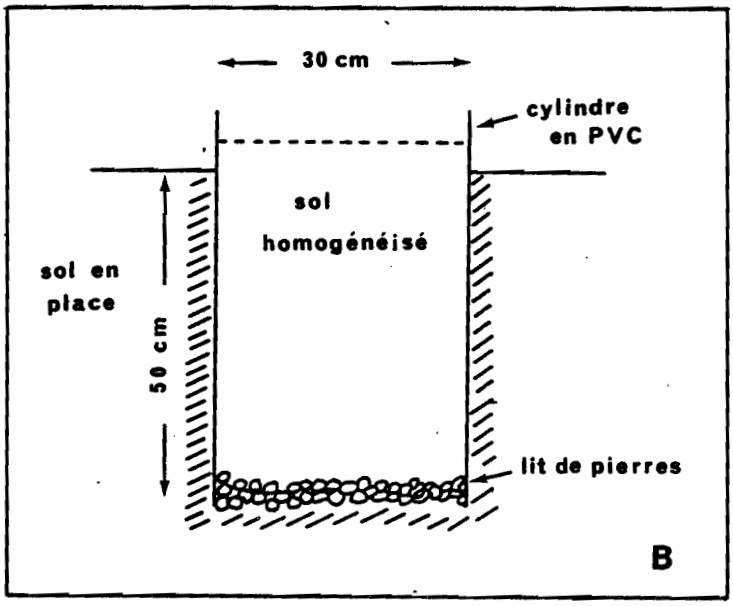


Figure 4: *Représentation des dispositifs utilisés pour la culture des plantes.*
A, culture aseptique en tube de GIBSON.
B, culture en buse pour le soja.

à 4 ou 6 semaines. Chaque traitement élémentaire comporte six répétitions.

b. Vase de végétation

Après homogenéisation du sol, celui-ci est autoclavé à 120°C pendant 1 heure; puis, il est réparti dans des pots en plastique de 12cm de diamètre, ou dans des bacs en plastique, de 75 litres.

Nous avons utilisé les bacs pour l'étude des spectres d'hôtes (chapitre IV). Dans chaque bac, contenant 35 kg de sol environ, 18 plantes ont été cultivées, représentant 3 légumineuses tropicales (*Arachis hypogaea, Vigna unguiculata* et *V. radiata*) ou 3 cultivars de Soja (Malayan, 44A73 ou BOSSIER). Chaque bac est inoculé avec une même souche de *Rhizobium*.

Nous avons utilisé les pots pour les cultures du soja cv. Malayan ou cv. 44A73 (cf chapitres V, VI, VII): dans chaque pot, contenant 1 kg de sol, une plante a été cultivée et sept répétitions ont été réalisées par traitement élémentaire.
Nous avons utilisé le sol de Bel Air, dont la composition figure en annexe I.

c. Culture en buses (LEGG et SLOGER 1975)

Nous avons choisi la méthode de culture du soja en buses, préférentiellement à la culture habituelle en parcelles. Ce mode de culture présente les avantages suivants :
- les plantes sont cultivées dans des conditions pratiquement identiques à celles qui existent dans les essais au champ, conduits habituellement, tout en minimisant les problèmes de contamination entre les divers traitements;
- l'homogénéisation du sol permet de résoudre le problème de l'hétérogénéité, parfois considérable, des sols tropicaux, ce qui réduit avantageusement le nombre de répétitions;
- un nombre, relativement important, de souches ou de traitements divers peut être comparé sur une surface expérimentale restreinte.
Les buses sont constituées par des cylindres en PVC ouverts aux deux extrémités; la quantité de sol, nécessaire au remplissage des buses, est homogénéisée puis répartie dans les buses. Quatre plantes ont été cultivées par buse.

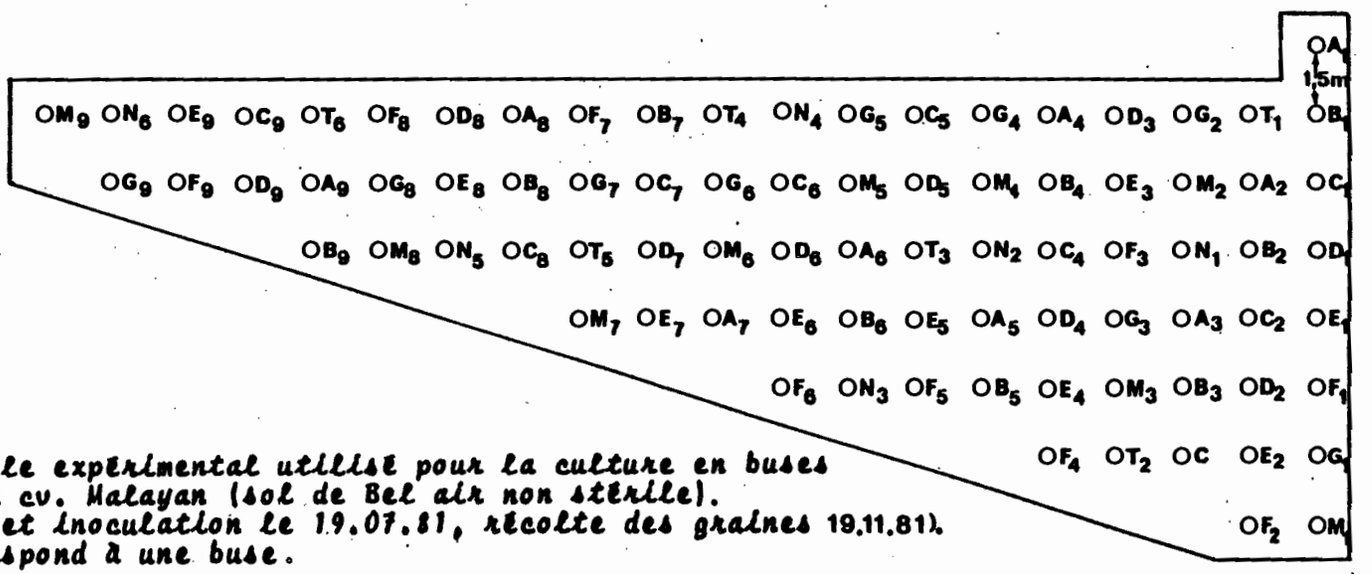


Figure 5: Protocole expérimental utilisé pour la culture en buses du soja cv. Malayan (sol de Bel air non stérile). (semis et inoculation le 19.07.81, récolte des graines 19.11.81). ⊙ correspond à une buse.

Traitements	Signification	Répétitions
T	témoin non inoculé	6
N	témoin non inoculé avec azote (3,4 g par buse	6
A	inoculé avec USDA 138	9
B	inoculé avec ORS 407	9
C	inoculé avec NIG	9
D	inoculé avec ORS 406	9
E	inoculé avec mélange USDA 138 + ORS 407	9
F	inoculé avec mélange USDA 138 + NIG	9
G	inoculé avec mélange USDA 138 + ORS 406	9
H	inoculé avec mélange USDA 138+ORS 407+NIG+ORS 407	9

Traitements chimiques:

- le sol a été traité au Némagon dilué au 1/100 à la dose de 5ml par buse.
- 1 g de supertriple et 1,5g de KCl ont été apportés par buse.
- les plantes ont été traitées régulièrement au Curacron (1ml pour 1 l.) et au HCH pour lutter contre les insectes prédateurs.

Remarques:

- une buse contient environ 30 kgs de sol.
- 4 plantes sont cultivées par buse.
- pour les résultats à 8 semaines les plantes de 4 buses ont été sacrifiées par traitement, sauf pour les traitements T (3 buses) et N (aucune).

La figure 5 montre le dispositif expérimental et les différents traitements effectués pour la culture au champ du soja cv. Malayan et du soja cv. 44A73 (cf chapitres V et VII).

3) Inoculation

Tous les inoculums ont été préparés à partir de cultures liquides YEM, de 100 ml, âgées de 4 jours et incubées à 30°C. Les cultures ont été diluées dans de l'eau distillée stérile, pour obtenir 10^9 *Rhizobium*/ml.

Pour les inoculations mixtes, le nombre de *Rhizobium* vivants est déterminé, pour chaque souche, suivant la technique des dilutions (VINCENT 1970) et étalement sur gélose YMA. Un nombre identique de *Rhizobium* de chaque souche est alors apporté dans l'inoculum mixte. Les plantules ont toujours été inoculées avec 1 ml d'inoculum ainsi préparé.

4) Dénombrement des *Rhizobium* dans le sol

Pour l'étude de la survie des différentes souches de *Rhizobium*, introduites dans le sol de Bel Air non stérile, nous avons utilisé la technique de dilutions du sol décrite par VINCENT (1970).

Après récolte des graines sur les plantes cultivées en buse, nous avons laissé les racines en place dans le sol; 4 mois après la récolte, la terre de chaque buse (3 buses par traitement de souches) est placée dans un bac plastique pour l'homogénéiser.

10 g de terre sont alors prélevés dans chaque bac et dilués par addition de 90 ml d'H_2O stérile. Après agitation 10', des dilutions successives de 10 en 10 sont réalisées jusqu'à 10^{-6}. Avec 1 ml de chaque dilution, on inocule 3 tubes GIBSON, chaque tube contenant une plantule de soja cv. Malayan, soit 18 tubes par échantillon de terre.

Après 4 à 5 semaines, la nodulation est codée + ou - pour chaque tube. Le nombre le plus probable de *Rhizobium* présent par g de sol, pour chaque buse, est alors calculé à l'aide de la table de BROCKWEL (1963). La moyenne des nombres, obtenus sur les 3 échantillons de sol, est alors effectuée pour une même souche.

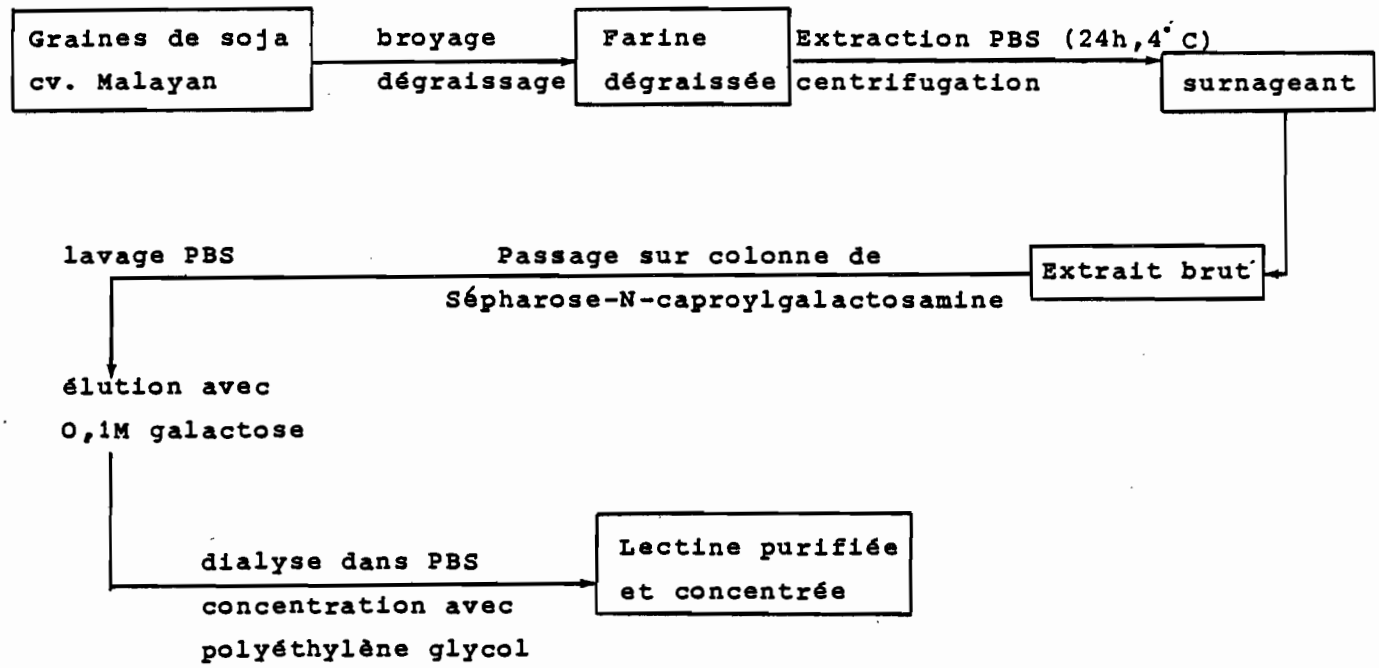


Figure 6: Etapes de la purification de la lectine des graines de soja cv. Malayan.

V - LECTINES

1) Purification de la lectine de soja cv. Malayan (Figure 6)

La lectine a été extraite des graines de soja cv. Malayan, dégraissées et a été purifiée par chromatographie d'affinité sur gel de "Sepharose-N-caproylgalactosamine" suivant la méthode de ALLEN et NEUBERGER (1975).

Le gel a été préparé par couplage du CH Sepharose 4B (Sigma) et D-galactosamine-HCl (Sigma) en utilisant le 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl (Sigma). La figure 6 montre les différentes étapes de la purification.

La lectine a été conjuguée à l'isothiocyanate de fluorescéine suivant la méthode de UDENFRIEND (1962). La lectine marquée, concentrée par dialyse dans une solution de polyéthylène glycol 6000 (Sigma) à 20%, est conservée par fraction de 1 ml à - 18°C.

Les essais d'hémagglutination ont été réalisés avec des hématies de sang humain (groupe O^+), récupérées dans un tampon PBS. Des dilutions successives de 2 en 2 sont effectuées dans une plaque de microtitration, et à 50µl de l'extrait dilué à doser sont ajoutés 50µl de la solution d'hématies. Le titre hémagglutinant est lu 1 H après incubation à 4°C et est égal à l'inverse de la dernière dilution permettant une agglutination.

2) Essais de liaison des lectines au *Rhizobium*

Des cultures liquides (100 ml) sur milieu YEM ont été réalisées dans des erlens à bec de 300 ml, incubés à 30°C. La croissance est suivie par mesure de la densité optique à 460nm, grâce à un colorimètre spectronic 20 (BAUSCH et LOMB). Des frottis sur lame de verre sont effectués à différents âges de la culture et une goutte de lectine fluorescente est déposée sur chaque frottis. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante et sous atmosphère humide, les lames sont lavées 15 minutes dans du tampon PBS pH 7,2 (KH_2PO_4 0,43 g; Na_2HPO_4 1,48 g; NaCl 7,2 g/l). Les préparations, montées dans du tampon PBS, sont observées au plus fort grossissement (objectif 100 à immersion) par épifluorescence.

3) Attachement des *Rhizobium* au poil absorbant

Des plantules de G. ussuriensis ont été cultivées sur le milieu nutritif JENSEN en boîte de Pétri et inoculées avec un inoculum de la souche USDA 138; 4 jours après inoculation, les racines des plantules sont rincées abondamment puis observées à la loupe binoculaire. Des fragments racinaires, contenant de nombreux poils absorbants, sont alors découpés et déposés sur une lame de verre. Après coloration au bleu trypan pendant 10 minutes, les préparations sont observées en contraste en phase, ou marquées à l'anticorps fluorescent anti-USDA138 et observées en épifluorescence.

VI - METHODES ANALYTIQUES

1) Activité réductrice d'acétylène (ARA)

Nous avons utilisé la méthode classique de HARDY et al (1968). Cette méthode est basée sur la propriété de la nitrogénase à réduire l'acétylène en éthylène, la production d'éthylène peut être reliée à la quantité de N_2 fixé, suivant un facteur de conversion théorique égal à C_2H_2/N_2: 3/1 (HARDY 1973).

Cependant de nombreux travaux (MINCHIN et PATE 1974, BALANDREAU et al 1974, AYANABA et LAWSON 1976) ont montré que l'ARA varie suivant un rythme nycthéméral et qu'elle est fonction de nombreux paramètres, comme la concentration en O_2, l'humidité ou la température.

C'est pourquoi, nous avons essayé de réaliser les mesures d'ARA dans les même conditions pour les divers traitements :
- cinq plantes par traitement ont été récoltées à la même heure (15 h) pour les différentes mesures au cours du cycle végétatif, les systèmes racinaires nodulés sont introduits dans des flacons sérum de 250ml, puis bouchés hermétiquement;
- on injecte alors un volume d'acétylène égal à 10% du volume du flacon et les flacons sont incubés à 25°C. Après 30 minutes et 1 H d'incubation des prélèvements de 0,5ml sont effectués et le mélange gazeux est analysé par chromatographie en phase gazeuse, sur un chromatographe Varian Aerograph séries 1400 équipé d'une colonne sphérosil (1,20m). Les températures sont les suivantes : injecteur 120°C, colonne 75°C, détecteur à ionisation de flamme 150°C, le débit du gaz vecteur N_2 est de 40ml/minute.

L'ARA totale est exprimée en µmoles d'éthylène formé par heure et par plante (µmoles $C_2H_4.h^{-1}$/plante). L'ARA spécifique est exprimée par g de nodules poids sec (µmole $C_2H_4.h^{-1}$/g nodules). (4 répétitions sont effectuées par traitement).

2) Méthode des différences

Cette méthode permet de déterminer la quantité d'azote provenant de la fixation symbiotique. La quantité d'azote réellement fixée est obtenue par différence entre la teneur en N total des plantes inoculées et celle des plantes non inoculées (WEBER 1966).

3) Détermination du poids sec

Le poids sec des nodules et des parties aériennes des plantes est déterminé après séchage, à 60°C pendant 48 h, du matériel.

4) Dosage de l'azote minéral

La teneur en azote des parties aériennes a été dosée par micro-KJELDAHL. Après minéralisation de 20 mg de matière sèche à l'acide sulfurique concentré et à l'eau oxygénée (110 vol). L'extrait est alors distillé dans un appareil de PARNAS-WAGNER avec déplacement par 5 ml de soude (10 N). Le distillat est recueilli dans une solution contenant le réactif de TASHIRO et l'ammoniac est dosé par l'acide chlorhydrique (N/70).
Le poids atomique de l'azote étant de 14, à 1 ml d'HCl N/70 ajouté correspond 0,2 mg d'azote. (3 répétitions sont effectuées par échantillon à doser).

5) Dosage des protéines

Elles sont dosées par la méthode de LOWRY et al (1951) avec une solution de sérum albumine de boeuf comme standard. La concentration en mg/ml de cette dernière est déterminée par son absorption à 280nm, en prenant un coefficient d'absorption :

$$\Sigma \frac{280}{BSA} = 42 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mole}.$$

6) Analyse statistique

Pour déterminer la signification de certains résultats nous avons utilisé le test de DUNCAN au seuil de probabilité 0,05.

CHAPITRE III

OBTENTION ET CARACTERISATION DES SOUCHES DE *RHIZOBIUM* NODULANT SOJA ET COWPEA

Les sols de régions tempérées, où le soja n'a jamais été cultivé, sont dépourvus naturellement de *R. japonicum;* on peut citer en exemple le cas des sols européens (OBATON, 1971), où l'inoculation du soja avec *R. japonicum* a permis l'amélioration du rendement de cette culture.

Il en est de même pour les sols tropicaux et en particulier pour les sols africains (ANON 1975). Cependant dans certaines régions de la Tanzanie, du Zaïre et du Nigéria, on s'est aperçu que certains cultivars de soja non inoculés pouvaient être nodulés naturellement (HAM 1978). Des chercheurs de l'IITA(*) (PULVER et al 1978) ont montré d'une part que ces nodulations spontanées étaient plus fréquentes avec des cultivars de soja dérivés du type asiatique, comme le cultivar Malayan, et d'autre part que ces nodules étaient formés par des souches natives de *Rhizobium* tropicaux.

Notre objectif a donc été d'isoler de telles souches de *Rhizobium* natifs dans les sols du Sénégal et de préciser, dans un premier temps, par une étude de taxonomie numérique, leur affinité avec les espèces *R. japonicum* et *R.* cowpea.

I. OBTENTION DE *RHIZOBIUM* NATIFS NODULANT LE SOJA

1) Principe

Nous avons prélevé plusieurs échantillons de sol dans diverses régions du Sénégal, où le soja n'a jamais été cultivé. Afin de piéger les *Rhizobium* natifs susceptibles d'infecter le soja, nous avons cultivé des plantules de soja cv. Malayan sur ces sols et, à partir des nodules récoltés sur les plantules, plusieurs souches de *Rhizobium* ont été isolées. (cf chapitre II).

Nous avons alors inoculé ces souches à des plantules de soja cv. Malayan cultivées en tubes de GIBSON et à des plantules de *Macroptilium atropurpureum* cv. Siratro, qui est une légumineuse tropicale appartenant au groupe d'inoculation croisée cowpea (cf tableau XIII).

(*) IITA : Institut International d'Agriculture Tropicale, Ibadan, Nigeria.

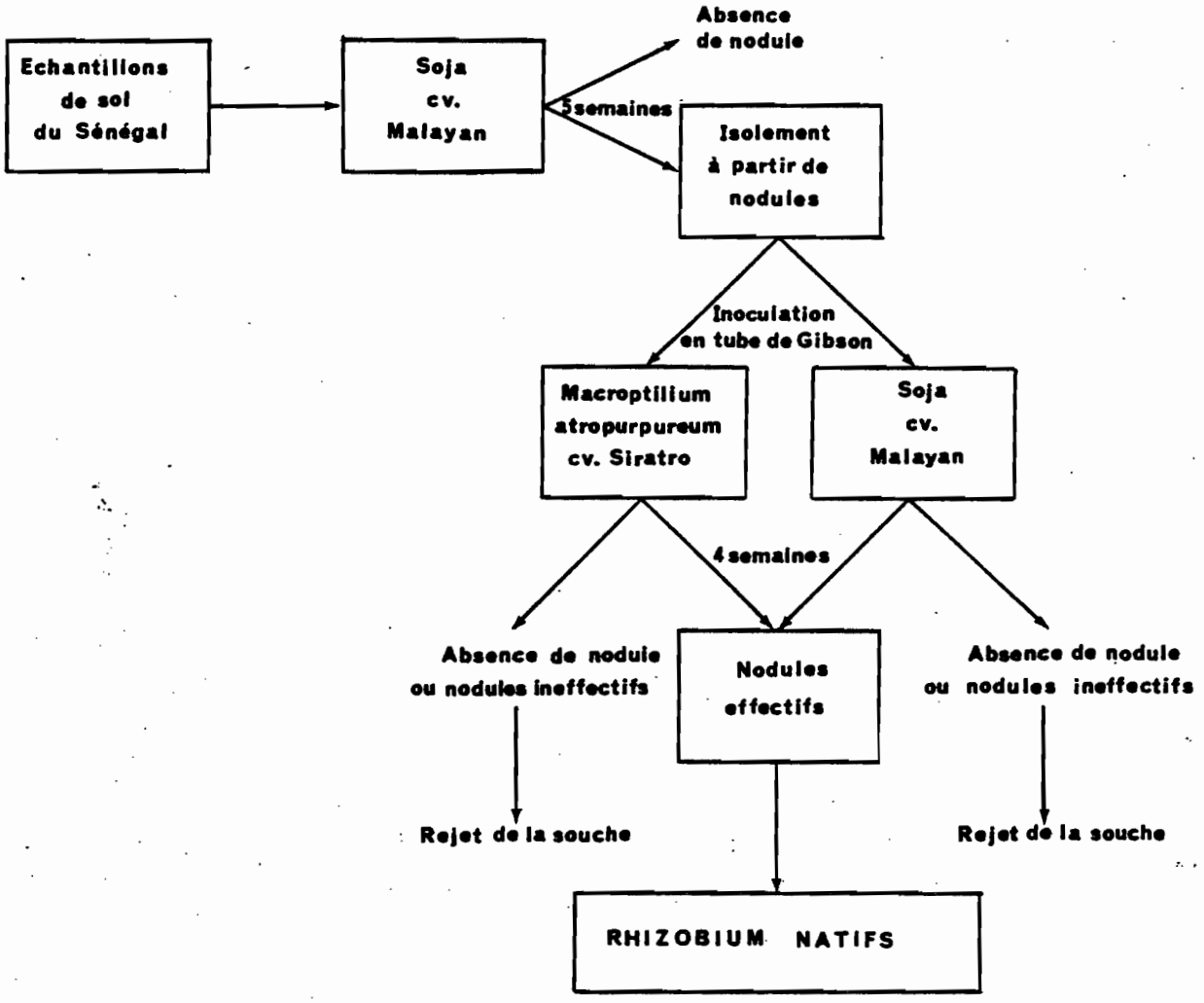


Figure 7: Isolement et sélection de Rhizobium natifs nodulant le soja cv. Malayan (plante - piège) et Macroptilium atropurpureum cv. Siratro (plante de contrôle des Rhizobium tropicaux).

Tableau IX: Effectivité des souches de *Rhizobium* natifs (*R*cM) et de quelques souches de collection de *R.* cowpea (*R*c) et *R. japonicum (Rj) sur Macroptilium atropurpureum* cv. Siratro et *Glycine max* cv. Malayan.

Groupes de *Rhizobium*	Souches	Effectivité sur cv. Siratro	Effectivité sur cv. Malayan	Origine du sol d'isolement
Rhizobium natifs isolés de Malayan (*R*cM)	ORS401	e	e	Dior (*)
	ORS403	e	e	Bel Air (*)
	ORS405	E	e	Bambey (*)
	ORS406	E	E	Casamance (*)
	ORS407	E	E	Sefa (*)
	ORS408	e	e	Sefa (*)
	ORS409	E	e	Bel air (*)
	ORS411	e	e	Casamance (*)
	NIG	e	E	Nigeria (**)
R. cowpea (*Rc*)	CB756	E	O	
	61B9	e	O	
R. japonicum (*Rj*)	USDA31	E	E	
	USDA138	I	E	
	USDA123	I	E	
	USDA135	I	E	

(*) région du Sénégal.

(**) la souche NIG a été fournie par l'IITA d'Ibadan (Nigeria).

E : Nodulation effective, e : peu effective, I: ineffective, O: pas de nodule.

Les choix du soja cv. Malayan, comme plante-piège, et de *M. atropurpureum* cv. Siratro, comme plante de contrôle pour les *Rhizobium* tropicaux, sont justifiés plus loin.

Seules les souches effectives sur ces deux plantes ont été conservées par la suite; nous avons désigné par *R*cM ces souches de *Rhizobium* tropicaux, isolées du soja cv. Malayan.
La figure 7 montre les différentes étapes qui ont permis l'obtention des souches de *R*cM.

2) Résultats

Nous avons isolé ainsi plus de 15 souches de *Rhizobium* à croissance lente, que nous avons testées pour leur effectivité sur les cultivars Malayan et Siratro. Finalement, nous avons retenu huit souches de *Rhizobium* pour leur aptitude à noduler effectivement ces deux légumineuses, appartenant aux groupes d'inoculation croisée : soja et cowpea.

Le tableau IX donne l'effectivité de ces huit souches sur les cultivars Malayan et Siratro, avec celles de quelques souches typiques de *R.* cowpea et de *R. japonicum*.

II. ETUDE DE TAXONOMIE NUMERIQUE SUR LES SOUCHES DE *R.* COWPEA, DE *R. JAPONICUM* ET DE *RHIZOBIUMS* NATIFS.

Les sols africains étant dépourvus naturellement de *R. japonicum* (ANON 1975) mais contenant une majorité de *R.* cowpea, nous avons effectué une étude de taxonomie numérique dans le but de tester l'hypothèse suivant laquelle les caractères biochimiques des *Rhizobium* natifs seraient plus proches des *R.* cowpea que des *R. japonicum* et éventuellement de préciser la position taxonomique de ces deux espèces de *Rhizobium*.

L'étude a porté sur 15 souches, dont la liste est représentée dans le tableau X, et dont la répartition entre les trois groupes de *Rhizobium* s'effectue ainsi : six souches typiques de *R.* cowpea (groupe *R*c), cinq souches typiques de *R. japonicum* (groupe *Rj)* et quatre souches de *Rhizobium* natifs isolées du soja cv. Malayan (groupe *R*cM). Nous n'avons utilisé que quatre souches de *R*cM,parmi celles de notre collection, pour des raisons d'ordre matériel.

Tableau X: Souches de *Rhizobium* utilisées dans l'étude de taxonomie numérique.

Groupe de *Rhizobium*	Souche	Plante d'isolement	Source
Rhizobium cowpea (*Rc*)	ORS801	*Acacia holosericea*	ORSTOM-Dakar, Sénégal
	ORS802	*Acacia sieberiana*	"
	ORS803	*Acacia bivenosa*	"
	ORS809	*Acacia albida*	"
	ORS806	*Leucaena leucocephala*	"
	CB756	*Macrotylama afri-canum*	CSIRO-Brisbane, Australie
Rhizobium natifs isolés de Malayan (*RcM*)	ORS401	Malayan	ORSTOM-Dakar, Sénégal
	ORS403	"	"
	ORS407	"	"
	NIG	"	IITA-Ibadan, Nigeria
Rhizobium japonicum (*Rj*)	USDA135	*Glycine max*	USDA
	USDA138	"	"
	IITA114	"	IITA-Ibadan, Nigeria
	IITA101	"	"
	IITA35	"	"

Tableau XI: Etude de taxonomie numérique, caractères communs.

Caractères biochimiques communs aux 3 groupes de *Rhizobium Rc,RcM,Rj*

Positifs	Négatifs
Alcalinisation sur glucose.	Production d'indole, d'H_2S.
Catalase.	Réaction de Vosges-Proshkauer.
Oxydase.	Hydrolyse de la gélatine, de l'amidon, du tween 80, du jaune d'oeuf.
Hydrolyse de l'urée.	Lysine et ornithine décarboxylases
Réduction du nitrate en nitrite.	Arginine dihydrolase.
Utilisation de l'urée.	Croissance sur NaCl 0,5%, sur KNO_3 8%, à pH 8.
Utilisation des composés carbonés:	Utilisation des composés carbonés:
D (+) glucose, D (+) mannose, D(+) galactose, D-ribose, D-xylose, D(-) arabinose, βD(-) fructose, gluconate, acétate, succinate, maléate, adipate, pimélate, subérate, 2-oxoglutarate, L(+) tartrate, mésotartrate, D-L-glycérate, pyruvate glycérol, L-leucine, L-aspartate, L-glutamate, L-asparagine.	raffinose, D(+) cellobiose, lactose, méthyl-D-glucoside, glycollate, inositol, propane-1,2-diol, butane-2,3-diol, benzoate, β-alanine, L-lysine, L-arginine, D-L-ornithine, aminobutyrate, L-histidine, méthylamine, éthanolamine, bétaine, sarcosine, hyppurate, + 27 autres composés complexes.

265 caractères ont été examinés dans cette étude, dont un spectre nutritionnel utilisant 155 composés carbonés.

1) Principaux caractères communs

L'aspect physiologique des 15 souches est identique :
- bâtonnet Gram⁻ mobile, avec un cil polaire, et contenant des granules de poly-β-hydroxybutirate.
- petites colonies opaques, blanches, avec une production plus ou moins importante de gomme, de nature polysaccharidique.
- temps de génération variant de 6 à 8 heures, ce qui correspond à celui des *Rhizobium* à croissance lente.

En outre, plus de 84 caractères biochimiques sont communs à toutes les souches et sont représentés dans le tableau XI.

2) Caractères discriminants

Une dizaine de caractères seulement permettent de différencier les trois groupes (Tableau XII). Parmi ceux-ci, 4 caractères permettent une distinction entre le groupe *Rj* et les groupes *Rc* et *RcM*: la croissance à 12°C et la dinitrification sont positives pour toutes les souches de *R. japonicum*, et négatives pour toutes celles de *Rc* et *RcM*; il en est de même pour l'utilisation de 2 composés carbonés: le caprate et l'oxalate.

3) Analyse numérique

L'utilisation de la méthode de liaison complète des classes et de la formule du χ^2 pour la répartition en phénons a permis l'établissement d'un dendogramme (figure 8).
D'après ce dendogramme, les 15 souches se répartissent en deux phénons qui se trouvent à l'intérieur du groupe des *Rhizobium* à croissance lente.

Le degré 0,016 de l'index χ^2, qui permet la répartition des souches en phénons a été établi d'après l'ensemble des résultats de cette étude de taxonomie numérique, qui comprenait au total 67 souches de *Rhizobium* à croissance lente et rapide (GARCIA et al, à paraître) et dont seuls les résultats concernant les *Rhizobium* à croissance lente sont répertoriés dans ce mémoire.

Tableau XII: Etude de taxonomie numérique; caractères discriminants.

Caractères	% de souches positives (*)		
	Rc	*Rc*M	*Rj*
Croissance à 12°C	-	-	(+)
Croissance à 41°C	**d**	**(-)**	**d**
$NO_3^- \longrightarrow$ gaz (dénitrification)	(-)	(-)	(+)
Utilisation de composés carbonés :			
Inuline	-	d	(+)
Isovalérianate	+	+	d
2 céto-gluconate	+	+	d
Caprate	-	-	(+)
Oxalate	-	-	+
D-glucosamine	+	(-)	-
Nicotinate	+	(-)	+

(*) + : 100% de souches positives.
(+): 75 à 99% de souches positives.
d : 26 à 74% " "
(-): 1 à 25% " "
- : 100% de souches négatives.

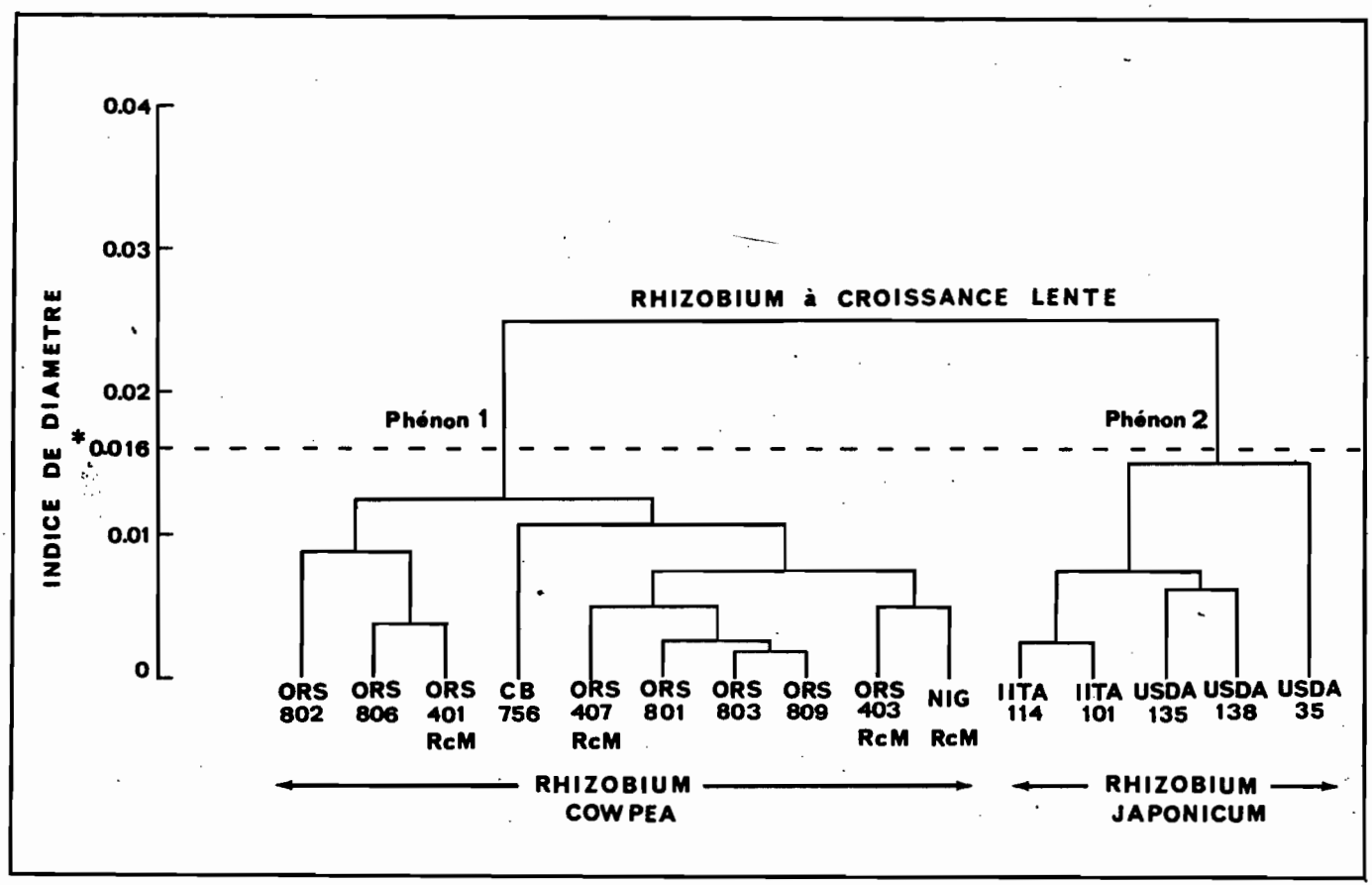


Figure 8: Etude de taxonomie numérique, dendogramme des souches appartenant aux trois groupes R. cowpea (Rc), R. japonicum et R. natifs isolés du soja cv. Malayan (RcM). (*) indice minimum (voir texte).

Les quatre souches de *Rhizobium* natifs isolées du soja cv. Malayan (*Rc*M) se retrouvent dans le phénon 1, avec les souches typiques de *R.* cowpea, alors que les souches de *R. japonicum* sont toutes dans le phénon 2. Néanmoins, on constate que ces deux phénons, *R.* cowpea et *R. japonicum* sont très proches d'un point de vue taxonomique.

Les seuls résultats de GC% que nous ayons pu avoir concernent les souches ORS802 (groupe ***Rc***) et ORS407 (groupe *Rc*M) qui ont le même GC% égal à 64. Ce pourcentage est du même ordre de grandeur que ceux indiqués dans la littérature pour les *R.* cowpea : 59,5 - 65,5 (DE LEY 1968).

III. DISCUSSION

L'isolement de souches de *Rhizobium* tropicaux, capables de noduler le soja, peut-être réalisé en suivant deux méthodes :
(1) La première consiste dans l'isolement de souches de *Rhizobium* à partir de différentes plantes tropicales, appartenant au groupe cowpea. Ces souches sont alors testées pour la nodulation du soja.
(2) La seconde méthode, que nous avons utilisée, consiste à piéger des souches de *Rhizobium* par le soja cv. Malayan, cultivé sur différents sols tropicaux.

Nous avons éliminé la première méthode d'après les résultats obtenus par ROUGHLEY et al (1980), qui ont montré qu'aucune généralisation ne pouvait être faite quant à la probabilité qu'une souche, isolée d'une plante-hôte tropicale donnée, puisse noduler le soja. Par exemple, quelques souches isolées de *Cajanus cajan* ou de *Centrosema pubescens* sont capables de noduler le soja cv. Malayan et d'autres ne le nodulent pas.

Par contre, de nombreux auteurs (ARWOOTH 1974, VAN RENSBURG 1976 PULVER et al 1978) ayant montré d'une part le caractère peu spécifique des cultivars de soja d'origine asiatique, comme le cultivar Malayan, et d'autre part la capacité des *Rhizobium* tropicaux à noduler ces cultivars, nous avons donc choisi la seconde méthode.

Le choix de *Macroptilium atropurpureum* cv. Siratro, comme plante de contrôle pour le groupe cowpea, s'explique par le caractère peu spécifique de ce cultivar, qui peut être nodulé par une très grande variété de *Rhizobium* tropicaux à croissance lente (DATE et HALLIDAY 1978, et voir chapitre IV). Cependant, nous avons trouvé, en accord

avec de nombreux auteurs (GRAHAM et PARKER 1964, VINCENT 1977) que cette plante pouvait être aussi nodulée par des souches de *R. japonicum*.

Il était donc important de vérifier, par un autre critère, la position des *Rhizobium* natifs isolés du soja cv. Malayan (*R*cM) vis-à-vis des souches de *R. japonicum* car, d'après la dernière édition du Manuel de BERGEY (1974), toutes les souches de *Rhizobium*nodulant le soja sont considérées comme appartenant à l'espèce *R. japonicum*.

L'étude de taxonomie numérique, malgré le petit nombre de souches utilisées, nous a permis de montrer qu'en fait les souches de *R*cM sont plus proches des *R.* cowpea que des *R. japonicum*, ce qui confirme en outre l'absence de *R. japonicum* dans les sols du Sénégal.

D'autre part, cette étude a mis en évidence l'étroite relation existant entre les espèces *R. japonicum* et *R.* cowpea sur le plan taxonomique et confirme la difficulté de séparer ces deux espèces (GRAHAM 1964).

CHAPITRE IV

MISE EN EVIDENCE DU CONTINUUM RHIZOBIUM JAPONICUM-RHIZOBIUM COWPEA

Les sols africains sont pourvus naturellement de *Rhizobium* tropicaux à croissance lente ou rapide, capables de noduler une très grande variété de légumineuses tropicales. Pendant longtemps les *Rhizobium* tropicaux ont été considérés comme étant peu spécifiques (DATE et HALLIDAY 1978), mais des résultats récents (GIBSON et al 1982) montrent qu'en fait ces *Rhizobium* tropicaux peuvent être classés en trois groupes suivant leur spécificité d'hôte. On distingue ainsi (Tableau XIII) par ordre de spécificité croissante :

(1) la majorité des souches tropicales à croissance lente, qui sont associées à des légumineuses pour la plupart traditionelles en Afrique *(Arachis, Cajanus, Vigna etc..)*. Ces souches sont peu spécifiques (une souche isolée de *Vigna* par exemple peut noduler effectivement la plupart des autres légumineuses de ce groupe) et représentent le groupe des *R.* cowpea *"sensu stricto"*.

(2) une minorité de souches à croissance lente, qui sont associées à des légumineuses tropicales peu cultivées et qui sont spécifiques. L'inoculation croisée d'une même souche aux légumineuses de ce groupe se traduit souvent par une nodulation ineffective.

(3) toutes les souches tropicales à croissance rapide, qui sont caractérisées par une grande spécificité. Par exemple, DREYFUS et DOMMERGUES (1981) ont montré qu' une souche isolée de nodules caulinaires de *Sesbania rostrata* ne nodule effectivement que cette plante sur cinq plantes du même groupe.

Au chapitre IV, nous venons de voir que les *Rhizobium* natifs (*Rc*M) sont plus proches d'un point de vue biochimique des *R.* cowpea *sensu stricto* que des *R. japonicum* . Notre objectif est maintenant de vérifier cette apparenté sur le plan de la spécificité d'hôte qui, nous l'avons vu (chapitre I), est à la base de la classification en espèces des *Rhizobium*.

I. ETUDE DU SPECTRE D'HOTE DE *R.* COWPEA, DE *R. JAPONICUM* ET DES *RHIZOBIUM* NATIFS.

1) Principe

Nous avons étudié la spécificité des trois groupes de *Rhizobium* (*Rc*, *Rj*, *Rc*M) vis-à-vis de neuf plantes-hôtes, qui se répartissent ainsi :

- trois cultivars de soja: Malayan, cultivar asiatique; 44A73, cultivar ISRA(*) sélectionné au Sénégal et proche du type américain et Bossier, cultivar américain;

(*) ISRA: Institut Sénégalais de la Recherche Agricole, Bambey, Sénégal.

Tableau XIII: Classification des *Rhizobium* cowpea "*sensu lato*" d'après GIBSON et al (1982).

Vitesse de croissance	Groupe de nodulation	Espèces de légumineuses (*)
Souches à croissance lente	Peu spécifique (*R.* cowpea "*sensu stricto*).	*Acacia albida*, *Arachis hypogaea*, *Cajanus cajan*, *clitoria* sp., *Crotalaria* sp., *Glycine wightii*, *Indigofera* sp., *Lablab purpureus*, *Macroptilium atropurpureum* *Phaseolus lunatus*, *Psophocarpus tetragonolobus*, *Pueraria* sp., *Stylosanthes guyanensis (majorité de cultivars)*, *Stylosanthes humilis*, *Teramnus sp.*, *Vigna radiata*, *V. unguiculata*, *Voandzeia subterranea*, *Zornia* sp.
Souches à croissance lente	Spécifique	*Adesmia* spp., *Centrosema* spp *Coronilla spp.*, *Desmodium intortum*, *Lotononis spp.*, *Lotus sp.*, *Stylosanthes spp.*
Souches à croissance rapide	Spécifique	*Acacia raddiana*, *A. Senegal*, *Albizia jlibrissin*, *Andura sp.*, *Leucaena leucocephala*, *Psoralea sp.*, *Samanea sp.*, *Sesbania sesban*, *Sesbania rostrata.*

(*) Les espèces de légumineuses soulignées ont été utilisées dans l'étude du spectre d'hôte.

- six espèces de légumineuses tropicales, appartenant au groupe cowpea: *Acacia albida, Arachis hypogaea, Macroptilium atropurpureum, Stylosanthes humilis, Vigna radiata* et *V. unguiculata* (tableau XIII).
Les 11 souches de cette étude se répartissent ainsi :
- deux souches de collection de *R.* cowpea: CB756 et 61B9 (groupe *Rc*);
- quatre souches de collection de *R. japonicum*: USDA31, USDA123, USDA135 et USDA138 (groupe *Rj*);
- cinq souches de *Rhizobium* natifs : ORS 403, ORS 405, ORS 406, ORS 407 et NIG (groupe *Rc*M).

La réponse de la plante-hôte à l'inoculation se situe à deux niveaux: (1) la présence ou l'absence de nodulation qui définit un spectre de nodulation; (2) la quantité de N fixé par la plante-hôte qui traduit l'effectivité de la souche inoculée et définit un spectre d'effectivité.

2) Spectre de nodulation

a. Résultats

Le tableau XIV donne les spectres de nodulation des 11 souches testées.
Groupe *Rc*: les souches correspondantes, CB756 et 61B9, ne nodulent que les plantes du groupe cowpea et aucun cultivar de soja;
Groupe *Rj*: les souches appartenant à ce groupe nodulent non seulement les trois cultivars de soja, mais aussi plusieurs légumineuses tropicales, dont *V. unguiculata, V. radiata* et *M. atropurpureum*.
Il est à noter que les souches de *R. japonicum* utilisées ne nodulent pas *Arachis hypogaea*, mais que certaines souches de *Rj.* ont été répertoriées pour noduler cette légumineuse (PUEPPKE et al 1980).
Groupe *Rc*M : ces souches présentent le plus large spectre d'hôte, nodulant la plupart des légumineuses tropicales et quatre souches sur cinq nodulant les trois cultivars de soja, à la différence des souches de *Rc*.

La photo A montre les différences dans la nodulation de *V. unguiculata* suivant la souche de *Rhizobium* inoculée. Nous avons observé que la couleur des nodules est caractéristique chez cette plante de la souche de *Rhizobium* qui les forme et qu'elle peut varier du rouge foncé au blanc suivant la souche. Une telle observation chez

Tableau XIV: Réponses, au point de vue nodulation, de six légumineuses tropicales et trois cultivars de soja à l'inoculation par deux souches de *R.* cowpea (*Rc*), cinq souches de *R.* natifs isolés de Malayan (*Rc*M) et quatre souches de *R. japonicum (Rj)*.

	← Espèces de légumineuses tropicales →						← Cultivars de Soja →		
Groupe de *Rhizobium*	*Vigna unguiculata*	*Macroptilium atropurpureum*	*Vigna radiata*	*Acacia albida*	*Stylosanthes humilis*	*Arachis hypogaea*	*G. max* cv. Malayan	*G. max* cv. 44A73	*G.max* cv. Bossier
***R.* cowpea (*Rc*)**									
CB 756	+	+	+	+	+	+	-	-	-
61 B9	+	+	+	+	+	-	-	-	-
***R.* natifs isolés de Malayan (*Rc*M)**									
NIG	+	+	+	+	+	-	+	-	-
ORS 405	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ORS 403	+	+	-	+	+	+	+	+	+
ORS 407	+	+	-	+	+	+	+	+	+
ORS 406	+	+	+	+	+	-	+	+	+
R. japonicum (Rj)									
USDA 31	+	+	+	+	-	-	+	+	+
USDA 138	+	+	+	+	-	-	+	+	+
USDA 123	+	+	+	-	-	-	+	+	+
USDA 135	+	+	+	-	-	-	+	+	+

+ : présence de nodules; - : absence de nodules.

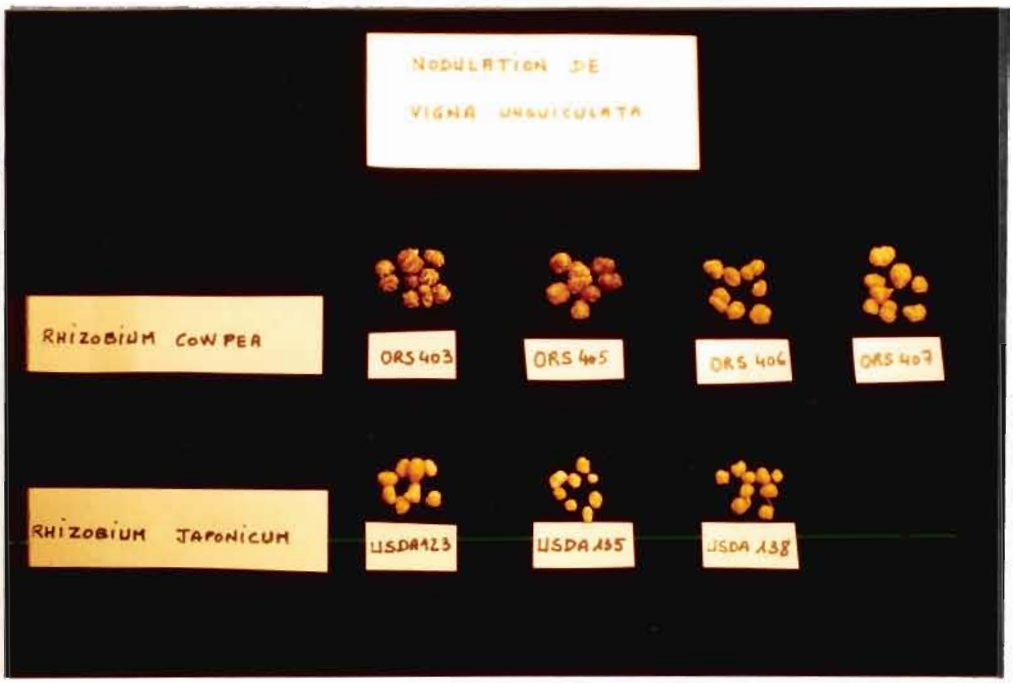
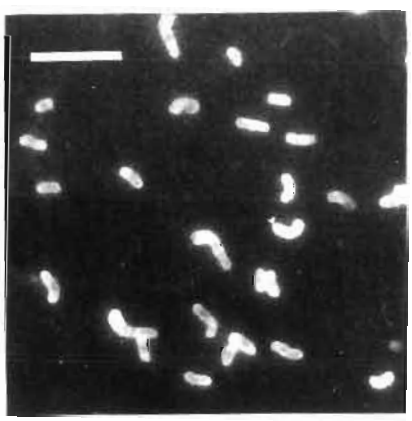
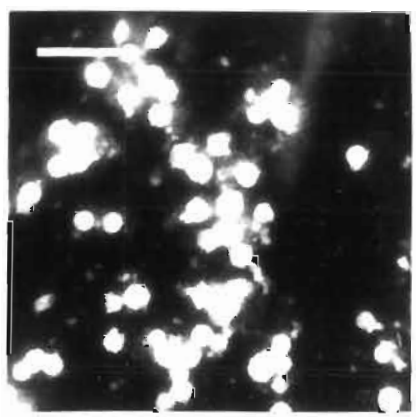

NODULATION DE
VIGNA UNGUICULATA
RHIZOBIUM COWPEA
ORS 403
ORS 405
ORS 406
ORS 407
RHIZOBIUM JAPONICUM
USDA 123
USDA 135
USDA 138

PHOTO A

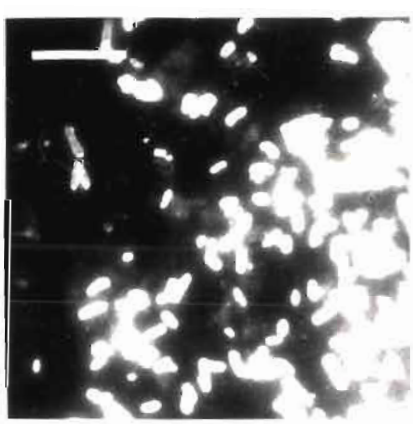
1



2

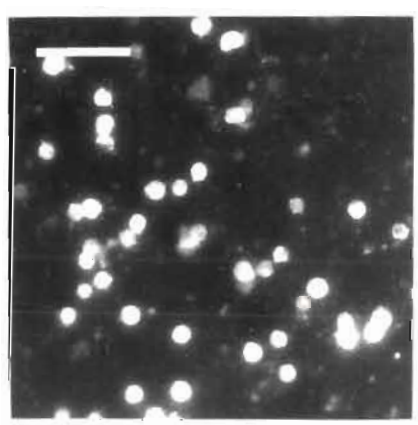


3



4

2 µ



5

Planche I. - Observation, en épifluorescence, de la souche de *Rhizobium* cowpea M ORS 407, marquée à l'anticorps fluorescent anti-ORS 407, sous sa forme libre (culture *in vitro*) et symbiotique (bactéroïde).

Photos 1 : Culture liquide de 60 heures sur milieu YEM.

2 : Bactéroïdes d'un nodule de *Glycine max* cv. Malayan.

3 : Bactéroïdes d'un nodule de *Arachis hypogaea*.

4 : Bactéroïdes d'un nodule de *Acacia albida*.

5 : Bactéroïdes d'un nodule de *Stylosanthes humilis*.

cette plante n'a, à notre connaissance, jamais été publiée bien que des études soient en cours pour définir l'origine et l'importance de ce caractère symbiotique (MULONGOY comm. pers.).

b. Identification des souches dans les nodules

Bien que les plantes-hôtes aient été cultivées sur sol stérile, ou en tubes de GIBSON, la contamination des plantes non inoculées est pratiquement inévitable (les *Rhizobium* contaminants sont introduits lors de l'arrosage ou véhiculés par les poussières de l'air).
Nous avons eu, au cours de cette expérience, quelques plantes - témoins nodulées. Cependant, l'identification des nodules par immunofluorescence (chapitre II) a montré que, dans le cas des plantes inoculées, la plupart des nodules ont été formés par les souches inoculées.

Les photos de la planche I, obtenues avec l'anticorps fluorescent de la souche *Rc*M ORS 407 illustrent ce fait, à savoir que cette même souche est bien responsable des nodules formés sur *Acacia albida*, *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes humilis* et soja cv. Malayan entre autres.

Comme nous l'avons vu au chapitre I, on peut vérifier d'après la comparaison de la photo 1, représentant la souche ORS407 sous sa forme libre, avec les photos 2, 3, 4, 5, représentant cette même souche sous sa forme bactéroïde, que la taille des bactéroïdes et des cellules libres varie peu chez les *Rhizobium* à croissance lente. Par contre, on voit que la forme des bactéroïdes change suivant la plante-hôte: alors que les bactéroïdes de *Vigna unguiculata*, *Acacia albida* et *Glycine max* ont une forme en bâtonnet analogue à celle des cellules libres, les bactéroïdes de *Stylosanthes humilis* et *Arachis hypogaea* ont une forme sphérique caractéristique (STAPHORST et STRIJDOM 1972). Cette différence d'aspect des bactéroïdes d'une même souche, en fonction de la plante-hôte, confirme le fait que le développement des bactéroïdes est sous le contrôle de la plante-hôte (DART 1977).

3) Spectre d'effectivité

L'effectivité de chaque souche a été calculée d'après la teneur en N de la plante-hôte, puis exprimée en pourcentage de l'effectivité de la souche CB756, dans le cas des légumineuses tropicales, ou de la souche USDA138, dans le cas des cultivars de soja.
Le spectre d'effectivité des 11 souches est donné par la figure 9.

Groupe *Rc* : la souche CB756 est une souche recommandée par USDA(*) pour l'inoculation de *Vigna unguiculata*. Nos résultats confirment la validité de cette recommandation (seule la souche de *Rc*M NIG est aussi effective sur cette plante) et en outre ils montrent que cette souche est effective sur les autres plantes du groupe cowpea. La souche 61B9 (souche Nitragin) est peu effective sur *Stylosanthes humilis* et ne nodule pas *Arachis hypogaea*. Nous avons vu d'autre part que ces deux souches ne nodulent aucun cultivar de soja.
Groupe *Rj* : les souches appartenant à ce groupe sont très effectives sur les trois cultivars de soja et sont en général peu effectives par rapport aux souches de *R.* cowpea (*Rc* ou *Rc*M) sur les légumineuses tropicales qu'elles nodulent.
Groupe *Rc*M : les souches correspondantes nodulent effectivement la plupart des légumineuses tropicales et leur effectivité est comparable à celle des souches typiques de *R.* cowpea, en particulier la souche de référence CB756.

Certaines souches de *Rc*M sont aussi effectives que les souches de *R. japonicum* sur le cultivar asiatique Malayan, mais elles sont beaucoup moins effectives sur les deux cultivars de type américain.

4) Spécificité de la plante-hôte dans le cas du soja

Les performances symbiotiques des 5 souches de *Rc*M et des 4 souches de *R. japonicum* ont été analysées d'un point de vue quantitatif sur les trois cultivars de soja. Ces résultats sont représentés dans la figure 10.
On constate que d'une part les performances symbiotiques des souches de *R. japonicum* restent voisines sur les trois cultivars et d'autre part que la nodulation et l'effectivité des *Rhizobium* natifs décroissent fortement quand on passe du cultivar Malayan au cultivar 44A73 et sont pratiquement nulles dans le cas du cultivar Bossier.

On observe donc une spécificité du soja vis-à-vis des *Rhizobium* natifs qui est déterminée par le type de cultivar. Cette spécificité est d'autant plus marquée quand on passe du cultivar Malayan (type asiatique) au cultivar Bossier (type américain). Une telle spécificité ne se manifeste pas vis-à-vis des souches de *R. japonicum* que nous avons étudiées.

(*) USDA: United States Department of Agriculture, Beltsville, USA. (Centre de Collection pour les souches de *Rhizobium*)

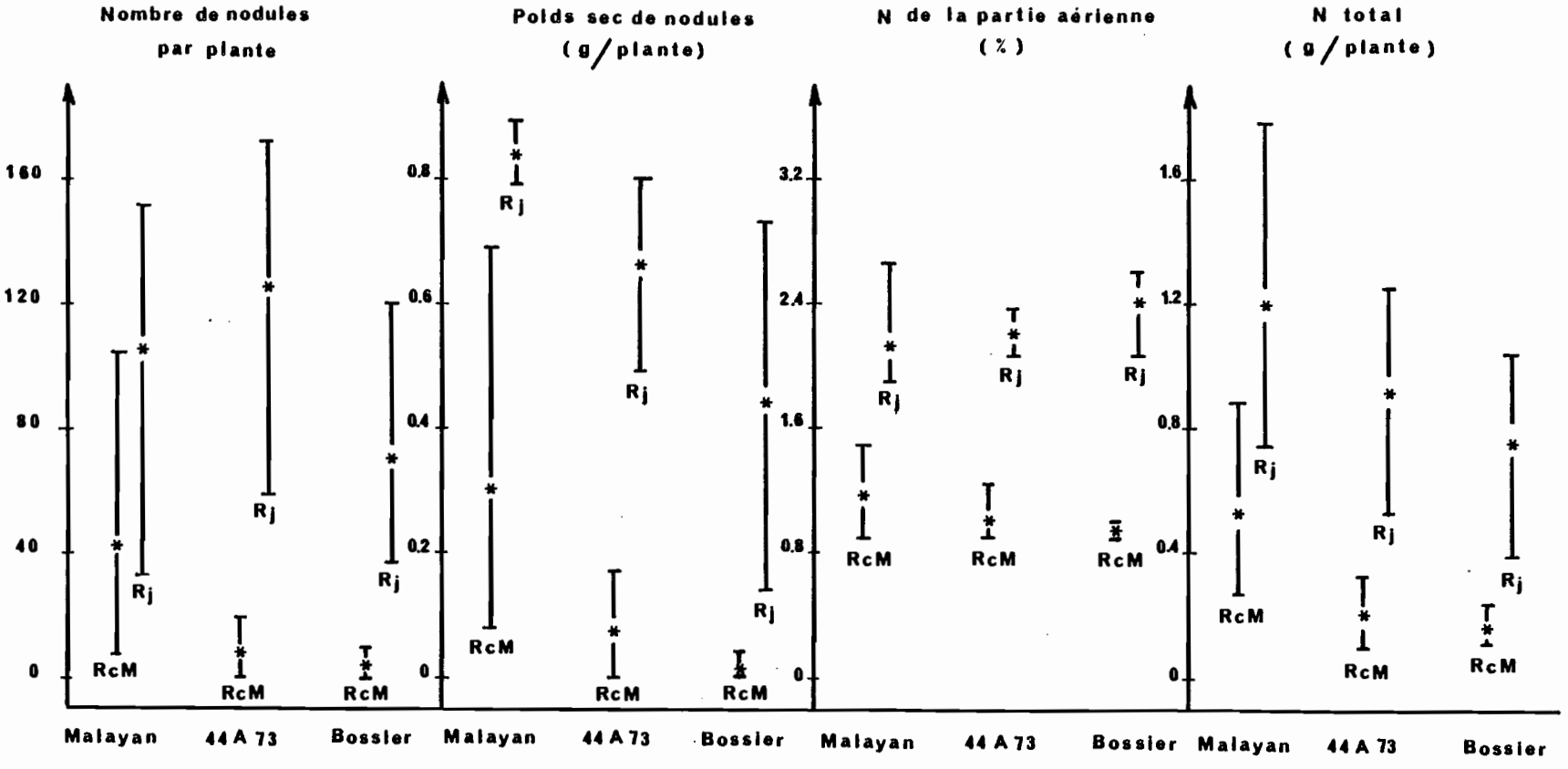


Figure 10: *Distribution des performances symbiotiques de cinq souches de Rhizobium natifs isolées de Malayan (RcM) et de quatre souches de R. japonicum (Rj) sur trois cultivars de soja: Malayan, 44A73 et Bossier.*
(les lignes verticales représentent la variation des distributions, (*) désigne la performance moyenne).

II. DISCUSSION

Dès 1923, LEONARD a montré que des souches de *R. japonicum* étaient capables de noduler d'autres espèces de légumineuses que le soja et en particulier *Vigna unguiculata* (groupe cowpea), alors que quelques souches seulement de *Rhizobium* cowpea, isolées de *V. unguiculata*, pouvaient noduler certains cultivars de soja. Par la suite, de nombreux travaux ont été réalisés pour distinguer les souches de *R. japonicum* des souches de *R.* cowpea. Nombre de ces travaux (LEONARD 1923, SEARS et CARROL 1927, WALKER et BROWN 1934, WILSON 1944, GRAHAM et PARKER 1964) n'ont pas permis de différencier ces deux espèces, bien qu'ils aient utilisés pour cela de nombreux tests de morphologie, de biochimie et de nodulation.

Notre tentative pour différencier les souches de *R. japonicum* et de *R.* cowpea (*Rc* ou *Rc*M), en nous basant sur le caractère spécifique des associations entre une souche de *Rhizobium* et une plante-hôte, à la fois au point de vue de la nodulation et de l'effectivité, nous permet de faire les conclusions suivantes :

(1) sur le plan méthodologique, le test de nodulation ne permet pas à lui seul de distinguer les souches de *R. japonicum* des souches de *R.* cowpea (*Rc* ou *Rc*M), même en y incluant de nombreuses plantes des deux groupes d'inoculation croisée correspondants. En effet, nous avons vu (Tableau XIV) que les nodulations hétérologues sont aussi fréquentes dans le groupe du soja que dans le groupe cowpea.

(2) il existe un continuum entre les souches typiques de *R.* cowpea et de *R. japonicum*, dans lequel les souches de *Rhizobium* natifs isolés du soja cv. Malayan (*Rc*M) occupent une position intermédiaire (JARA et al 1981). L'existence d'un tel continuum est montré (figure 9) par le fait que les spectres de nodulation et d'effectivité des souches de *Rc*M recouvrent en partie les spectres des souches de *R.* cowpea et de *R. japonicum*. En outre, nous avons vu que ces deux espèces étaient très proches l'une de l'autre sur le plan taxonomique (chapitre III).

(3) les souches de *R. japonicum* forment un groupe de *Rhizobium* plus spécialisé dans la nodulation du soja que les souches de *R.* cowpea. Cette spécialisation est montrée par le fait que la spécificité, au niveau du cultivar de soja, vis-à-vis des souches de *Rc*M ne semble pas s'exercer vis-à-vis des souches de *R. japonicum*.

Nous reviendrons par la suite sur ce problème essentiel de la spécificité au niveau du cultivar de soja.

Nos résultats confirment les hypothèses émises par BROMFIELD et ROUGHLEY (1980) qui ont comparé, presque simultanément à nos travaux, les performances symbiotiques de diverses souches de *R. japonicum* et de *R.* cowpea (*R*c et *R*cM) sur 3 plantes-hôtes seulement: *Vigna unguiculata*, *Glycine max* cv. Malayan et cv. Bossier .

CHAPITRE V

PERFORMANCES SYMBIOTIQUES DE *R. JAPONICUM* ET *R.* COWPEA M SUR LE SOJA

L'objet des recherches rapportées dans ce chapitre est de comparer les performances symbiotiques des souches de *R. japonicum* et des souches de *R.* cowpea M en vue de déterminer l'association symbiotique la plus efficace dans le cas du cultivar Malayan et du cultivar 44A73.

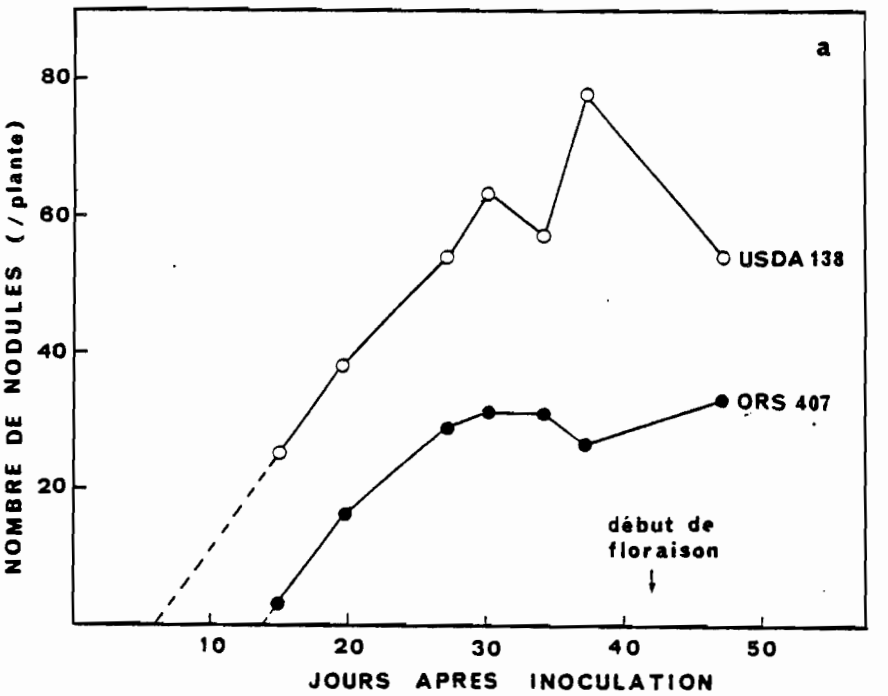
Pour atteindre cet objectif, on opère habituellement comme suit (BURTON 1975 et DATE 1976) :
(1) dans un premier temps, la souche de *Rhizobium* est sélectionnée d'après son effectivité qui est évaluée dans des conditions d'environnement contrôlées (culture de la plante-hôte sur sol stérile et en serre, par exemple);
(2) les souches les plus effectives dans ces conditions sont alors testées au champ sur sol non stérile et comparées entre elles pour leur effectivité, leur compétitivité et leur persistence dans le sol;
(3) enfin, la réponse des meilleures souches à un facteur environnemental précis (température, pH du sol etc...) peut être évaluée soit en conditions contrôlées, soit au champ.

En ce qui nous concerne, nous avons procédé de la façon suivante: dans une première phase, nous avons effectué la comparaison des performances symbiotiques de *R. japonicum* et de *R.* cowpea M au cours de la première partie du cycle végétatif du soja cv. Malayan, cultivé sur sol stérile; dans une deuxième phase, nous avons étudié l'influence d'un seul facteur environnemental, la température en raison de son importance, cette étude ayant été réalisée sur sol stérile et pendant la première partie du cycle végétatif du cv. Malayan; enfin, dans une troisième phase, nous avons comparé les réponses du soja cv. Malayan et du soja cv. 44A73, cultivés au champ (sur sol non stérile), à l'inoculation par *R. japonicum* ou *R.* cowpea M. Cette dernière étude a été suivie pendant tout le cycle végétatif pour le cultivar Malayan et jusqu'à la floraison seulement pour le cultivar 44A73.

I. COMPARAISON DES PERFORMANCES SYMBIOTIQUES DE *R. JAPONICUM* ET *R.* COWPEA M SUR LE SOJA cv. MALAYAN.

1) Principe.

Nous avons utilisé la souche de *R. japonicum* USDA138 et la souche *R.* cowpea M ORS 407 (cf Tableau IX). La souche USDA 138 est



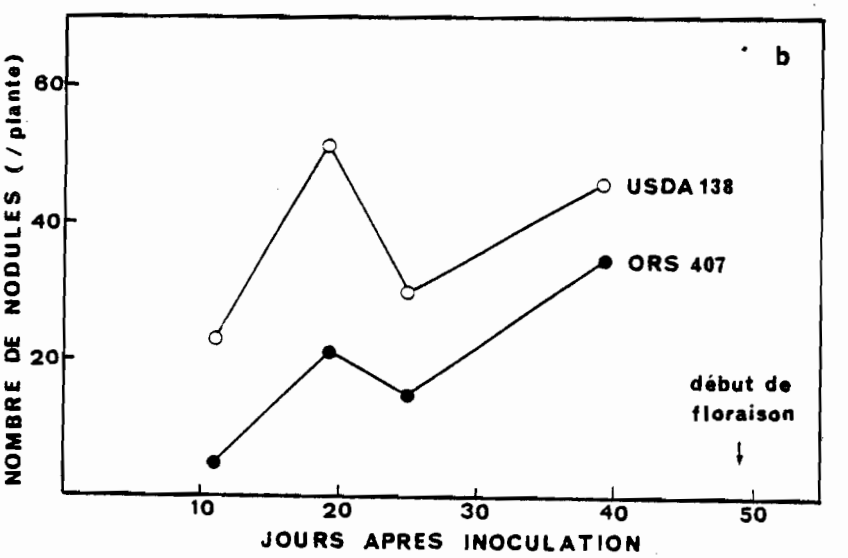


Figure 11: Variation du nombre de nodules au cours du cycle végétatif du soja cv. Malayan, inoculé avec USDA 138 (-○——○-) ou ORS 407 (-●——●-).
a, Température racinaire 25/16 °C
b, Température racinaire 27/20 °C

une souche de collection recommandée par USDA Beltsville pour l'inoculation du soja en milieu tempéré et est utilisée comme inoculum au Sénégal, ce qui justifie son choix comme souche de référence. Nous avons utilisé la souche ORS407 pour des raisons pratiques.

Les plantules de soja cv. Malayan ont été cultivées en vases de végétation et inoculées dès le semis, suivant un protocole déjà décrit (chapitre II); des plantules non inoculées ont été utilisées comme traitement témoin.

Cette étude a été réalisée à deux périodes de l'année : Janvier et Novembre, qui correspondent aux températures racinaires moyennes suivantes : 25/16°C et 27/20°C (jour/nuit) respectivement. Les températures des parties aériennes présentent de plus grandes variations, mais n'ont pas été relevées car elles ont une influence indirecte seulement sur la symbiose (DOMMERGUES 1978).

La nodulation et la fixation de N_2 ont été suivies régulièrement au cours du cycle végétatif jusqu'aux environs de la période de floraison du soja cv. Malayan. Le cycle végétatif du soja variant avec la photopériode (voir annexe II), les dates de floraison se situent vers la 6ème semaine du cycle en Janvier et vers la 7ème semaine en Novembre.

2) Cinétique de la nodulation

Les courbes de nodulation du soja cv. Malayan, inoculé avec USDA138 ou ORS407, sont représentées par les figures 11,a et b (variation du nombre de nodules) et 12,a et b (variation du poids de nodules).

On constate d'après ces courbes que :
- le nombre et le poids de nodules formés par USDA 138 ou ORS 407 augmentent rapidement au cours du cycle végétatif. La figure 11,a montre qu'un maximum est atteint à la période du cycle correspondant à la floraison. Ce résultat est conforme aux données de la littérature (NASH et SCHULMAN 1976) qui indiquent,en outre, que le maximum de nodulation englobe la période de floraison et de remplissage des gousses;
- l'apparition du premier nodule visible à l'oeil nu sur la racine du soja cv. Malayan est plus précoce quand la souche inoculée est USDA 138. La date d'apparition du premier nodule peut être estimée par extrapolation des courbes de nodulation: d'après la figure 11 a, cette date

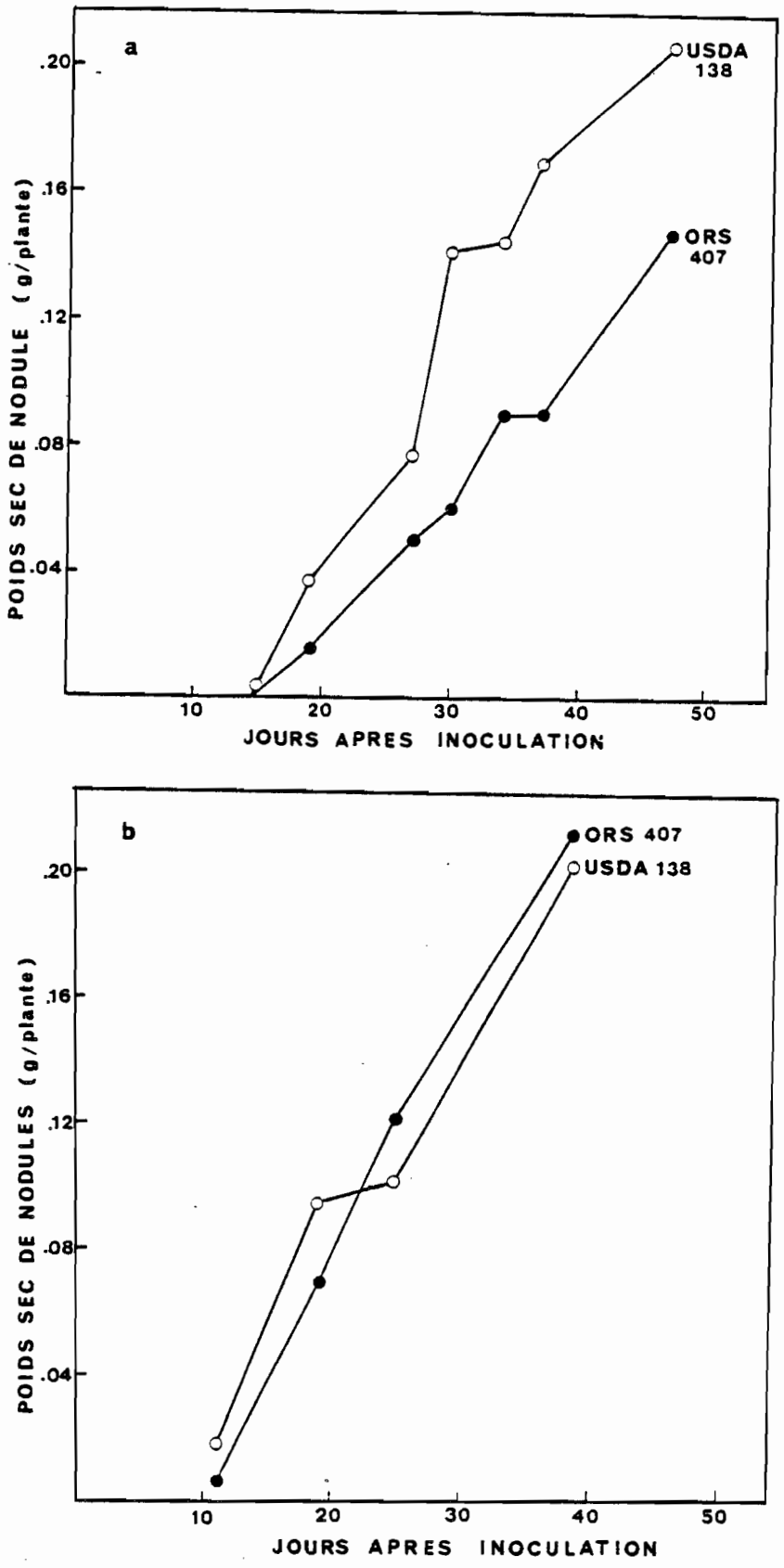


Figure 12: Variation du poids sec de nodules au cours du cycle végétatif du soja cv. Malayan, inoculé avec USDA 138 (-○——○-) ou ORS 407 (-●——●-).
a, Température 25/16° C, b; Température 27/20° C.

correspond approximativement au 6ème jour après inoculation dans le cas de USDA 138, et au 14ème jour après inoculation dans le cas de ORS 407.

Nous avons comparé la vitesse de nodulation de la souche USDA138 à trois autres souches de *R.* cowpea M (ORS 403, ORS 406 et NIG). Dans tous les cas, nous avons observé que l'apparition du premier nodule est plus précoce quand la souche inoculée est USDA 138.
L'effet de la température sur la nodulation est discuté plus loin (§ II dans ce chapitre).

3) Cinétique de la fixation de N_2

Nous avons estimé la fixation de N_2 par la mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) sur les racines excisées et par l'estimation de l'azote fixé par la plante (chapitre II).

a. Variation de l'ARA au cours du cycle végétatif

Seules les mesures réalisées sur le soja cv. Malayan, cultivé à 25/16°C, ont été reportées dans les figures 13,a et b. La figure 13,a montre que l'ARA spécifique atteint un maximum très rapidement après l'apparition de l'activité fixatrice de N_2, puis décline régulièrement jusqu'à la sénescence des nodules.
Les nodules formés par USDA 138 présentent une ARA spécifique maximale vers le 22è jour, et ceux formés par ORS 407 vers le 32ème jour.
Ce décalage peut s'expliquer par le décalage observé dans la formation des nodules, qui est du même ordre de grandeur.
La figure 13,b montre que l'ARA totale des nodules formés par USDA138 ou ORS407 augmente au cours du cycle végétatif. Encore une fois, on constate que l'ARA apparaît plus précocément quand la souche inoculée est USDA138 (vers le 15ème jour, soit 10 jours environ après l'apparition des nodules sur la racine).

Cependant l'ARA totale des nodules formés par ORS407 est supérieure à celle des nodules formés par USDA138 après le 30ème jour du cycle environ. La diminution de l'ARA totale observée au 37ème jour pour les deux souches est consécutive aux conditions expérimentales et en particulier à une baisse de la température et de l'ensoleillement; en fait, avec des conditions climatiques constantes l'ARA totale

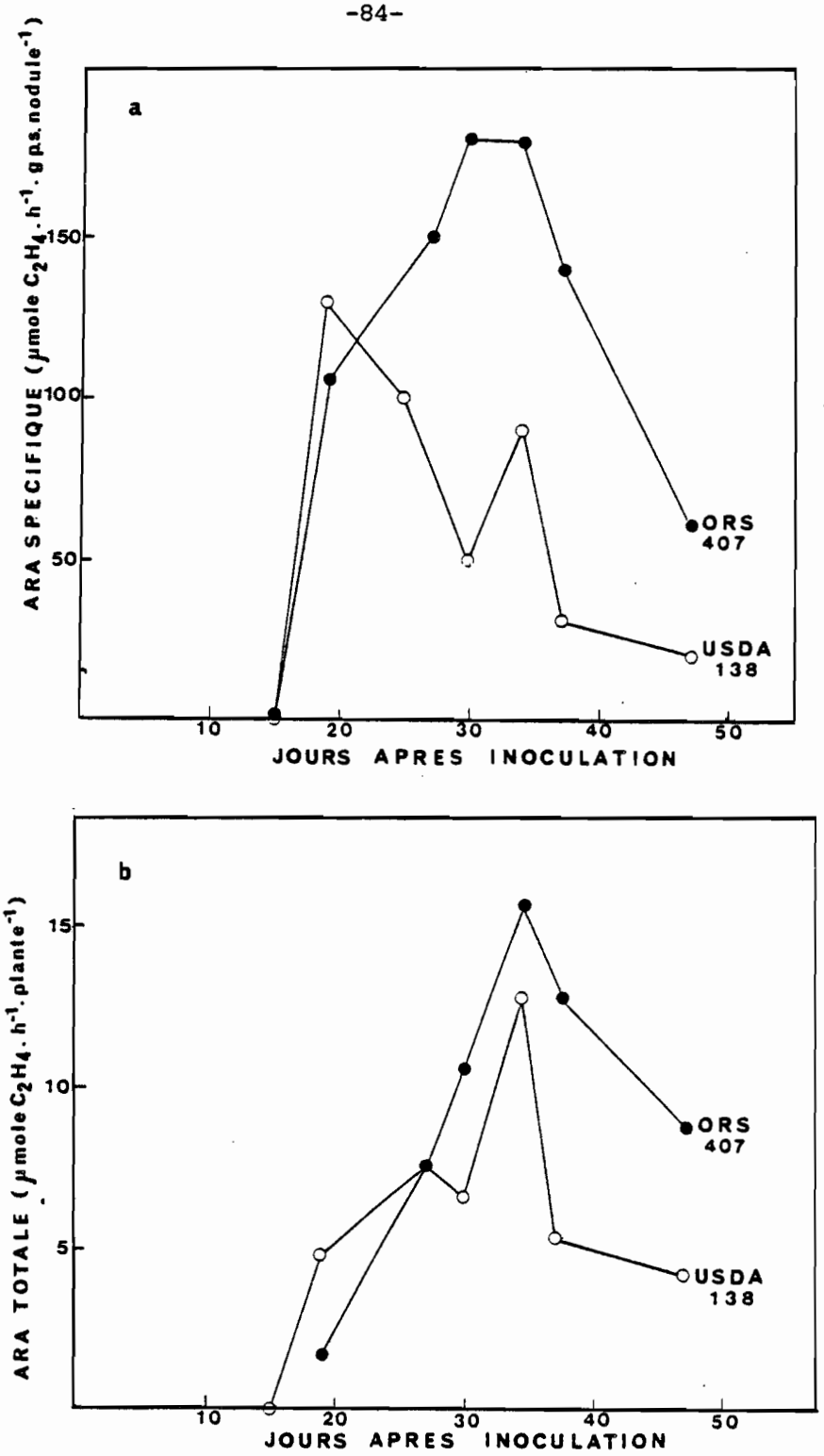


Figure 13: *Variation de l'ARA au cours du cycle végétatif du soja- Malayan, inoculé avec USDA 138 (○—○) ou ORS 407 (●—●).*
(Température 25/16° C)
a, ARA spécifique.
b, ARA totale.

augmente régulièrement jusqu'à la période de floraison et de remplissage des gousses, puis décline avec la sénescence des nodules.

b. Variation de la quantité de N fixé au cours du cycle végétatif.

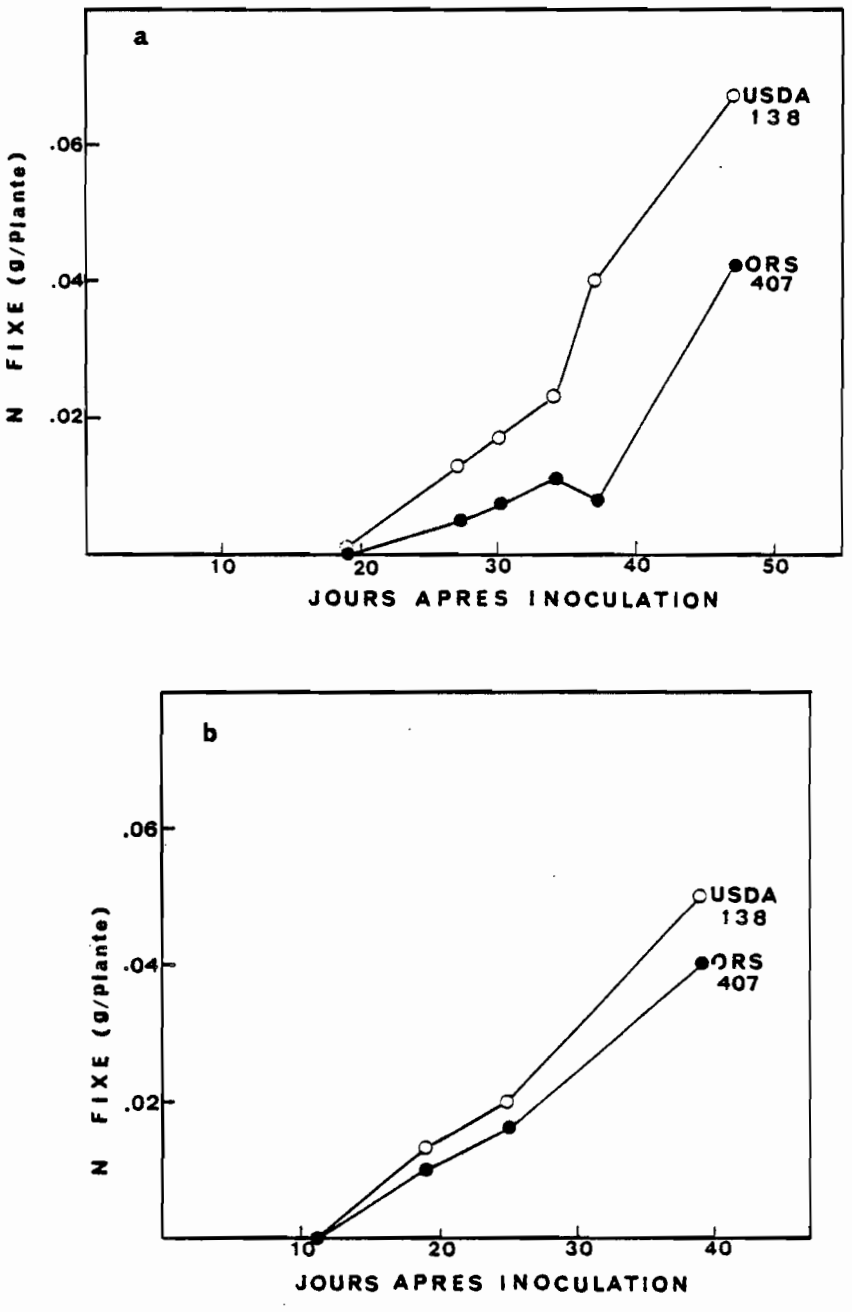
Nous avons estimé la quantité de N fixé par les plantes inoculées par la méthode des différences décrite au chapitre II. D'après les figures 14,a et b, on voit que la vitesse de fixation de N_2 suit une cinétique semblable pour les deux souches.
En accord avec WEBER (1971), la vitesse de fixation de N_2 chez le soja varie au cours du cycle végétatif de la manière suivante :
(1) période de croissance végétative : après une phase dite critique, pendant laquelle la plante utilise ses réserves azotées et épuise l'azote du sol la fixation de N_2 commence lentement; les plantes sont alors âgées de 3 semaines et sont jaunes;
(2) période de floraison : la fixation de N_2 entre dans une phase dite logarithmique; la plante devient verte et vigoureuse;
(3) période de remplissage des gousses : la fixation de N_2 atteint un maximum peut décline à la période de maturation jusqu'à la sénescence des nodules.

Sur les figures 14,a et b, le premier et le début du deuxième stade de la fixation de N_2 sont représentés.
Aux deux régimes de température, on constate que le taux de N réellement fixé par le soja cv. Malayan est plus élevé avec la souche USDA 138 par rapport au taux de N fixé avec la souche ORS407. La souche de *R. japonicum* USDA 138 est donc plus effective que la souche de *R.*cowpeaM ORS 407.

II. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LES PERFORMANCES SYMBIOTIQUES DE *R. JAPONICUM* ET *R.* COWPEA M DANS LE CAS DU SOJA cv. MALAYAN.

1) Effet global de la température sur la symbiose Malayan-*Rhizobium*.

La comparaison des performances symbiotiques des souches USDA 138 et ORS 407 sur le soja cv Malayan soumis à deux régimes de température différents montre que la température agit non seulement sur la nodulation mais aussi sur la fixation de N_2. En effet, d'après les résultats présentés dans les figures 11, 12 et 14, on constate qu'une



— Figure 14: N fixé au cours du cycle végétatif du soja cv. Malayan, inoculé avec USDA 138 (○—○) ou ORS 407 (●—●).
a, Température 25/16 °C.
b, Température 27/20 °C.

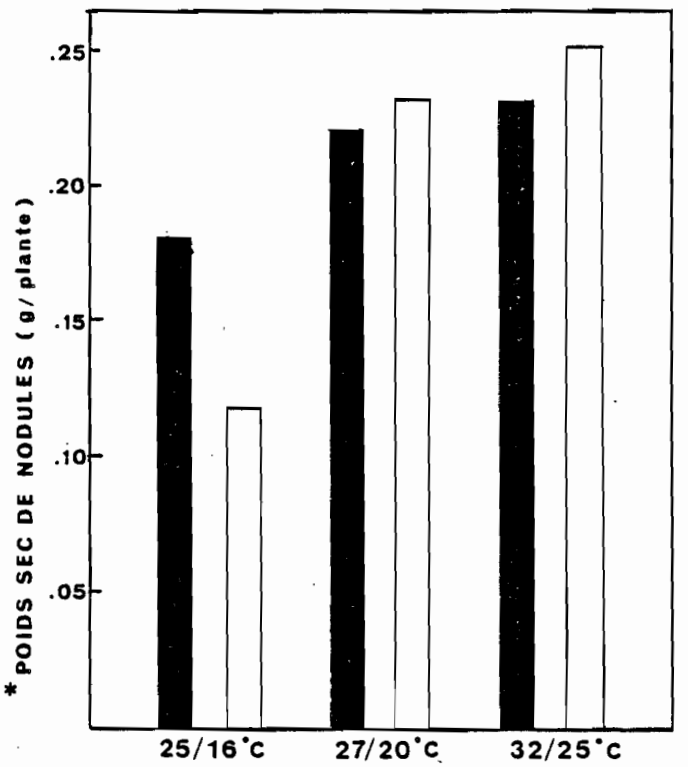


Figure 15: Effet de la température racinaire sur la nodulation du soja cv. Malayan inoculé avec USDA 138 ■ ou ORS 407 □.
(*) 6 semaines après inoculation, moyenne de 5 plantes.

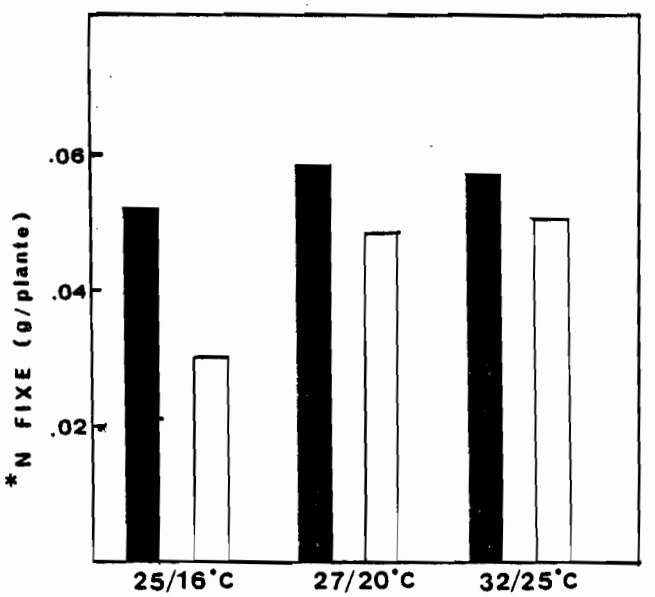


Figure 16: Effet de la température racinaire sur la quantité de N fixé par le soja cv. Malayan inoculé avec USDA 138 ■ ou ORS 407 □.
(*) 6 semaines après inoculation.

augmentation de la température, de 25/16°C à 27/20°C, a plusieurs effets quelques soit la souche inoculée :
- la formation des nodules est plus rapide (figure 11);
- le nombre et le poids des nodules sont plus élevés (figure 11 et 12);
- la quantité de N fixé par la plante est plus élevée.

Par exemple (figure 14), la quantité de N fixé, 35 jours après inoculation de la souche USDA138, est de 28mg à 25/16°C alors qu'à 27/20°C elle est de 41mg. Cependant, quand la souche inoculée est ORS407 la quantité de N fixé à 27/20°C (34 mg) est plus du double de celle obtenue à 25/16°C (13 mg).

Ce dernier résultat suggère que l'influence de la température est différente suivant que le soja cv. Malayan est inoculé avec USDA138 ou ORS 407. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons comparé l'effet de trois températures sur les performances symbiotiques de USDA 138 et ORS 407, le soja cv. Malayan ayant été cultivé dans des conditions identiques à ces différentes températures.

2) Effet de la température sur la nodulation par *R. japonicum* et *R.* cowpea M.

La figure 15 montre que plus la température augmente plus le poids des nodules formés par l'une ou l'autre souche augmente, mais cette augmentation est beaucoup plus importante avec ORS407. En effet, alors qu'à 25/16°C le poids de nodules formés par ORS 407 est inférieur au poids de nodules formés par USDA 138, ce résultat est inversé aux températures supérieures.
En d'autres termes, l'augmentation du poids de nodules est de 25% avec la souche USDA138, quand la température passe de 25/16°C à 32/25°C, alors que cette augmentation est de 100% environ avec ORS407.

Ce résultat est corrélé avec l'augmentation du nombre des nodules qui, avec USDA 138, passe de 60 à 70 par plante et, avec ORS 407, passe de 30 à 65 quand la température augmente de 25/16°C à 32/25°C.

3) Effet de la température sur la fixation de N_2 par *R. japonicum* et *R.* cowpea M.

La figure 16 montre qu'une élevation de la température de 25/16°C à 32/25°C stimule plus la fixation de N_2 des nodules formés par ORS 407

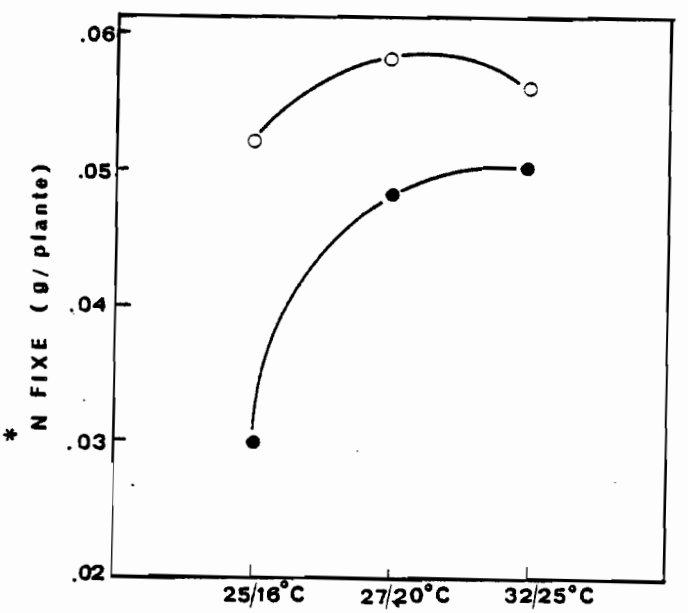


Figure 17: Influence de la température sur la fixation de N_2 par R. japonicum USDA 138 (—○—) ou R. cowpea ORS 407 (—●—) sur le soja cv. Malayan. (*) 6 semaines.

(65% d'augmentation de la quantité de N fixé) que des nodules formés par USDA 138 (10% d'augmentation).

On peut définir une température optimale de fixation pour chacune des deux souches. La figure 17 montre que la température optimale de fixation est plus élevée pour ORS 407 et que d'autre part les basses températures ont un effet beaucoup plus dépressif sur la fixation de N_2 par ORS 407 que par USDA 138.

On remarque cependant que la souche de *R. japonicum* USDA 138 reste plus effective que la souche de *R.* cowpea M ORS 407 quelque soit la température.

III. PERFORMANCES SYMBIOTIQUES DE *R. JAPONICUM* ET DE *R.* COWPEA M SUR LE SOJA cv. MALAYAN ET cv. 44A73 CULTIVES AU CHAMP.

1) Principe

Pour tester l'efficacité au champ, sur sol non stérile, de *R. japonicum* et de *R.* cowpea M sur le soja cv. Malayan et sur le soja cv. 44A73, nous avons utilisé la méthode de culture du soja en buses. Cette méthode est décrite au chapitre II, avec le protocole expérimental utilisé (figure 5).

Les cultures du soja cv. Malayan et du soja cv. 44A73 ont été réalisées durant la saison des pluies, qui est la période normale de culture du soja au Sénégal; le régime de température au niveau du sol est voisin de 32/25°C.

Nous avons utilisé les souches de *R.* cowpea M ORS 406, ORS 407 et NIG, qui apparaissaient comme les plus effectives sur sol stérile (voir le tableau IX) et la souche de *R. japonicum* USDA 138. Un traitement non inoculé sans azote et un traitement non inoculé avec apport d'azote ont complété les traitements inoculés.

2) Résultats sur le soja cv. Malayan.

Les performances symbiotiques des souches étudiées ont été analysées à deux périodes du cycle végétatif du soja cv. Malayan; la première période qui se situe à la floraison (8 semaines après le semis et l'inoculation) correspond, nous l'avons vu, au maximum de la nodula-

Tableau XV: Réponse au champ (sol non stérile) du soja cv. Malayan à l'inoculation par *R. japonicum* USDA 138 et *R.* cowpea M ORS 406, ORS 407 et NIG.

Traitement	Nombre de nodules (/plante) (*)	Poids sec de nodules (g/plante) (*)	ARA totale (µmole C_2H_4. h^{-1}.plante^{-1}) (*)	Poids sec de la partie aérienne (g/plante) (*)	Azote de la partie aérienne (%) (*)	Poids sec des graines (g/plante) (**)	Azote des graines (%) (**)
R. japonicum							
USDA 138	132	1,60	47	22,8	2,51^{b}	32	6,20^{c}
R. cowpea M							
ORS 406	70	1,29	142	20,0	2,37^{b}	29	5,95^{bc}
ORS 407	59	1,08	59	18,6	1,93^{a}	26	5,73^{ab}
NIG	92	1,70	163	27,6	2,33^{b}	32	6,27^{c}
Témoin non inoculé	14	0,37	22	18,5	1,84^{a}	23	5,53^{a}
Témoin non inoculé + 50 kg N/ha	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	24	5,45^{a}

(*) récolte à 8 semaines, moyenne de 10 plantes.

(**) moyenne de 20 plantes.

(les nombres avec la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5%).

N.D. Non déterminé.

tion et de la fixation de N_2. La seconde période se situe à la fin du cycle, qui est de 120 jours pour ce cultivar.

Les résultats obtenus à 8 semaines sont représentés dans le tableau XV et montrent que :
- les plantes non inoculées sont néanmoins nodulées, mais cette nodulation est beaucoup moins importante que sur les plantes inoculées. La nodulation des plantes non inoculées est caractéristique de la présence dans le sol utilisé (sol de Bel Air) d'un faible nombre de *Rhizobium* natifs capables de noduler le soja; en effet les nodules de ces plantes sont relativement gros, peu nombreux et répartis surtout sur les racines secondaires, alors que les nodules des plantes inoculées sont situés pour la plupart au niveau du collet et de la base racinaire, ce qui est normal car les *Rhizobium* introduits à cet endroit par inoculation migrent peu.

En outre, l'identification des nodules par immunofluorescence a confirmé que la nodulation des plantes non inoculées est le fait de *Rhizobium* natifs différents des souches introduites (tableau XVIII).

- Les observations faites pour le nombre des nodules sont aussi valables pour le poids de nodules, à savoir que les plantes non inoculées ont un faible poids de nodules par rapport aux plantes inoculées. Cependant la supériorité de USDA 138 sur les souches de *R.* cowpea est moins nette, la souche NIG notamment donnant un poids de nodules équivalent à celui obtenu avec USDA 138.

- L'absence de relation entre l'ARA et la quantité de N réellement fixé par les plantes inoculées avec les souches de *R.* cowpea M est une nouvelle fois observée ici (cf § I, 3 dans le chapitre). En effet, alors que les plantes inoculées avec les souches de *R.* cowpeaM présentent toutes une ARA totale supérieure aux plantes inoculées avec USDA138, la teneur en N de ces dernières n'est pas significativement différente de celles inoculées avec ORS406 ou NIG et est même supérieure à celles inoculées avec ORS 407.

- Les résultats concernant les rendements, estimés par le poids des graines récoltées à la fin du cycle végétatif du soja cv. Malayan, doivent être interprétés avec prudence car ils sont basés sur un nombre relativement petit de plantes (en fait 20 plantes) et car de nombreux facteurs extérieurs (insectes prédateurs, intempéries, zones

de fertilité différentes) ont pu fausser ces résultats. Néanmoins, ceux-ci sont bien corrélés à la teneur en N des graines et confirment les résultats obtenus à 8 semaines, à savoir que les souches de *R. japonicum* USDA 138 et de *R.* cowpea M NIG sont les plus effectives, la souche ORS 407 est peu effective et l'effectivité de la souche ORS 406 est intermédiaire.

Le faible rendement des plantes supplémentées en azote minéral s'explique par le lessivage de l'engrais occasionné par les fortes pluies. Ce résultat à lui seul est un argument favorable à l'inoculation des légumineuses en zone tropicale, plutôt qu'à l'apport d'engrais azotés.

3) Résultats sur le soja cv. 44A73.

Pour des raisons pratiques, la culture de ce cultivar a été menée jusqu'à 8 semaines après inoculation.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau XVI. On constate que sur les trois souches de *R.* cowpea M inoculées seule la souche ORS 406 est effective, la souche ORS 407 étant peu effective et la souche NIG ne nodulant pas ce cultivar, ce qui confirme le caractère plus spécifique de ce cultivar mis en évidence au chapitre IV.

Nous reviendrons sur les résultats de nodulation dans le chapitre suivant.

IV. DISCUSSION

L'étude des performances symbiotiques de *R. japonicum* et de *R.* cowpea M sur le soja cv. Malayan a mis en évidence plusieurs différences entre ces deux types de souches au point de vue nodulation et fixation de N_2:

(1) La nodulation par *R. japonicum* se fait plus rapidement que par *R.* cowpea M. On peut interpréter ce résultat soit par une colonisation plus rapide des racines dans le cas de *R. japonicum*, soit par une précocité de l'infection au niveau des sites de nodulation. Ce retard dans la nodulation des souches de *R.* cowpea M pourrait s'expliquer par la nécessité d'un temps d'adaptation de ces souches pour la reconnaissance ou la pénétration dans le poil absorbant. Nous reviendrons sur cette hypothèse plus loin. De telles différences dans la vitesse de nodulation

Tableau XVI: Réponse au champ (sol non stérile) du soja cv.44A73 à l'inoculation par *R. japonicum* USDA138 et *R.*cowpea M ORS406, ORS407 et NIG.

Traitement	Nombre de nodules (/plante) (*)	Poids sec de nodules (g/plante) (*)	Azote de la partie aérienne (%) (*)
R. japonicum			
USDA 138	124 ± 36	0,71 ± 0,16	3,0
R. cowpea M			
ORS 406	50 ± 14	0,64 ± 0,21	2,9
ORS 407	41 ± 20	0,38 ± 0,04	2,2
NIG	0	0	2,0
Témoin non inoculé	70 ± 38	0,39 ± 0,09	2,2

(*) récolte à 8 semaines, moyenne de 5 plantes.

ont été décrites sur d'autres légumineuses, comme *Glycine wightii* (DIATLOFF et al 1970) et *Trifolium subterraneum* (LABANDERA et VINCENT 1975). Ces auteurs ont montré que le temps de formation du premier nodule varie avec la souche de *Rhizobium* et le cultivar utilisé.
(2) Il n'est apparu aucune corrélation entre l'ARA et la quantité de N réellement fixé par la plante inoculée; l'ARA totale des nodules formés par les souches de *R.* cowpea M. est supérieure à celle des nodules formés par la souche USDA 138, alors que le rapport $\frac{\text{N fixé}}{\text{poids de nodules}}$ (qui traduit l'effectivité réelle d'une souche) est toujours favorable à la souche USDA 138.

Sur *Arachis hypogaea*, certains auteurs (WYNN et al 1980) ont trouvé une corrélation entre l'ARA et la fixation réelle de N_2, d'autres (AYALA 1977) n'en ont pas trouvée.

Ces résultats contradictoires en apparence peuvent s'expliquer par la variation des valeurs expérimentales du rapport théorique de conversion C_2H_2/N_2 (MAGUE et BURRIS 1972). Cette variation entre la réduction de l'acétylène et la réduction de N_2 peut s'expliquer par le fait qu'en présence de C_2H_2, il n'y a pas de production d'hydrogène, tandisqu'au cours de la réduction de N_2, il peut y avoir production d'hydrogène ce qui réduit d'autant la fixation réelle de N_2 (HUDD et al 1980).

Récemment GIBSON et al (1981) ont montré que la plante-hôte influe à la fois sur la production d'hydrogène, formé par la nitrogénase des bactéroïdes, et sur le recyclage d'hydrogène par l'intermédiaire de l'hydrogénase.

On peut supposer, dans notre cas, que les bactéroïdes de la souche USDA 138 sur le soja possèdent une hydrogénase qui, par recyclage de l'hydrogène produit par la nitrogénase, permet un meilleur rendement de la fixation de N_2, alors que les souches de *R.* cowpeaM ne synthétisent pas d'hydrogénase dans les nodules de soja ou que celle-ci ne s'exprime pas. Autrement dit, la souche USDA 138 est plus efficiente que les souches de *R.* cowpea M.
(3) les performances symbiotiques de *R.* cowpea M sur le soja cv. Malayan sont plus sensibles aux basses températures que celles de *R. japonicum* et présentent un maximum à température plus élevée.

D'après PATE (1977), l'effet dela température dépend à la fois du régime de température jour/nuit, de la plante-hôte et de la souche de *Rhizobium*. D'après HARDY (1968), les températures optimales de fixation de N_2 par *R. japonicum* sur le soja varient entre 20 et 30°C (températures racinaires constantes) et d'après DART (1975) la formation et le développement des nodules comme la fixation de N_2 est plus rapide à 27°C, ce qui est en accord avec nos résultats concernant la souche de *R. japonicum* USDA 138.

DART et al (1965) ont montré que de basses températures nocturnes diminuent la fixation de N_2 par *R.* cowpea en symbiose avec *Vigna unguiculata*. De même, ROUGHLEY et al (1980) ont trouvé qu'une température racinaire élevée (supérieure à 33°C) favorise la compétitivité des souches de *R.* cowpea par rapport à une souche de *R. japonicum* pour la nodulation du soja cv. Malayan.

Nos résultats sont en plein accord avec ces observations; le fait que les souches de *R.* cowpea soient plus efficaces à des températures relativement élevées (supérieures à 30°C) peut s'expliquer par une adaptation de ces souches aux hautes températures, qui excèdent souvent 50°C dans les sols africains.

La réponse au champ du soja cv. Malayan à l'inoculation par *R. japonicum* USDA 138 et par quelques souches de *R.* cowpeaM. montre qu'il est possible de trouver des associations Malayan - *R.* cowpeaM aussi efficaces que l'association Malayan - *R. japonicum* USDA 138. Par contre, dans le cas des cultivars américains (44A73 par exemple) l'inoculation avec *R. japonicum* semble indispensable pour obtenir une bonne fixation de N_2.

CHAPITRE VI

COMPETITION ENTRE *R. JAPONICUM* ET *R.* COWPEA M POUR LA NODULATION DU SOJA

Après avoir comparé l'effectivité des souches de *R.* cowpea M et de *R. japonicum*, nous nous proposons de comparer leur compétitivité pour la nodulation du soja. Nous avons vu, d'après les résultats obtenus au champ sur sol non stérile, que l'inoculation du soja cv. Malayan ou cv. 44A73 augmente les rendements de cette culture (tableau XV, chap. V). Or, le principal facteur limitant le succès de l'inoculation d'une légumineuse concerne l'aptitude de la souche inoculée à entrer en compétition avec les souches préexistantes dans le sol, capables de noduler cette légumineuse (MEISNER et GROSS 1980).

La compétitivité d'une souche de *Rhizobium* dépend du génotype de la plante-hôte (CALDWELL et VEST 1968) et certains auteurs ont émis l'hypothèse que la compétitivité résulte de la combinaison de deux caractères distincts:
(1) la compétence saprophytique, qui traduit l'aptitude de la souche à survivre et à se multiplier dans un sol donné (CHATEL et al 1968);
(2) la compétitivité pour l'infection, qui traduit l'aptitude de la souche à former des nodules en présence de souches ayant la même spécificité (MEANS et al 1961).
Il résulte de nombreux travaux (LAGACHERIE et al 1977, REYES et SCHMIDT 1979) que le second caractère est le plus important.

Notre étude dans ce chapitre a donc porté exclusivement sur la compétitivité pour l'infection. Ce type d'étude nécessite l'utilisation de méthodes d'identification ou de marquage des souches de *Rhizobium* permettant leur identification dans les nodules. Parmi toutes les méthodes possibles, présentées dans le tableau XVII, nous avons choisi la méthode des anticorps fluorescents (SCHMIDT 1968) qui permet en particulier :
(a) l'identification directe d'une souche à l'intérieur des nodules sans avoir besoin de la réisoler;
(b) la détection spécifique de souches dans un environnement non stérile comme le sol ou la rhizosphère.

Nous avons étudié la compétition entre *R. japonicum* et *R.* cowpea M sur les deux cultivars Malayan et 44A73. Pour chacun des cultivars, nous avons analysé d'une part la compétitivité des souches introduites par inoculation vis-à-vis des souches préexistantes dans le sol et d'autre part la compétition entre souches introduites simultanément.

I. MISE EN EVIDENCE DE LA COMPETITIVITE DE *R. JAPONICUM* VIS-A-VIS DE *R.* COWPEA M POUR LA NODULATION DU SOJA.

Tableau XVII: Méthodes d'identification ou de marquage des *Rhizobium* utilisées dans des études de compétition.

Méthode	Référence de la méthode
Utilisation de souches marquées:	
- mutant spontané résistant aux antibiotiques	OBATON (1971)
- mutant auxotrophe	SCHWINGHAMER (1971)
- bactériophage spécifique	"
- productrice de bactériocine ou sensible	"
Utilisation de caractères symbiotiques particuliers:	
- souche inductrice de chlorose	MEANS et al (1961)
- souche ineffective	GIBSON (1964)
- couleur des nodules	CLOONAN (1963)
Utilisation de méthodes sérologiques:	
- immunodiffusion	DUDMAN (1964)
- agglutination	OUCHTERLONY (1958)
- anticorps fluorescent	SCHMIDT et al (1968)
- ELISA : enzyme conjuguée à un immuno adsorbant	ENGVALL et PERLMANN (1971)
- fluorescent ELISA: enzyme conjuguée à un immunoadsorbant fluorescent	MORLEY et JONES (1980)

1) Compétition entre souches introduites et souches préexistantes dans le sol

Nous avons cherché à savoir si les 4 souches introduites dans les essais d'inoculations au champ du soja cv. Malayan et du soja cv. 44A73 (chapitre V, § III) étaient bien à l'origine des nodules formés sur les plantes inoculées.

Les nodules récoltés à 8 semaines ont donc été identifiés par immunofluorescence. Ces résultats sont représentés dans le tableau XVIII pour les deux cultivars de soja.

a. Soja cv. Malayan.

Toutes les souches introduites par inoculation ont formé 100% des nodules sur les plantes inoculées et aucun nodule sur les plantes non inoculées; les souches introduites sont donc plus compétitives que les souches préexistantes dans le sol de Bel Air. Cet avantage compétitif des souches introduites est amplifié par un placement stratégique au niveau des racines d'un grand nombre de *Rhizobium* lors de l'inoculation, les souches préexistantes capables de noduler le soja étant à priori moins nombreuses et dispersées (PARKER et al 1977).

b. Soja cv. 44A73.

Seule la souche de *R. japonicum* USDA 138 a formé 100% des nodules, les souches de *R.* cowpea M ORS 406 et ORS 407 n'ont formé respectivement que 70% et 43% des nodules sur les plantes inoculées. Ce résultat illustre la plus grande spécificité de ce cultivar vis-à-vis des souches de *R.* cowpea M.

La souche de *R.* cowpeaM Nig représente un cas extrême de compétition puisque non seulement elle n'induit pas la formation de nodules sur ce cultivar mais apparemment sa présence dans la rhizosphère inhibe la nodulation par les souches préexistantes dans le sol de Bel Air. En effet les plantes inoculées avec la souche NIG ne portent aucun nodule, alors que les plantes non inoculées ont 70 nodules en moyenne. Nous reviendrons sur ce résultat plus loin.

Tableau XVIII: Compétition entre souches introduites et souches préexistantes dans le sol de Bel air pour la nodulation du soja cv. Malayan et cv.44A73, cultivés au champ (sol non stérile).

Traitement	Nombre de nodules par plante	Pourcentage de nodules par plante formés par (*) USDA138	ORS406	ORS407	NIG	Souches pré-existantes
Soja cv. Malayan						
USDA 138	132	100	0	0	0	0
ORS406	70	0	100	0	0	0
ORS407	59	0	0	100	0	0
NIG	92	0	0	0	100	0
Témoin non inoculé	14	0	0	0	0	100
Soja cv.44A73						
USDA138	124	100	0	0	0	0
ORS406	50	0	70	0	0	30
ORS407	41	0	0	43	0	57
NIG	0					
Témoin non inoculé	70	0	0	0	0	100

(*) identification des nodules par immunofluorescence.

2) Compétition entre souches introduites simultanément pour la nodulation du soja cv. Malayan.

a. Principe

Nous avons utilisé la méthode habituelle d'inoculation mixte qui consiste à inoculer simultanément la plante avec un mélange de deux ou plusieurs souches de *Rhizobium*, l'inoculation comportant un même nombre de bactéries de chaque souche.

Cette étude a été réalisée au champ sur le soja cv. Malayan (sol non stérile) dans les mêmes conditions que les essais d'inoculation des souches seules, décrits au chapitre V, ce protocole expérimental est décrit au chapitre II.

La compétition entre la souche de *R. japonicum* USDA 138 et les souches de *R.* cowpea M ORS 406, ORS 407 et NIG a été ainsi étudiée sur deux types de sol, Bel Air et Coular, dont les caractéristiques physico-chimiques sont assez proches excepté une teneur en N plus élevée pour le sol de Coular (cf annexe II), la pauvreté de ces sols en phosphore a été compensée par un apport d'engrais phosphatés. En fait, ces deux sols diffèrent surtout par leur situation géographique, la région de Coular ayant été notamment choisie pour ces conditions climatiques (pluviométrie annuelle de 800mm environ) qui sont favorables à la culture du soja.

b. Résultats

Dans les traitements d'inoculation mixte comportant deux ou plusieurs souches, le pourcentage des nodules formés par chacune des souches en présence mesure leur degré de compétitivité. Ces pourcentages basés sur l'identification de plus de 700 nodules au total, sont consignés dans le tableau XIX. Il est à noter que les plantes inoculées avec un mélange de USDA 138 x souche de *R.* cowpea M portaient autant de nodules que lorsqu'elles étaient inoculées avec la souche USDA 138 seule (cf tableau XV, chapitre V) quelle que soit la souche de *R.* cowpea M

On constate que la souche de *R. japonicum* USDA 138 est plus compétitive que les souches de *R.* cowpea M, car elle forme de 94,5 à 100% des nodules suivant le traitement mixte. Un résultat semblable

Tableau XIX: Compétition entre souches introduites simultanément pour la nodulation du soja cv. Malayan, cultivé au champ sur deux types de sol non stérile (Bel air et Coular).

Inoculum mixte	(*) Pourcentage de nodules par plante formés par				
	USDA 138	ORS 406	ORS 407	NIG	USDA 138 et NIG(*)
Sol de Bel Air					
USDA 138 x ORS 406	100	0	0	0	0
USDA 138 x ORS 407	98,5	0	1,5	0	0
USDA 138 x NIG	95,5	0	0	4,5	0
USDA 138 x ORS 406 x ORS 407 x NIG	94,5	0,6	1,1	2,7	1,1
Sol de Coular					
USDA 138 x ORS 407	98,9	0	1,1	0	0
USDA 138 x ORS 406 x ORS 407 x NIG	73,2	6,7	2,8	16,4	0,9

(*) identification des souches par immunofluorescence.

(**) nodules mixtes.

est obtenu avec le sol de Coular, où cependant les souches de *R.* cowpea ORS 406 et NIG semblent plus infectives qu'avec le sol de Bel Air si l'on compare les résultats du traitement USDA 138 x ORS 406 x ORS 407 x NIG, obtenus avec ces deux sols (les inoculations mixtes USDA 138 x ORS 406 et USDA 138 x NIG n'ont pas été réalisées sur le sol de Coular pour des raison d'ordre matériel).

Il est intéressant de noter la présence d'un faible pourcentage de nodules mixtes contenant à la fois des bactéroïdes de la souche USDA 138 et de la souche NIG. Dans ces nodules mixtes, les bactéroïdes de la souche USDA 138 qui est la plus compétitive sont toujours plus nombreux que ceux de la souche NIG. LINDEMANN et al (1974) ont déjà décrit l'existence de nodules mixtes sur le soja, inoculé simultanément avec deux souches de *R. japonicum* (USDA 117 et USDA 138).

3) Inhibition de la nodulation des souches de *R.* cowpea M sur le soja cv. 44A73.

Nous avons utilisé l'aptitude de la souche de *R.* cowpea NIG à inhiber la nodulation d'autres souches de *R.* cowpea M pour illustrer le caractère peu compétitif de ces souches vis-à-vis des souches de *R. japonicum* pour la nodulation du soja cv. 44A73.

Pour cela, nous avons inoculé des plantules de soja cv. 44A73, cultivées en vase de végétation, avec des inoculums mixtes contenant la souche NIG et soit une souche de *R.* cowpea M (ORS 406 ou ORS 407) soit une souche de *R. japonicum* (USDA 138 ou USDA 135 ou USDA 123).

Les résultats obtenus, représentés par les figures 18 et 19 sous forme d'histogrammes, montrent que l'effet inhibiteur de la souche NIG sur la nodulation du soja cv. 44A73 ne s'exerce qu'avec les souches de *R.* cowpea M et avec aucune des souches de *R. japonicum*.

Cet effet inhibiteur s'apparente même à un blocage de la nodulation puisque l'inhibition est voisine de 90% pour les deux souches de *R.* cowpea M testées.

En outre, la figure 20 montre que l'effet inhibiteur de la souche NIG sur la nodulation se répercute aussi sur la fixation de N_2, la teneur en N des plantes inoculées avec ORS 406 et ORS 407 en présence de la souche NIG étant voisine de celle des plantes témoins inoculées avec la souche NIG.

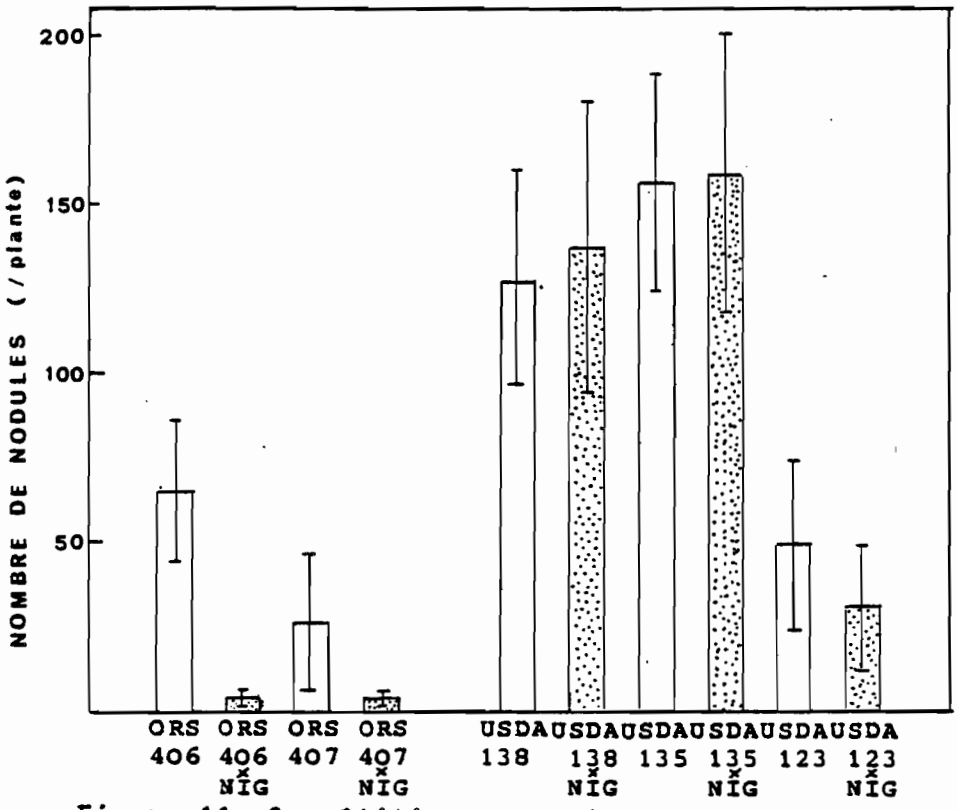


Figure 18: Compétition sur soja cv. 44A73 entre la souche NIG non nodulante et une souche de *R. cowpea* M ou une souche de *R. japonicum*, influence sur le nombre de nodules de la plante.

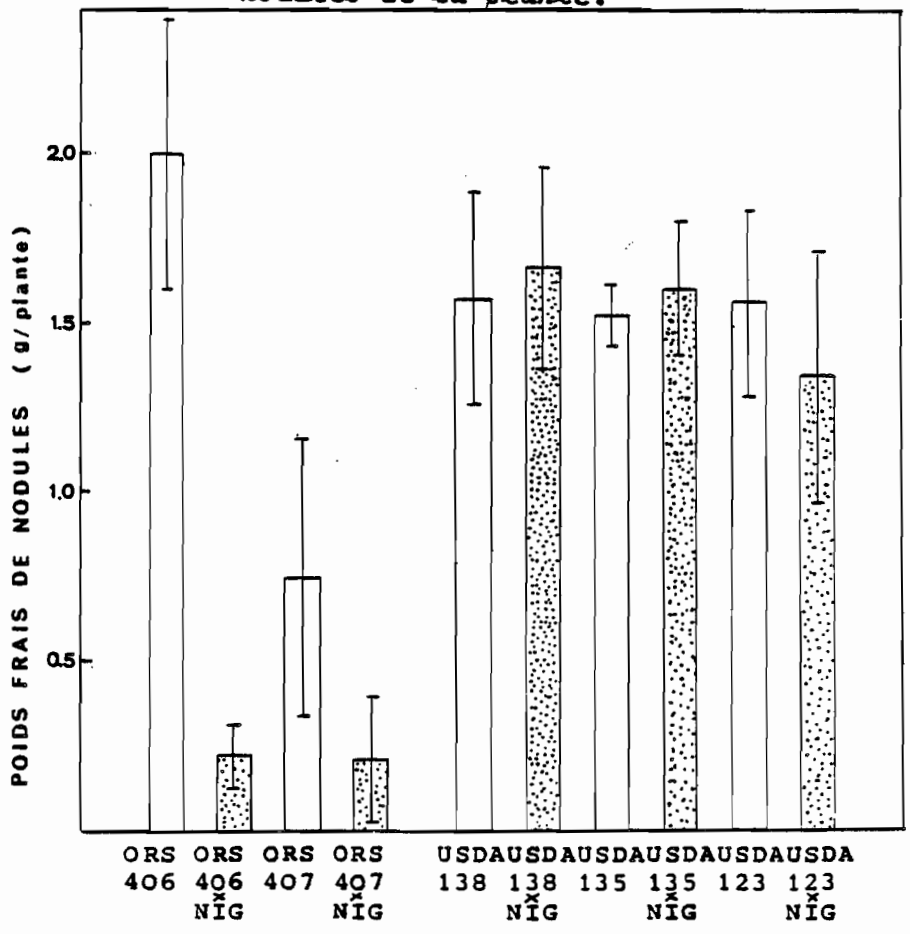


Figure 19: Compétition sur soja cv. 44A73 entre la souche NIG non nodulante et une souche de *R. cowpea* M ou une souche de *R. japonicum*, influence sur le poids de nodules de la plante.

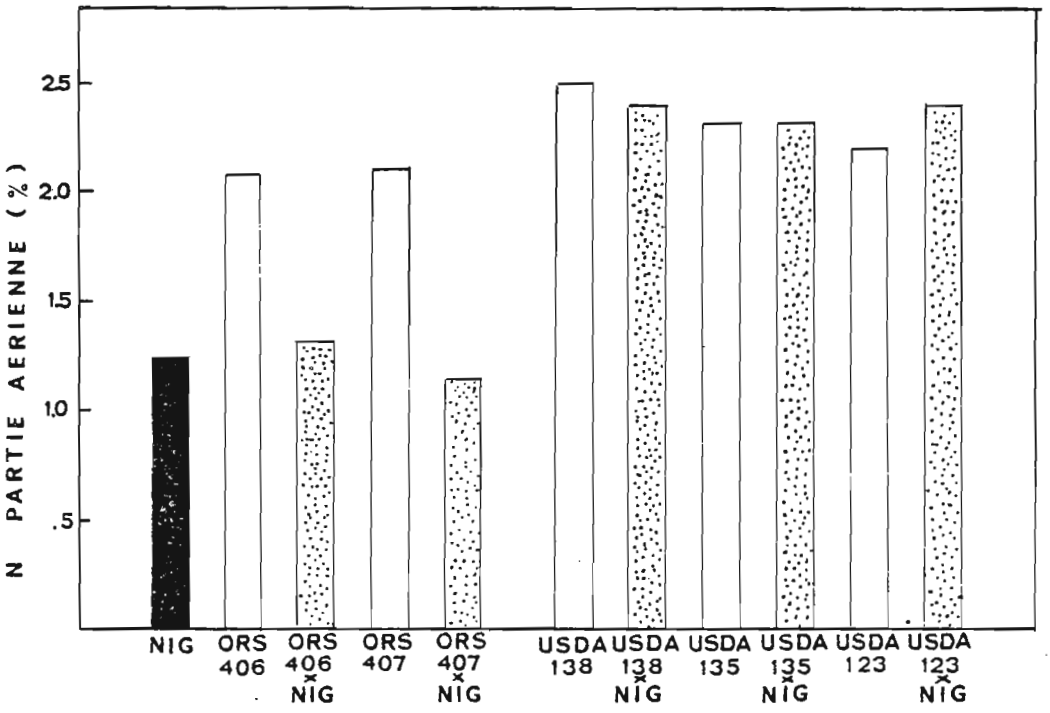


Figure 20: Compétition sur soja cv. 44A73 entre la souche NIG non nodulante sur une souche de R. cowpea M ou une souche de R. japonicum, influence sur la teneur en N de la plante.

Photo B : Compétition entre la souche NIG et une souche de R.cowpea M pour la nodulation du soja cv.44A73.

A : inoculé avec NIG ; B : inoculé avec ORS 406 ;

A + B : inoculé simultanément avec NIG et ORS 406.

Photo C : Compétition entre la souche NIG et une souche de R.japonicum pour la nodulation du soja cv.44A73.

A : inoculé avec NIG ; J : inoculé avec USDA 138 ;
A + J: inoculé simultanément avec NIG et USDA 138.

La photo B illustre l'effet inhibiteur de la souche NIG sur la nodulation du cultivar 44A73 par les souches de R.cowpea M, effet qui se répercute sur la fixation de N_2.
La photo C montre que la souche NIG est sans effet sur la nodulation de ce même cultivar par les souches de R.japonicum.

Les photos B et C illustrent l'effet de la souche NIG sur la fixation de N_2 par ORS 406 et USDA 138.
Il est à noter que les nodules formés sur les plantes inoculées avec la souche NIG et une autre souche ne contiennent aucun bactéroïde de la souche NIG.

II. DISCUSSION

Cette étude de compétition, bien qu'ayant porté sur un petit nombre de souches nous a permis de mettre en évidence les points suivants :
(1) les souches de *R. japonicum* sont plus compétitives que les souches *R.* cowpea (sous entendu: *R.* cowpea M et *R.* cowpea préexistant dans le sol) pour la nodulation du soja. Ce résultat a été obtenu aussi bien sur le cultivar Malayan, peu spécifique, que sur le cultivar 44A73, plus spécifique;
(2) cette compétitivité des souches de *R. japonicum* dans le cas du soja semble lié au fait que ces souches forment un groupe plus spécialisé dans la nodulation du soja que les souches de *R.* cowpea.

Nos résultats, obtenus dans le cas du cultivar Malayan, sont en accord avec ceux de ROUGHLEY et al (1980) qui, parallèlement à nos travaux, ont mis en évidence l'avantage compétitif de la souche de *R. japonicum* CB 1809 vis-à-vis de plusieurs souches de *R.* cowpea pour la nodulation de ce même cultivar;
(3) la compétitivité de la souche NIG non-nodulante vis-à-vis des souches de *R.* cowpea M effectives sur le cultivar 44A73 pourraient confirmer l'hypothèse suivant laquelle le caractère de compétitivité d'une souche de *Rhizobium* est indépendant de son aptitude à fixer l'azote (HAM 1980), mais aussi de son aptitude à former des nodules (LIE et al 1978).

WINARNO et LIE (1979) ont reporté un cas semblable de compétition entre une souche non-nodulante et une souche nodulant certains cultivars de pois. En accord avec ces auteurs, on peut penser que ce type de compétition pose un problème pour le succès de l'inoculation, car on ne peut être prévenu de l'existence dans le sol de telle souche non-nodulante mais néanmoins compétitive, puisqu'un *Rhizobium* n'est détectable que par son aptitude à former des nodules.
(4) sur le plan pratique, ce dernier résultat montre qu'il est important d'inoculer, dès la première année de culture du soja, des souches très

compétitives afin de supplanter les souches natives de *R.* cowpea, susceptibles de réduire l'efficacité de la symbiose soja - *R. japonicum*.

La sélection de souches compétitives est en outre recommandée par les chercheurs de l'IITA (rapport IITA 1981), qui ont montré que les souches natives de *R.* cowpea forment beaucoup plus de nodules sur le soja dans les années qui suivent l'inoculation, bien que les souches de *R. japonicum* introduites aient formé la majorité des nodules la première année de culture.

CHAPITRE VII

RECHERCHE DE L'ORIGINE DE LA COMPETITIVITE DE *R. JAPONICUM* VIS-A-VIS DE *R.* COWPEA M POUR LA NODULATION DU SOJA CV. MALAYAN

Le fait que les souches de *R. japonicum* soient plus compétitives sur le soja que les souches de *R.* cowpea M, dans des conditions de sol et de température qui leur sont à priori moins favorables qu'à ces dernières, prouve que leur supériorité est liée plus à leur compétitivité pour les sites de nodulation qu'à leur compétence saprophytique.

Nous avons mis en évidence (chapitre V § I) l'existence d'un temps de retard dans la nodulation du soja cv. Malayan par les souches de *R.* cowpea M vis-à-vis des souches de *R. japonicum*. C'est pourquoi nous avons évalué dans un premier temps l'importance de ce facteur, vitesse de nodulation, dans la compétition.

Dans un second temps, nous avons tenté d'expliquer la compétitivité des souches de *R. japonicum* en faisant intervenir le processus de reconnaissance du *Rhizobium* par la plante-hôte.

I. ROLE DE LA VITESSE DE NODULATION DANS LA COMPETITION

1) Principe

Nous avons cultivé des plantules de soja cv. Malayan en vase de végétation, suivant un régime de température racinaire de 32/25°C. Une semaine après le semis, les souches de *R.* cowpea M ORS 407 et de *R. japonicum* USDA 138 ont été inoculées soit simultanément, soit successivement, suivant les traitements d'inoculations mixtes : ainsi l'inoculation de la souche USDA 138 a été retardée de 0, 3, 5, 7 et 9 jours par rapport à l'inoculation de la souche ORS 407, qui a toujours eu lieu une semaine après le semis (date t_o).
Les traitements témoins sont les suivants : ORS 407 inoculée seule à la date t_o et USDA 138 inoculée seule aux dates t_o , t_3, t_5, t_7 et t_9.
Les nodules ont été récoltés 6 semaines après le semis et identifiés par immunofluorescence; plus de 750 nodules sur 2000 nodules récoltés ont été ainsi identifiés.

2) Résultat

Les nombres de nodules obtenus pour chaque traitement d'inoculation sont représentés dans la figure 21 sous la forme d'histogrammes. On constate que l'inoculation retardée de la souche USDA 138, par rapport à la date du semis, n'affecte pas son infectivité vis-à-vis du soja cv. Malayan, car le nombre de nodules est de 64 quand la souche

Tableau XX: Inoculation retardée de USDA138, identification par immunofluorescence des nodules formés sur le soja cv Malayan, cultivé sur sol stérile.

Traitements	Nombre de nodules par plante	Pourcentage de nodules par plante (*) formés par USDA 138	ORS 407	USDA 138 et ORS 407
ORS407 (to) x USDA138 (to)	64	98,6	0,8	0,6
ORS407 (to) x USDA138 (t_3)	125	88,3	11,7	0
ORS407 (to) x USDA138 (t_5)	100	59,9	39,0	1,1
ORS407 (to) x USDA138 (t_7)	96	78,8	20,4	0,8
ORS407 (to) x USDA138 (t_9)	72	23,3	75,1	1,6

(to), inoculation 7 jours après semis.

(t_3), (t_5), (t_7), (t_9), inoculation retardée de 3, 5, 7, 9 jours par rapport à (to).

(*) moyenne de 5 plantes.

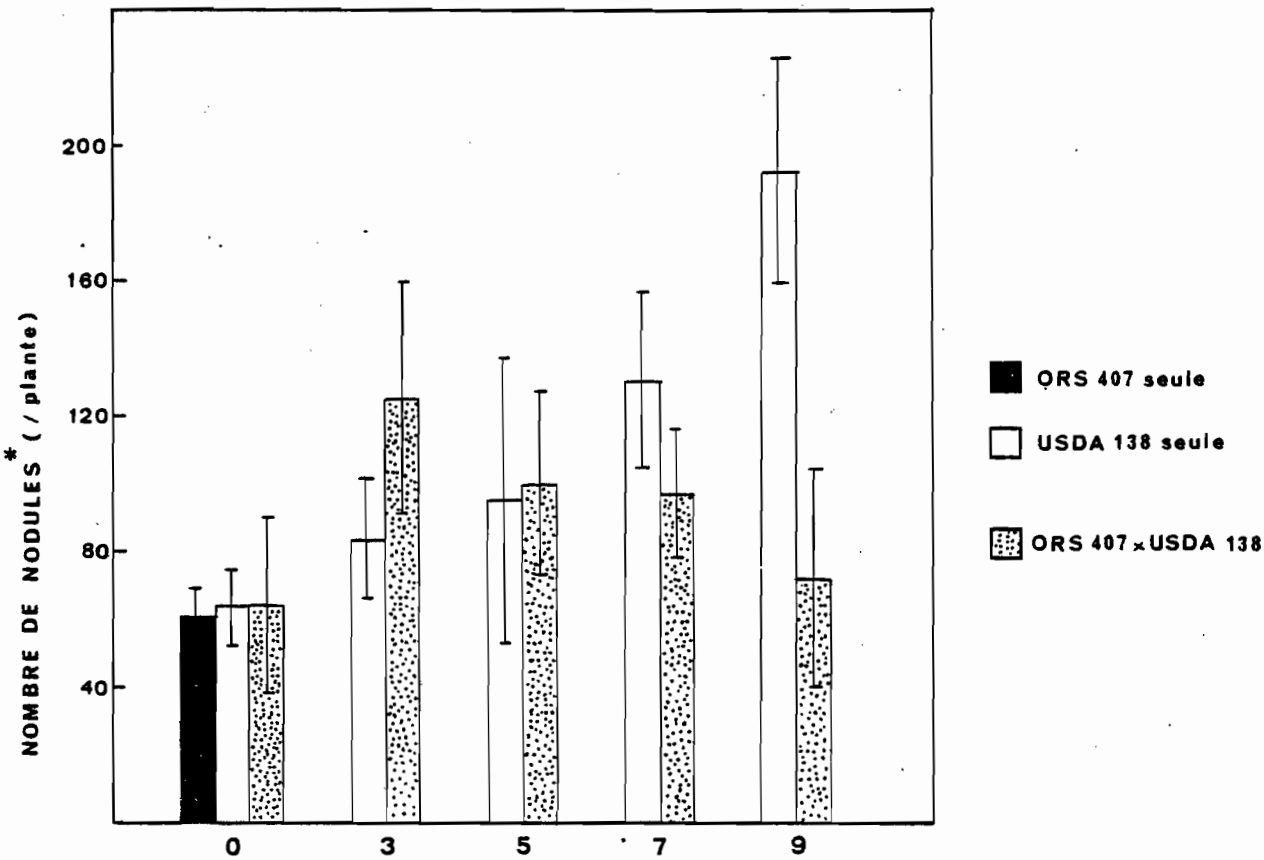


Figure 21: *Effet de l'inoculation retardée de USDA 138, seule ou en compétition avec ORS 407, sur la nodulation du soja cv. Malayan.*
(*) Moyenne de 5 plantes.

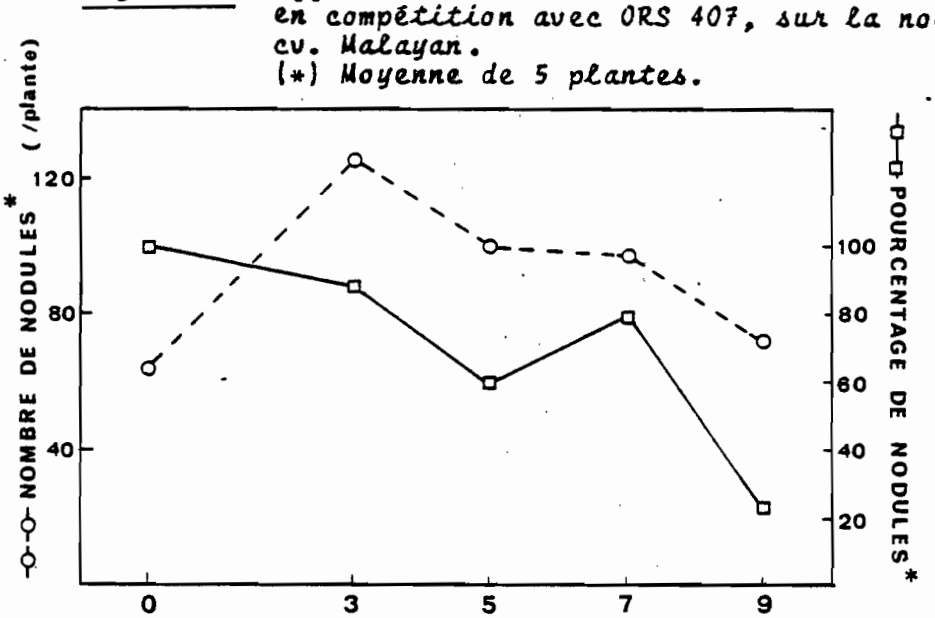


Figure 22: *Inoculation retardée de USDA 138: Corrélation entre le nombre de nodules (-o——o-) du traitement (USDA 138 x ORS 407) et le pourcentage de nodules (-□——□-) formés par USDA 138 sur le soja cv. Malayan.*
(*) Moyenne de 5 plantes.

USDA 138 est inoculée seule 7 jours après le semis (t_o) et passe à 190 nodules quand elle est inoculée seule 16 jours après le semis: l'inoculation retardée du *Rhizobium* stimule donc la nodulation. Une telle observation a déjà été décrite sur *Trifolium subterraneum* (NUTMAN 1967), *Pisum sativum* (DART et PATE 1959) et *Glycine max* (SKRDLETA 1971); d'après DART (1977) cette stimulation serait dûe à une meilleure infection initiale quand les *Rhizobium* sont inoculés plus tardivement.

Les nombres de nodules, obtenus avec les différentes inoculations mixtes ORS 407 x USDA 138, ne diffèrent pas significativement du nombre de nodules, obtenus avec l'inoculation de USDA 138 seule, même quand l'inoculation de USDA 138 est retardée de 7 jours par rapport à l'inoculation de ORS 407. Cependant au 9ème jour de retard, on observe une différence significative entre les nombres de nodules correspondant à ces deux traitements (figure 22).

En se rapportant au tableau XX et à la figure 22, on constate que la baisse du nombre de nodules, obtenus avec le traitement ORS 407 (t_o) x USDA 138 (t_9), est corrélée avec le pourcentage de nodules formés par USDA 138. En effet, la souche USDA 138, même quand son inoculation est retardée de 7 jours, forme la majorité des nodules dans le traitement mixte mais, au 9ème jour de retard, ce résultat est inversé en faveur de la souche ORS 407.

Ce résultat suggère que l'avantage compétitif de USDA 138 vis-à-vis de ORS 407 est lié, soit à une meilleure colonisation des racines, soit à une occupation plus rapide des sites d'infection au niveau des poils absorbants, les sites étant alors bloquées pour les *Rhizobium* de la souche ORS 407.

II. ROLE DE LA RECONNAISSANCE DU *RHIZOBIUM* DANS LA COMPETITION

On peut supposer que l'avantage compétitif de *R. japonicum* vis-à-vis de *R.* cowpea M pour la nodulation du soja est lié au processus de reconnaissance du *Rhizobium* par la plante-hôte, qui se ferait plus rapidement dans l'association soja - *R. japonicum* que dans l'association soja - *R.* cowpea M.

Des travaux récents (STACEY et al 1980) montrent que l'intervention des lectines, comme médiateur de la reconnaissance entre les

deux partenaires symbiotiques est très probable en ce qui concerne l'association soja - *R. japonicum*.
Nous avons vu que"l'hypothèse lectine" implique qu'il y ait une corrélation entre la liaison de la lectine de soja aux souches de *Rhizobium* et l'aptitude de ces souches à infecter le soja.

Le comportement des souches de *R.* cowpea M vis-à-vis de la lectine de soja est donc très intéressant dans ce contexte; en effet, le problème est de savoir si ces souches sont capables de se lier à la lectine de soja comme les souches de *R. japonicum*.

Pour cela, nous avons purifié la lectine du soja cv. Malayan et nous avons comparé la liaison de cette lectine *in vitro* à plusieurs souches de *R. japonicum* et de *R.* cowpea M, en utilisant cette lectine marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine.

1) Préparation de la lectine de soja cv. Malayan.

Nous avons utilisé la méthode de ALLEN et NEUBERGER (1974), basée sur une chromatographie d'affinité, qui est décrite au chapitre II, § V avec les différentes étapes de la purification.

A partir de 25 g de graines dégraissées du cultivar Malayan, nous avons obtenu plus de 60 mg de lectine purifiée, dont le titre hémagglutinant est de 4096 (à titre de comparaison, l'extrait brut des graines à un titre de 512). Ces résultats d'hémagglutination sont conformes à ceux décrits dans la littérature (TSIEN et SCHMIDT 1980).

Nous avons alors marqué la lectine purifiée à l'isothiocyanate de fluorescéine (chapitre II).

2) Liaison de quelques souches de *R. japonicum* et de *R.* cowpea à la lectine de soja cv. Malayan.

a. Liaison des souches de *R. japonicum*

Nous avons, dans un premier temps, vérifié la propriété de liaison de notre lectine de soja cv. Malayan vis-à-vis de cinq souches de *R. japonicum*, dont la liaison à la lectine de soja est connue. Nos résultats sont représentés dans le tableau XXI et sont en accord avec ceux obtenus par BAUER (1977) et BOHLOOL et SCHMIDT (1974), qui

Tableau XXI: Liaison à la lectine de soja fluorescente de cinq souches de *R. japonicum* d'après :
(I) nos propres résultats;
(II) d'après les résultats de BAUER (1977);
(III) d'après les résultats de BOHLOOL et SCHMIDT (1974).

Souches de *R. japonicum*	(*) Liaison à la lectine de soja fluorescente d'après : (I)	(II)	(III)
USDA 31	-	-	±
USDA110	+	+	+
USDA123	±	±	+
USDA135	+	+	±
USDA138	+	+	+

(*) +, 30% au moins de cellules fluorescentes;
, proportion de cellules fluorescentes variable (0% à plus de 30%);
-, aucune cellule fluorescente.

Tableau XXII: Liaison à la lectine de soja fluorescente de six souches de *R.* cowpeaM et deux souches de *R.* cowpea de collection.

Souches	Nodulation du soja	Liaison à la lectine de soja
R. cowpea M		
ORS 401	+	-
ORS 403	+	-
ORS 405	+	-
ORS 406	+	-
ORS 407	+	-
NIG	+	-
R. cowpea		
CB756	-	-
61B9	-	-

ont utilisé des lectines préparées à partir d'autres cultivars de soja. La réaction typique de liaison positive, obtenue avec la plupart des souches de *R. japonicum* (ici la souche USDA 138), est illustrée par les photos 6 et 7 de la planche II.

Nous avons fait les observations suivantes :
(1) la lectine peut être liée soit uniformément au pourtour des cellules, la fluorescence est alors diffuse autour de la cellule, soit asymétriquement à un pôle de la cellule, ce qui se traduit par un spot fluorescent (cas le plus fréquent) ; en outre, toutes les cellules d'une même culture ne se lient pas à la lectine, ces cellules ne présentent alors aucune fluorescence. Tous ces cas de liaison sont bien visibles sur la photo 6.
(2) la proportion de cellules fluorescentes (traduisant une liaison positive) varie suivant l'âge de la culture. Pour la souche USDA 138 par exemple, le pourcentage de cellules fluorescentes est nul quand la culture est âgée de 5 jours (dans nos conditions de culture). En outre, nous avons pu vérifier que ce pourcentage n'est jamais de 100%, quelque soit l'âge de la culture.

Toutes ces observations sont en plein accord avec celles de MORT et BAUER (1980) et de TSIEN et SCHMIDT (1981). Ces auteurs ont montré que les récepteurs pour la lectine étaient de nature polysaccharidique et localisés sur la capsule. Seules les cellules encapsulées sont donc capables de se lier à la lectine, ce qui explique les différents types de liaison observés et l'influence de l'âge de la culture sur le pourcentage de cellules positives.

b. Liaison des souches de *R.* cowpea.

Les résultats de liaison à la lectine de soja cv. Malayan, que nous avons obtenus avec six souches de *R.* cowpea M et deux souches de *R.* cowpea de collection, sont représentés dans le tableau XXII.

On constate qu'aucune des souches testées n'est capable de se lier *in vitro* à la lectine de soja, quelque soit l'âge de la culture. Or les souches de *R.* cowpea M, nous l'avons vu, sont capables de noduler le soja et en particulier le cultivar Malayan. Il n'y a donc pas de corrélation entre la liaison de ces souches à la lectine de soja et leur aptitude à noduler le soja.

Ce résultat est comparable aux résultats de BRETHAUER (1977), qui a trouvé que, sur 15 souches de *R.* cowpea ne nodulant pas le soja, trois souches seulement étaient capables de se lier *in vitro* à la lectine de soja et de PUEPPKE et al (1980) qui ont trouvé que, sur trois souches de *R.* cowpea nodulant le soja, seule une souche était capable de liaison et que, sur cinq souches de *R.* cowpea ne nodulant pas le soja, deux souches étaient capables de se lier à la lectine de soja.

c. Attachement des *Rhizobium* au poil absorbant.

Les photos 8 et 9 visualisent l'attachement des *Rhizobium* de la souche USDA 138 aux poils absorbants de *Glycine ussuriensis*. Cette légumineuse appartient à la famille du soja mais à l'avantage d'être beaucoup plus petite que le soja (*Glycine max*), ce qui facilite ce genre d'observation.

STACEY et al (1980) ont montré que l'attachement de cette souche aux poils absorbants de *G. ussuriensis* était spécifique, car il est inhibé par un haptène, tel que le N-acétyl-D-galactosamine, de la lectine de soja.

III. DISCUSSION

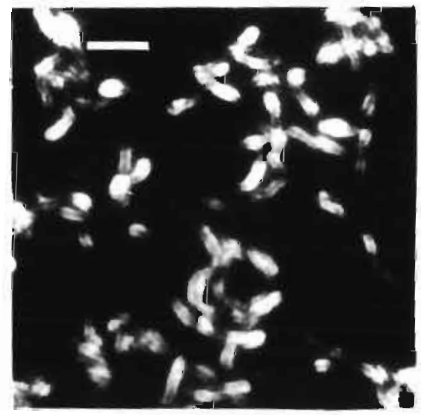
Dans la plupart des cas de compétition entre diverses souches de *R. japonicum* pour la nodulation du soja, on ne connait pas le mécanisme ou la propriété qui confère à une souche la supériorité compétitive vis-à-vis d'une autre souche (HAM 1980).

Dans notre cas précis de compétition, entre la souche de *R. japonicum* USDA 138 et la souche de *R.* cowpea M ORS 407, nous avons montré que la supériorité compétitive de USDA 138 vis-à-vis de ORS 407 est corrélée à la vitesse de nodulation, qui est plus rapide pour USDA 138.

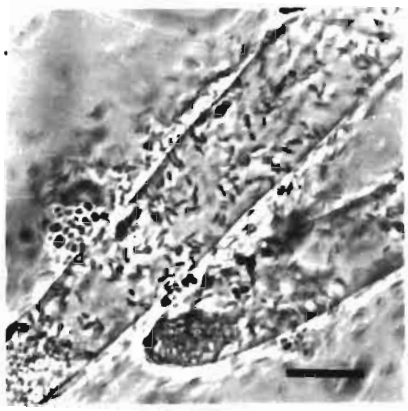
Or, nous avons vu (chapitre I) que la liaison spécifique des *Rhizobium* au niveau des poils absorbants, par l'intermédiaire des lectines, est probablement l'étape la plus importante dans le processus de la nodulation; on peut donc supposer que la vitesse de nodulation est fonction du temps nécessaire à l'établissement de la liaison des *Rhizobium* aux lectines.

6

2µ

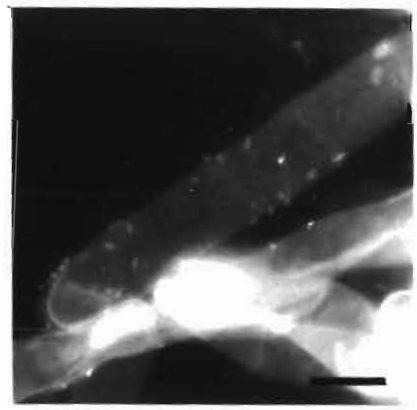


7



8

5µ



9

Planche II. - Observation, au microscope optique, de la liaison de la souche de *Rhizobium japonicum* USDA 138. à la lectine de soja et au poil absorbant racinaire de *Glycine ussuriensis*.

Photos 6 : Cellules non lavées, d'une culture liquide de 40 heures, + lectine fluorescente du soja cv. Malayan (épifluorescence)

7 : Même observation, mais avec des cellules lavées dans un tampon PBS (épifluorescence).

8 : Attachement des *Rhizobium* de USDA 138 au poil absorbant racinaire de *G.ussuriensis* (contraste de phase-).

9 : Même observation, mais les *Rhizobium* sont marqués à l'anticorps fluorescent anti-USDA 138 (épifluorescence).

Notre interprétation concernant la supériorité compétitive des souches de *R. japonicum* vis-à-vis des souches de *R.* cowpea M est donc que: la liaison des *R. japonicum* aux lectines se fait plus rapidement que celle des *R.* cowpea M.

Cette hypothèse est supportée non seulement par nos propres observations, mais aussi par quelques données de la littérature :
(1) Nous avons montré que les souches de *R.* cowpea M ne possèdent pas les récepteurs polysaccharidiques permettant la liaison à la lectine de soja, quand ces souches sont cultivées *in vitro*.
Or, de nombreux auteurs (DAZZO 1979, MORT et BAUER 1980, TSIEN et SCHMIDT 1981) ont montré que ces récepteurs n'étaient pas des éléments constitutifs du *Rhizobium* et d'autre part que les conditions de culture pouvaient affecter la biosynthèse de ces récepteurs; en outre, BHUVANESWARI et BAUER (1978) ont montré que la proximité des racines de soja pouvaient induire la biosynthèse des récepteurs sur les souches de *R. japonicum* dont la liaison aux lectines est négative, quand ces souches sont cultivées sur un milieu synthétique.
Si l'on admet ainsi la possibilité d'une telle induction *in vivo* des récepteurs (ce qui reste à montrer dans le cas de nos souches de *R.* cowpea M), on peut donc expliquer d'une part le retard dans la nodulation des *R.* cowpea M et d'autre part leur faible compétitivité vis-à-vis des *R. japonicum* par le temps nécessaire à la synthèse des récepteurs spécifiques permettant la liaison aux lectines.
(2) En accord avec cette hypothèse, nous avons montré (cf chapitre V, § II) que l'infectivité des souches de *R.* cowpea M est beaucoup plus sensible à la température que celle des souches de *R. japonicum*.
Une explication possible à ce résultat est que la biosynthèse des récepteurs est sensible à la température.

CHAPITRE VIII

SURVIE DE *R. JAPONICUM* ET DE *R.* COWPEA M DANS LE CAS D'UN SOL AFRICAIN

L'objet de ce chapitre est de comparer la survie des souches de *R. japonicum* et de *R.* cowpea après leur introduction dans un sol tropical. Le problème de la survie des souches introduites ou des souches indigènes, dans les sols tropicaux et en particulier dans les sols sahéliens de l'Afrique de l'Ouest, est compliqué par le fait que ces sols sont soumis à deux régimes climatiques:
(1) une saison des pluies qui permet la culture de la plante-hôte, les *Rhizobium* étant alors sous leur forme symbiotique,
(2) une saison sèche au cours de laquelle la température des sols, en surface, peut atteindre plus de 50°C, les *Rhizobium* étant alors sous leur forme libre comme les autres bactéries saprophytes du sol. C'est d'ailleurs la période critique pour la survie des *Rhizobium*.

I. COMPARAISON DE LA SURVIE DE *R. japonicum* et *R.* cowpea M DANS LE CAS D'UN SOL AFRICAIN.

Nous avons comparé la survie de la souche de *R. japonicum* USDA 138 et des souches de *R.* cowpea M ORS 406, ORS 407 et NIG, 8 mois après leur introduction dans le sol de Bel air à l'occasion des essais d'inoculation du soja cv. Malayan, cultivé en buses (chapitre V, § III et chap. II).

En fait, les *Rhizobium* sont restés 4 mois seulement sous leur forme libre, puisque la plante-hôte (le soja cv. Malayan) a été cultivée pendant 4 mois sur ces sols.

On peut estimer le nombre de *Rhizobium* introduits lors de l'inoculation à $3,5 \times 10^5$ *Rhizobium*/g sol pour chaque souche. Cependant, on peut penser que la culture du soja cv. Malayan dans les buses a enrichi le sol en *Rhizobium*, ces *Rhizobium* étant libérés lors de la sénescence des nodules. Si l'on admet qu'un nodule peut contenir 10^9 *Rhizobium* (TSIEN et SCHMIDT 1977), on peut estimer le nombre de *Rhizobium* au début de la saison sèche à environ 10^7 *Rhizobium*/g sol.

La survie a été estimée suivant deux approches :
(1) la première a consisté dans le dénombrement des *Rhizobium* vivants par gramme de sol, pour chaque souche introduite, suivant la technique de dilutions du sol (cf chap. II);
(2) la deuxième a consisté dans la comparaison des performances symbiotiques du soja cv. Malayan, cultivé sans réinoculation ou avec réinocu-

Tableau XXIII: Dénombrement des *Rhizobium* vivants, pour chaque souche de *R. japonicum* USDA 138 et de *R.* cowpea M ORS 406, 407, NIG, 8 mois après leur introduction dans le sol de Bel air.

Souche	Nombre de *Rhizobium* vivants (*) (/g de sol)
R. japonicum	
USDA 138	8×10^3
R. cowpea M	
ORS 406	8×10^5
ORS 407	5×10^3
NIG	8×10^5

(*) Moyenne de 3 échantillons de sol.

Tableau XXIV: Performances symbiotiques du soja cv. Malayan, cultivé sur le sol de Bel air avec ou sans réinoculation, 8 mois après l'introduction des souches de *R. japonicum* USDA138 et *R.* cowpea M ORS 406, ORS 407 et NIG.

Traitement	Réinoculation (*)	Nombre (**) de nodules (/plante)	Poids sec (**) de nodules (g/plante)	N total (**) de la partie aérienne (g/plante)
R. japonicum				
USDA 138	+	114	0,48	0,18
	-	98	0,47	0,19
R. cowpea M				
ORS 406	+	77	0,40	0,16
	-	72	0,37	0,16
ORS 407	+	47	0,39	0,11
	-	51	0,36	0,10
NIG	+	118	0,52	0,11
	-	93	0,43	0,14
Sol stérile	-	0	0	0,04

(*) +, Sol réinoculé; -, Sol non réinoculé.

(**) Moyenne de 6 plantes.

lation, sur les différents échantillons de sol où les souches ont été introduites.

1) Dénombrement des *Rhizobium* vivants

Les nombres approximatifs de *Rhizobium* vivants, 8 mois après leur introduction dans le sol de Bel air, sont consignés dans le tableau XXIII.

On constate que le nombre de *Rhizobium* vivants est variable suivant la souche introduite; les souches de *R.* cowpea M ORS 406 et NIG semblent avoir mieux survécu que les souches de *R. japonicum* USDA 138 et de *R.* cowpea M ORS 407. Les nombres de *Rhizobium* vivants sont à rapprocher aux 10^7 *Rhizobium*/g sol estimés en début de saison sèche, ce qui montre une diminution du nombre des *Rhizobium* au cours de la saison sèche.

2) Comparaison des performances symbiotiques du soja cv. Malayan sans réinoculation ou avec réinoculation du sol

a. Principe

Après transfert du sol des buses dans des bacs plastiques, les plantules de soja cv. Malayan ont été semées et cultivées suivant un régime de température de 25/16°C.
Pour chaque souche, les plantules d'un bac ont été réinoculées, alors que dans trois bacs les plantules n'ont pas été réinoculées. Dans un bac, le sol a été autoclavé pour servir de témoin absolu.

b. résultat

Les performances symbiotiques du soja cv. Malayan sur les différents sols, avec ou sans réinoculation, sont consignées dans le tableau XXIV.

On constate que, quelque soit la souche introduite, la réinoculation du sol avec cette souche n'améliore pas les performances symbiotiques du soja cv. Malayan. Si l'on compare les divers traitements non réinoculés entre eux, on voit que le sol où la souche de *R. japonicum* USDA 138 a été introduite donne les meilleures performances ce qui indique une bonne survie de cette souche dans le sol de Bel air.

Cependant, nous avons vu que la température de 25/16°C favorisait plus cette souche que les autres souches de *R.* cowpea M.

L'identification des nodules par immunofluorescence pour les plantes non réinoculées a montré que toutes les souches introduites ont formé la majorité des nodules sauf la souche ORS 407 qui a formé seulement 25% des nodules par plante. Ce résultat semble indiquer une mauvaise survie de cette souche dans le sol de Bel air et explique les faibles performances du soja cv. Malayan sur le sol où elle a été introduite.

II. DISCUSSION

De nombreuses études sur la survie de *R. japonicum* dans les sols de régions tempérées indiquent que ces *Rhizobium* peuvent y persister plusieurs années après leur introduction; par exemple, NORMAN (1942) a observé la présence de soja nodulés dans des champs où cette plante n'avait pas été cultivée depuis 24 ans. WEAVER et al (1972), ELKINS et al (1976), OBATON et GIRAUD (1977) ont confirmé par la suite que les *R. japonicum* pouvaient survivre de nombreuses années dans les sols tempérés, même en l'absence de leur plante-hôte.

Par contre, il n'existe que très peu de données en ce qui concerne la survie des *Rhizobium* dans les sols tropicaux ou la persistence de souches introduites dans ces sols.

Nos résultats sur la survie de la souche de *R. japonicum* USDA 138 dans le cas d'un sol africain montre qu'après 4 mois de saison sèche, le nombre de *Rhizobium* vivants est suffisamment important (de l'odre de 10^3 *Rhizobium*/g sol) pour assurer une bonne nodulation et une bonne fixation de N_2 du soja cv. Malayan.

Néanmoins, nous avons observé une diminution non négligeable du nombre de *Rhizobium* de cette souche, comparativement au nombre initial d'individus et à la survie des autres souches de *R.* cowpea M ORS 406 et NIG.

Malheureusement, il aurait fallu réaliser plusieurs dénombrements au cours de la saison sèche et attendre au minimum une année avant le resemis pour savoir si la diminution des *Rhizobium* vivants est linéaire en fonction du temps et si les performances symbiotiques

du soja cv. Malayan sans réinoculation sont encore suffisantes.

Le problème de la survie des *Rhizobium* est un problème majeur pour la réussite de l'inoculation d'une légumineuse. En effet, pour que l'inoculation soit intéressante en particulier en Afrique, il est nécessaire que cette inoculation n'ait lieu qu'à la première année de culture et que son effet persiste pendant plusieurs années, contrairement à l'apport d'engrais qui doit être répété chaque année.

CONCLUSION

L'étude, que nous avons effectuée sur les *Rhizobium* nodulant le soja, a permis de mettre en évidence l'existence d'un continuum entre les souches de *Rhizobium japonicum* et les souches de *Rhizobium* tropicaux, associées aux plantes du groupe d'inoculation croisée cowpea. Ce résultat remet en cause la classification actuelle qui sépare ces deux types de *Rhizobium* en deux espèces distinctes.

L'analyse des performances symbiotiques des souches de *R. japonicum* et de *R.* cowpea sur différents types de cultivar, d'origine asiatique (type Malayan) ou d'origine américaine (type Bossier), a montré que les souches de *R. japonicum* forment un groupe plus spécialisé dans la nodulation du soja que les souches de *R.* cowpea, les performances symbiotiques de ces dernières étant médiocres sur les cultivars américains.
Le caractère peu spécifique des cultivars asiatiques vis-à-vis des souches de *R.* cowpea peut s'expliquer par leur origine plus primitive que celle des cultivars américains. Ces derniers ont subi de nombreuses sélections et croisements qui ont modifié considérablement leur génotype et probablement leur spécificité vis-à-vis des *Rhizobium* qui nodulaient leurs ancêtres, c'est à dire les *R.* cowpea. De même, on peut penser que les *R.* cowpea forment un groupe de *Rhizobium* plus primitif que les *R. japonicum*.

La spécialisation des souches de *R. japonicum* est de plus confirmée par le fait que ces souches sont plus compétitives pour la nodulation du soja que les souches de *R.* cowpea. Nous avons montré que la supériorité compétitive des souches de *R. japonicum* était liée à leur vitesse de nodulation plus rapide que celle des *R.* cowpea.

Nous suggèrons que la liaison spécifique des *Rhizobium*, au niveau des poils absorbants, par l'intermédiaire des lectines joue un rôle essentiel dans la compétition *R. japonicum* x *R.* cowpea pour la nodulation du soja.

Cette hypothèse est basée sur le fait que nos souches de *R.* cowpea ne se lient pas *in vitro* à la lectine de soja, contrairement à la plupart des souches de *R. japonicum* (BOHLOOL et SCHMIDT 1974), et sur les travaux de BHUVANESWARI et BAUER (1978) qui ont montré que la biosynthèse des récepteurs spécifique des lectines pouvait être induite

sur le *Rhizobium* au contact des racines du soja.

"L'hypothèse lectines" fait actuellement l'objet de nombreuses recherches et les souches de *R.* cowpea nodulant le soja constituent un matériel intéressant pour valider ou infirmer cette hypothèse (PUEPPKE et al 1980).

Nos résultats aboutissent à des conclusions pratiques quant à l'introduction du soja dans les sols de l'Afrique de l'Ouest. Ces conclusions rejoignent d'ailleurs celles formulées par les chercheurs de l'Institut International d'Agriculture Tropical (IITA), à Ibadan (Nigeria), qui ont effectué presque simultanément des recherches analogues (ROUGHLEY et al 1980).

En effet, la réussite de l'implantation du soja en Afrique, et en particulier au Sénégal, est conditionnée par l'amélioration de la fixation symbiotique de N_2. Pour obtenir cette amélioration, deux approches sont possibles, qui sont d'ailleurs fonction du type de cultivar de soja:

(1) Dans le cas des cultivars américains, qui sont des cultivars à haut rendement, nous avons vu que l'inoculation par les souches les plus effectives de *R. japonicum* est indispensable, étant donné la spécificité symbiotique de ces cultivars. Ces souches, en outre, devront être sélectionnées non seulement d'après leur aptitude à survivre dans les sols africains, mais aussi d'après leur aptitude compétitive (cf chapitre VI).

Au niveau de l'inoculation, il est indispensable de mettre au point une méthode d'inoculation, des graines ou du sol, qui soit adaptée aux conditions climatiques extrêmes des pays africains.

(2) La deuxième voie de recherche adoptée par l'IITA, consiste à sélectionner des cultivars de soja peu spécifiques pouvant être nodulés, sans inoculation préalable, par les souches natives de *R.* cowpea et à effectuer des croisements de ces cultivars avec des cultivars très productifs pour en améliorer les rendements.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALBERSHEIM, P., JONES, T.M. et ENGLISH, P.D. (1969).
Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes. Annu. Rev. Phytopathol, 7 : 171-194.

ALBERSHEIM, P. et ANDERSON-PROUTY, A.J. (1975).
Carbohydrates proteins, cell surfaces and the biochemistry of pathogenesis. Annu. Rev. Plant Physiol. 26 : 31-52.

ALLEN, E.K. et ALLEN, O.N. (1947).
Soil Sci. Soc. Ann. Proc : 12 : 203-208.

ALLEN, E.K. et ALLEN, O.N. (1961).
The scope of nodulation in the leguminosae. In : Recent advances in botany. pp: 585-8. Univ. Toronto and New York, 585-588.

ALLEN, A.K. et NEUBERGER, A. (1975).
A simple method for the preparation of an affinity absorbant for soybean agglutinin using galactosamine and CH Sepharose. FEBS Lett. 50 : 362-364.

ANON. (1975)
Annual Report, p 31. International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria.

ARWOOTH, N.L. (1974).
Production and research on food legumes in Thailand. Tropical Agriculture Research Series Japan. 6 : 93-100.

AYALA, B. Luis.B (1977).
Estudio de algunos aspectos de la fijacion symbiotica de nitrogeno por el mani II. Agronomia Tropical, vol. 27 : 427-449.

AYANABA, A. et LAWSON, T.L. (1976).
Diurnal changes in acetylene reduction in field-grown cowpeas and soybeans. Soil Biol. Biochem. 9 : 125-129.

BACH, M.K., MAGEE, W.E. et BURRIS, R.H. (1958).
Plant Physiol, 33 : 118.

BALANDREAU, J.P., MILLIER, C.R. et DOMMERGUES, Y.R. (1974).
Diurnal variations of nitrogenase activity in the field. Appl. Microbiol, 24 : 662-665.

BAUER, W.D. (1977).
Lectins as determinants of specificity in legume-Rhizobium symbiosis In : Genetic Engeneering for Nitrogen Fixation.Hollaender A. (ed.). Plenum Press, New York, 283-295.

BAUER, W.D. et BHUVANESWARI, T.V. (1978).
Possible role of lectins in Plant-microorganism interactions, specifically legume/Rhizobium symbiosis. In : N.S. Subba Rao (ed.). Recent Advances in Biological Nitrogen Fixation.

BERGERSEN, F.J. (1958).
The Bacterial component of soybean root nodules. J.Gen. Microbiol. 19 : 312-323.

BERGERSEN, F.J. (1974).
Formation and function of bacteroïds. In : The biology of nitrogen fixation. Quispel, A. (ed.). North-Holland, Publishing Co. Amsterdam. 473-498.

BERGERSEN, F.J. (1980)
Mechanisms associated with the fixation of N_2 in the legume root-nodule. In : Advances in legume science. Summerfield, R.J. and Bunting, A.H. (ed.). England, 61-75.

BERGERSEN, F.J. et BRIGGS, M.J. (1958).
Studies on the bacterial component of soybean root nodules : cytology and organization in the host tissue.J.Gen.Microb.19:482-490

BERGEY, G.H. (1974).
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition. Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (ed.). Baltimore, USA, Williams and Wilkins Co. 261-265.

BERINGER, J.E. (1978).
Rhizobium recognition. Nature, 271 : 206-207.

BHUVANESWARI, T.V. PUEPPKE, S.G. et BAUER, W.D. (1977).
Role of lectins in plant-microorganism interactions. In : Binding of soybeanlectin to root cultured rhizobia. Plant Physiol. 62 : 71-74.

BIEBERDORF, F.W. (1938).
The cytology and histology of the root nodules of some leguminosae. J. amer. Soc. Agron. 30 : 375-389.

BOHLOOL, B.B. et SCHMIDT, E.L. (1974).
Lectins : a possible basis for specificity in Rhizobium. Science, 185 : 269-271.

BOHLOOL, B.B. et SCHIMDT, E.L. (1976).
Immunofluorescence polar tips of R.japonicum : possible site of attachment or lectin binding. J. Bacteriol. 125 : 1188-1194.

BOWEN, G.D. et KENNEDY, M.M. (1961).
Heritable variation in nodulation of Centrosema pubescens.Queensland Journal of Agricultural Science, 18: 161-170.

BREED, R.S., MURRAY, E.G.D. et SMITH, N.R. (1957).
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7th edition. Breed, Murray and Smith (ed.). Baltimore, USA, Williams and Wilkins CO.

BRETHAUER, T.S. (1977).
Soybean lectin binds to rhizobia unable to nodulate soybean. Lectins may not determine host specificity. Master's thesis, University of Illinois.

BROCKWELL, J. (1963).
Accuracy of a plant-infection technique for counting populations of Rhizobium trifolii. Appl; Microbiol. 11 : 377-383.

BROMFIELD, E.S.P. et ROUGHLEY, R.J. (1980).
Characterisation of rhizobia isolated from nodules on locally-adapted Glycine max grown in Nigeria. Ann. Appl. Biol. 95:185-190

BROUGHTON, W.J. (1978).
Control of specificity in legume Rhizobium associations. Ann. Rev. Appl. Bacteriol. 165.

BURTON, J.C. (1975).
Pragmatic aspects of the Rhizobium leguminous plant association. In Proceedings of the first int. Symp. on N_2 Fixation. Newton, W.E. and Nyman, C.J. (ed.). Washington State University Press, 429-446.

CALDWELL, B.E., VEST, G. (1968).
Nodulation interaction between soybean genotypes and serogroups of Rhizobium japonicum. Crop. Sci. 8 : 680-682.

CARLSON, J.B. (1969)
Estimation surface area of soybean root systems. J. Minn. Acad. Sci. 36 (1) : 16-19.

CASSE, F., BOUCHER, C. JULLIOT, J.S., MICHEL, M. et DENARIE, J. (1979).
Identification and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti using agarose gel electrophoresis. J. Gen. Microbiol. 113 : 229-242.

CHANDLER, M.R. (1978).
Some observations on infection of Arachis hypogaea L. by Rhizobium.
J. Exp. Bot. 29 : 749-756.

CHATEL, D.L., GREENWOOD, R.M. et PARKER, C.A. (1968).
Saprophytic competence as an important character in the selection of Rhizobium for inoculation. 9th Int: Cong. Soil Sci. Trans. 11 : 65-73.

CHEN, H.K. (1938)
Nature, 142 : 753.

CHEN, A.T. et PHILLIPS, D.A. (1976).
Attachment of Rhizobium to legume roots as the basic for specific interactions. Physiol. Plant. 38 : 83-88.

CLOONAN, M.J. (1963).
Aus. J. Sci. 26 : 121.

DART, P.J. et PATE, J.S. (1959).
Nodulation studies in legumes. III. The effects of delaying on the seedling symbiosis of barrel medic, Medicago tubuloides.
Aust. J. Biol. Sci. 12 : 427-444.

DART, P.J. et MERCER, F.V. (1965).
Aust. J. Agric. Res. 16 : 321.

DART, P.J. (1975).
Legume root nodule initiation an development. In : The development an function of roots. Torrey, J.G. and Clarkson, D.T. (ed.) New York. Academic Press, 467.

DART, P.J. (1977)
Infection and development of leguminous nodule. In : A treatise on dinitrogen fixation, section III, Hardy, R.W.F. et Silver,W.S. (ed.). John Wiley and sons, New York, 367-472.

DATE, R.A. (1976).
Principles of Rhizobium strain selection. In : Symbiotic nitrogen fixation in plants. Nutman P.S. (ed.) Cambridge Univ. Press, Cambridge, 137-150.

DATE, R.A. et HALLIDAY, J. (1978).
Relationships between Rhizobium and tropical forage legumes. In : Advances in legume science. Summerfield, R.J. and Bunting, A.H. (ed.). England, 597-601.

DAZZO, F.B. et HUBBELL, D.H. (1975).
Cross-reactive antigens and lectins as determinants of symbiotic specificity in the Rhizobium-clover association. Appl. Microbio- 30 : 1017-1033.

DAZZO, F.B. et BRILL, W.J. (1977).
Receptor site on clover and alfafa for Rhizobium. Appl. Env. Microbiol. 33. 132-136.

DAZZO, F.B. YANKE, W.E. et BRILL, W.J. (1978).
Trifoliin : a Rhizobium recognition protein from white clover. Bioch. Biophy. Acta, 539 : 276-286.

DAZZO, F.B., URBANO, M.R. et BRILL, W,J. (1979).
Transient appearance of lectin receptors on Rhizobium trifolii. Current Microbiol. 2 : 15-20.

DE LEY, J. et RASSEL, A. (1965).
DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus Rhizobium.
J. Gen. Microbiol. 41 : 85-91.

DE LEY, J. (1968).
DNA base composition and hybridisation in the taxonomy of phytopathogenic bacteria. Ann. Rev. Phytopathology, 6 : 63-90.

DIATLOFF, A. et FERGUSSON, J.E. (1970).
Nodule number, time to nodulation and its effectiveness in eleven accessions of glycine wightii. Trop. Grasslands, 4 : 223-228 .

DOMMERGUES, Y.R. (1978).
The plant microorganism system. In : Interaction between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Dommergues, Y.R. et KRUPA, S.V. (ed.). Amsterdam, Elsevier, 1-37.

DREYFUS, B.L. et DOMMERGUES, Y.R. (1981).
Nitrogen-fixing nodules induced by Rhizobium on the stem of the tropical legume Sesbania rostrata.FEMS Microb. letters. 313-317

DUDMAN, W.F. (1964).
Immune-diffusion analysis of the extracellular soluble antigens of two strains of Rhizobium meliloti. J. Bacteriol. 88 : 782-794.

ELKINS, D.M., HAMILTON, G., CHAN, C.K.Y., BRISKOWICH, M.A. et VANDEVENTER, J.W. (1976). Effect of cropping history on soybean growth and nodulation of soil rhizobia. Agron. J. 68 : 513-517.

ENGVALL, E. et PERLMANN, P. (1971).
Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin. Immunochemistry, 8 : 871-874.

ENTLICHER, G., KOSTIR, J.V. et KOCOUREK, J. (1971).
Bioch. et Biophys. Acta, 221 : 272.

FRED, E.B. BALDWIN, I.L. et McCOY, E. (1932).
Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Press, Madison, Stud. Sci 5 : 343.

GARCIA, J.L. (1981).
Etude taxonomique de bactéries dénitrifiantes isolées sur benzoate, dans les sols de rizières du Sénégal. Cah. ORSTOM, sér. Biol. 43 : 13-25.

GATEHOUSE, J.A. et BOULTER, D. (1980).
Isolation and properties of a lectin from the roots of Pisum Sativum (Garden pea). Physiol. Plant. 49 : 437-442.

GIBSON, A.H. (1963).
Physical environnement ans symbiotic nitrogen fixation. The effect of root temperature on recently nodulated Trifolium subterraneum plants. Aust. J. Biol. Sci. 16 : 28-42.

GIBSON, A.H. (1964).
Aust. J. Agric. Res. 15 : 37-49.

GIBSON, A.H., DREYFUS, B.L. LAWN, R.J., SPRENT, J.I. et TURNER, G.L. (1981).
Host and environnemental factors affecting hydrogen evolution and uptake. In : Current prespectives in nitrogen fixation. Gibson, A.H. et Newton, W.E. (ed.) Australian Acad. Sci., Camberra.

GIBSON, A.H., DRYEFUS, B.L. et DOMMERGUES, Y.R. (1982).
Nitrogen fixation by legumes in the tropics. In : Microbiology of tropical soils. Diem, H.G. et Dommergues, Y.R. (ed.), MARTINUS NIJHOFF, LA HAGUE.

GRAHAM, P.H. (1963).
Antigenic affinities of the root-nodule bacteria of legumes. Antonie Van Leeuwenhoek, 29 : 281-291.

GRAHAM, P.H. et PARKER, C.A. (1964).
Diagnostic features in the characterisation of the root-nodule bacteria of legumes. Plant and soil, 20 : 383-396.

GRAHAM, P.H. (1964).
The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. J. Gen. Microb. 35 : 511-517.

GRAHAM, P.H. (1969).
Serology of the Rhizobiaceae. In : Analytical serology of microorganisms.
Kwapinski, J.B. (ed.) John Wiley and sons, New York, 2 : 353-378.

GRAHAM, P.H. (1976)
Identification and classification of root nodule bacteria. In : Symbiotic nitrogen fixation in plants. Nutman, P.S. (ed.) Cambridge, 99-112.

HAM, G.E. (1978).
Interactions of Glycine max and Rhizobium japonicum. In : Advances in legume science. Summerfield, R.J. and Bunting, A.H. (ed.), England, 289→296.

HAM, G.E. (1980).
Inoculation of legume with Rhizobium in competition with naturalized strains. In : Nitrogen fixation, Volume II. Newton, W.E. et Orme-Johnson, W.H. (ed.) University Park Press, Baltimore, 131-138.

HAMATOVA, E. (1965).
The electing of strains of R.japonicum capable of reliable nodulation in Czecloslovak soya varieties. Rostlinne Vyroby. 9 :193-209.

HAMBLIN, J. et KENT, S.P.(1973).
Possible role of phytohemagglutinin in Phaseolus vulgaris L. Nature New Biol. (London), 245 : 28-30.

HARDY, R.W.F., HOLSTEN, R.D., JACKSON, E.K. et BURNS, R.C. (1968)
The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation : laboratory and field evaluation. Pl. Physiol. 43 : 1185-1207.

HARDY, R.W.F., BURNS, R.C. et HOLSTON, R.D. (1973).
Application of the acetylene-ethylène assay for measurement of N_2 fixation. Soil. Biol. Biochem. 5 : 47-81.

HARRISON, F.C. et BARLOW, B. (1906).
Trans. Roy. Soc. Can. 2nd ser., 12 : 157.

HERBERLEIN, G.T., DE LEY, J. et TIJTGAT,R. (1967).
DNA homology and taxonomy of Agrobacterium, Rhizobium and Chromobacterium. J. Bacteriol. 94 : 116-124.

HENSON, I.E. et WHEELER, C.T. (1976).
Hormones in plants bearing N_2 fixing root nodules. New Phytol. 76 : 433-439/.

HIGASHI, S. (1967).
Transfer of infectivity of R.trifolii to R.phaseoli as mediated by an episomic factor. J. Gen. and Appl. Microb . 13 : 391-403.

HUBBEL, D.H., MORALES, V.M. et UMALI-GARCIA, M. (1978).
Pectolytic enzymes in Rhizobium.
Appl. Envir. Microbiol. 35 : 210-213.

HUDD, G.A., LLOYD-JONES, C.P. et HILL-COTTINGHAM, D.G. (1980).
Comparison of acetylene-reduction and N_2 15 techniques for the determination of N_2 fixation by field bean. Physiol. Plant, 48 : 111-115.

JARA, P., DREYFUS, B.L. et DOMMERGUES, Y.R. 1981.
Is it necessary to inoculate soybean in west-African soils ?
In : Proceedings of 8th North American Rhizobium conference.
Univ. Mannitoba Winnipeg , Canada. August 2nd-7th 1981.

JENSEN, H.L. (1942).
Nitrogen fixation in leguminous plants. General characters of root-nodule bacteria isolated from species of Medicago and Trifolium in Australia. Proceedings of the linnean Society N.S.W. 67 : 98-108.

JOHNSTON, A.W.B., BEYNON, J.L., BUCHANAN-WOLLASTON, A.V., SETCHELL, S.M. HIRSCH, P.R. et BERINGER, J.E. (1978).
High Frequency transfer of nodulation ability between strains and species of Rhizobium Nature (London), 276 : 635-636.

LABANDERA, C.A. et VINCENT, J.M. (1975).
Competition between and introduced strain and native urugayan strains of R.trifolii. Plant and Soil, 42 : 327-347.

LAGACHERIE, B., HUGOT, R. et AMARGER, N. (1977).
Selection de souches de R.japonicum d'après leur compétitivité pour l'infection. Ann. Agron. 28 : 379-389.

LANGE, R.T. (1961).
Nodule bacteria associated with the indigenous leguminosae of South-Western Australia, J. Gen. Microbiol. 61 : 351-359.

LANGE, R.T. (1966).
Bacterial symbiosis with plants. In : Symbiosis. Henry, S.M. (ed.) Academic Press, New York and London. Vol. 1 : 99-170.

LAW, I.J. et STRIJDOM, B.W. (1977).
Some observations on plant lectins and Rhizobium specificity. Soil Biol. Biochem. 9 : 79-84.

LEGG, J.O. et SLOGER, C. (1975).
A tracer method for determining symbiotic N_2 fixation in field studies. Proc. 2nd Int. Conf. stable Isotopes. Klein et Klein (ed.) Oak Brook.

LEONARD, L.T. (1923).
Nodule production kinship between the soybean and the cowpea. Soil Science, 15 : 277-283.

LI, D, et HUBBEL, D.H. (1969).
Infection thread formation as a basis of nodulation specificity in Rhizobium strawberry clover associations. Can. J. Microb. 15 : 1133-1137.

LIBBENGA, K.R., VAN IREN, F., BOGERS, R.J. et SCHRAAG-LAMERS, M.F. (1973).
The role of hormones and gradients in the initiation of cortex proliferation and nodule formation in Pisum sativum. Planta, 114 : 29-39.

LIE, T.A., WIRNANO, R. et TIMMERMANS, P.C.J.M. (1978).
Rhizobium strains isolated from wild and cultivated legumes : suppression of nodulation by a non-nodulating Rhizobium strain. In : Microbial Ecology Loutit, M.W. et Miles, J.A.R. Springer Verlag, Berlin, 398-401.

LIENER, I.E. et PALLANSCH, M. (1952).
Purification of a toxic substance from deffated soybean flour. J. Biol. Chem. 197, 29-36.

LINDEMANN, W.C., SCHMIDT, E.L. et HAM, G.E. (1974).
Evidence for double infection within soybean nodules. Soil Science, 118 : 274-279.

LJUNGGREN, H. (1969).
Mechanism and pattern of Rhizobium invasion into leguminous root hairs. Physiol. Plant. 5 : 3-82.

LOTAN, R., SKUTELSKY, E. DANON, D. et SHARON, N. (1975).
The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (Arachis hypogaea). J. Biol. Chem. 193 : 265-275.

MAGUE, T.H. et BURRIS, R.H. (1972).
Reduction of acetylene and nitrogen by field-grown soybeans. New Phytol. 71 : 275-286.

MANDEL, M. et MARMUR, J. (1968).
In : Methods in enzymology, vol 12B. Colowik et Kaplan (ed.) Acad.Press London et New york, 195-206.

MARTINEZ - MOLINA, E.V. MORALES, M. et HUBBEL, D.M. (1979).
Hydrolytic enzyme production by Rhizobium.
Appl. Env. Microbiol. 38 : 1180-1188.

McCOY, E. (1932).
Infection by Bact. radicicola in relation to the microchemistry of the host's cell walls. Proc. R.S. (London) Ser. B 110: 512-533.

MEANS, U.M., JOHNSON, H.W., ERDMAN, L.W. (1961).
Competition between bacterial strains affecting nodulation in soybeans? Soil Sci. Soc. Am. Proc 25 : 105-108.

MEISNER, C.A. et GROSS, D. (1980).
Some guidelines for the evaluation of the need for and response to inoculation of tropical legumes. Tech. Bul. N° 265.

MINCHIN, F.R. et PATE, J.S. (1974).
Diurnal functioning of the legume root nodule.
J.Exp. Bot. 25 : 295-308.

MORLEY, S.J. et JONES, D.G. (1980).
A note on a highly sensitive modified ELISA technique for Rhizobium strain identification. J. Appl. Bacteriol. 49 : 103-109.

MORT, A.J. et BAUER, W.D. (1980)
Plant Physiol 66 : 158-163.

MORT, A.J. et BAUER, W.D. (1981).
ASPP Abstracts.

NAGATA, T. (1959).
Studies on the differentiation of soybean in the world with special regard to that of Southeast Asia. Proc. Crop. Sci. Soc. Japan, 28 : 79-82.

NAPOLI, C.A. et HUBBELL, D.H. (1975).
Ultrastructure of Rhizobium-induced infection threads in clover root hairs. Appl. Microbiol. 30 : 1003-1009.

NAPOLI,C.A. et ALBERSHEIM, P. (1980).
R.leguminosarum mutants incapable of normal extracellular polysaccharide production. J. Bacteriol. 141 : 1454-1456.

NASH, D.T. et SCHULMAN, H.M. (1976).
Leghemoglobins and nitrogenase activity during soybean root-nodule development. Can. J. Botany, 54 : 2790-97.

NORMAN, A.G. (1942).
Persistence of R.japonicum in soil.
J. Am. Soc. Agron. 34 : 499.

NORRIS, D.D. (1956).
Legumes and the Rhizobium symbiosis.
Emp. J. Exp. Agric. 24 : 246-270.

NUTMAN, P.S. (1956).
The influence of legume in root nodule symbiosis.
Biol. Rev. 31 : 109-151.

NUTMAN, P.S. (1959).
Some observations on root-hair infection by nodule bacteria .
J. Exp Botany, 10 : 250-263.

NUTMAN, P.S. (1965).
Symbiotic nitrogen fixation. In : Soil nitrogen. Barthlomew, W.V. and Clark, F.E. (ed.) Am. Soc. Agron. 363-379.

NUTMAN, P.S. (1967).

Aust. J. Agric. Res. 18 : 381.

NUTMAN, P.S. et ROSS, G.T.S. (1970).
Rothamstead Experiment Station Report. Part 2 : 148-167.

NUTMAN, P.S., DYE, M. et DAVIS, D.E., (1978).
The Ecology of Rhizobium. In : Microbial-Ecology-Loutit, M.W. et Miles, J.A.R. (ed.) Springer-Verlag, Berlin 398-401.

OBATON, M. (1971).
Utilisation de mutants spontanés résistants aux antibiotiques pour l'étude écologique des Rhizobium.C.R. Acad. Sci. Paris, 272 : 2630-33.

OBATON, M. et GIRAUD, J.J. (1977).
Etude de la survie des Rhizobium japonicum dans le sol.Info. Techniques CETIOM, 57 : 3-9.

OUCHTERLONY, O. (1958).
Prog. Allergy 5, 1-78.

PARKER, C.A., TRINICK, M.J. et CHATEL, D.L. (1977).
Rhizobia as soil and rhizosphere inhabitants, in : A treatise on dinitrogen fixation . Section IV : Agronomy and ecology. Gibson, A.H. (ed.) John Wiley and sons, New York, USA, 311-352.

PATE, J.S. (1977).
In : A treatise on dinitrogen fixation. Section III. Biology. Hardy, R.W.F. et Silver, W.S. (ed.) John Wiley and sons, New York USA 473-517.

PHILLIPS, D.A. (1980).
Efficiency of symbiotic N_2 fixation in legumes. Ann. Rev. Plant Physiol. 31 : 29-49.

PUEPPKE, S.G., BAUER, W.D., KEEGSTRA, K. et FERGUSON, A.L.(1978)
Role of lectins in plant-microorganism interaction. II : Distribution of soybean lectin in tissues of Glycine max (L) Merr. Plant. Physiol. 61 : 779-784.

PUEPPKE, S.G. FREUND, T.G., SCHULTZ, B.C. et FRIEDMAN, H.P.(1980)
Interaction of lectins from soybean and peanut with rhizobia that nodulate soybean, or both plants. Can. J. Microbiol. 26 : 1489-1497.

PULVER, E.L., BROCKMAN, F., NANGJU, D. et WIEN, H; (1978).
IITA'S programme on N_2 fixation. In : Biological N_2 fixation; I.A.E.A. Vienne, 269-284.

PUPPO, A., RIGAUD, J. et BARTHE, Ph. (1974).
Sur la présence de cytokinines dans les nodules de Phaseolus vulgaris. L.C.R. Acad. Sc., 279 : 2029-2032.

REPORTER, M., RAVEED, D. et NORIS, G. (1975).
Binding of R.japonicum to cultured soybean root cells morphological evidence. Plant sc. Letters, 5 : 73-76.

REYES, V.G. et SCHMIDT, E.L. (1979).
Population densities of Rhizobium japonicum strain 123 estimated directly in soil and rhizospheres. Appl. Env. Microbiol. 37:854-858.

RHODES, M.E. (1958).
The Cytology of Pseudomonas spp. as revealed by a silver-plating staining method. J. Gen. Microbiol. 18 : 639-648.

ROBINSON, A.C. (1967).
The influence of host on soil and rhizosphere populations of clover and lucerne root-nodule bacteria in the field. J. Aust. Inst. Agr. Sci. 33 : 207-209 .

ROUGHLEY, R.J., BROMFIELD, E.S.P., PULVER, E.L. et DAY, J.M.(1980)
Competition between species of Rhizobium for nodulation of Glycine max soil. Biol. Bioch . 12 : 467-470.

ROVIRA, A.D. (1961).
Rhizobium numbers in the rhizosphere of red clover and paspalum in relation to soil treatment and the numbers of bacteria and fungi. Aust. J. Agric. Res. 12 : 77-83.

SAHLAMN, K. et FAHRAEUS, G. (1963).
An electron microscope study of root-hair infection by Rhizobium J. Gen. Microbiol. 33 : 425, 427.

SANDERS, R;E;, CARLSON, R.W. et ALBERSHEIM, P. (1978).
A Rhizobium mutant incapable of normal polysaccharide secretion-nature, 271 : 240-242.

SCHMIDT, E.L., BANKOLE, R.O. et BOHLOOL, B.B. (1968).
Fluorescent antobody approach to the study of rhizobia in soil.
J. Bacteriol 95 : 1987-1992.

SCHUBERT, K.R. et EVANS, H.J. (1976).
Hydrogen evolution : a major factor affecting the efficiency of N_2 fixation in nodulated symbionts. Proc. Nat. Ac. Sci. USA, 73 : 1207-1211.

SCHWINGHAMER, E.A. (1971).
Antagonism between strains of R.trifolii in culture.
Soil Biol Biochem. 3 : 355-363.

SKRDLETA, V. (1970).
Competition for nodule sites between two inoculum strains of Rhizobium japonicum as affected by delayed inoculation. Soil Biol Biochem. 2 : 167-171.

SLOGER, C. (1976).
In : World soybean research. Lowell, D. Hill (ed.), Illinois, USA 125-134.

SOHLEIM, B. et RAA, J. (1973).
Characterization of the substances causing deformation of root hairs of Trifolium repens when inoculated with R.trifolii. J. Gen. Microbio. 77 : 241-247.

SOUTO, S.M., COSER, A.C. et DOBEREINER, J. (1970).
Especifidade de una variedade native de "Alfafa de nordeste" ((Stylosanthes gracilis N.B.K.) na symbiosis con Rhizobium sp.
In : Proc V reunion latinoamericana de Rhizobium. Dep. Nac. de Pesquisa Agropecuaria, Rio de Janeiro, Brazil, 78-91.

STACEY, G., PAAU, A.S. et BRILL, W.J. (1980).
Host recognition in the Rhizobium-soybean symbiosis.
Pl. Physiol.

STANIER, R.Y., PALLERONI, N.J. et DOUDOROFF, M. (1966).
The aerobic pseudomonads : a taxonomic study.
J. Gen. Microbiol. 43 : 159-271.

STAPHORST, J.L. et STRIJDOM, H.W. (1972).
Some observations on the bacteroïds in nodules of Arachis spp and the isolation of rhizobia from these nodules. Phytophyl. 4 : 87-92.

SYONO, K. et TORREY, J.G. (1976).
Identification of cytokinins of root nodules of the garden pea.
Plant. Physiol. 57 : 602-606.

T'MANNETJE, L. (1967).
A re-examination of the taxonomy of the genus Rhizobium and related genera using numerical analysis. Ant. Van Leeuw. J. Bact. and Serol. 33 : 477-491.

TICHA, M., ENTLICHER, G., KOSTIR, J.V. et KOCOUREK, J. (1970).
Biochem. Biophys. Acta. 221 : 282-289.

TRINICK, M.J. (1976).
Rhizobium symbiosis with a non legume. In : 1st International Symposium on nitrogen fixation. Newton, W.E. and Nyman, C.J. (ed.) Washington State University Press, Pullman, 507-517.

TSIEN, H.C. et SCHMIDT, E.L. (1980).
Accumulation of soybean lectin-binding polysaccharide during growth of Rhizobium japonicum as determined by hemagglutination inhibition assay. Appl. Env. Microbiol. 39 : 1100-1104.

TSIEN, et SCHMIDT, E.L. (1981).
LOcalization and partial characterization of soybean lectin-binding polysaccharide of R.japonicum. J. Bacteriol. 145:1063-1074.

TUTIN, T.G. (1958).
Classification of the legumes. In : Nutrition of legumes. Hallsworth E.G. (ed.), Butterworth, London, 3-14.

UDENFRIEND, S. (1962).
Fluorescence assay in biology and medicine. Acad. Press New York, USA.

VAN RENSBURG, H.T., STRIJDOM, B.W. et KRIER, M.M. (1976).
Necessity for seed inoculation of soybeans in South Africa. Phytophylactica, 8 : 91-96.

VINCENT, J.M. (1970).
A manual for the practical study of root nodules bacteria. IBP Handbook n° 15. Blackwell Sci. Publications. Oxford and Edinburgh

VINCENT, J.M. (1974).
Root-nodule symbiosis with Rhizobium : general microbiology. In : the biology of nitrogen fixation. Quispel A. (ed.) North-Holland. Publishing Co. Amsterdam, 265-341.

VINCENT, J.M. (1977).
In : A treatise on dinitrogen fixation.5(Rhizobium : general microbiology). Section III Biology. Hardy, R.W.F. et Silver, W.S. 'eds.- John Wiley and sons, New York, USA, 277-366.

WALKER, R.H. et BROWN, P.E. (1934).
The nomenclature of the cowpea group of root nodule bacteria. Soil Science, 39, 221-225.

WATKINS, W.M. et MORGAN, W.T.J. (1952).
Nature 169-825.

WEAVER, R.W., FREDERICK, L.R. et DUMENIL, L.C. (1972).
Effect of soybean cropping and soil properties on numbers of Rhizobium japonicum in Iowa soils. Soil Sci, 11' : 137-141.

WEBER, C.R. (1966).
Nodulating and non-nodulating soybean isolines. In : Agronomic and chemical attributes. Agron. J. 58 : 43-46.

WEBER, D.F., CALDWELL, B.E., SLOGER, C. et VEST, H.G. (1971).
Some USDA studies on the soybean an Rhizobium symbiosis. Pl. Soil, special. Vol. 293-304.

WILSON, J.K. (1944).
Over five hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of the legumes. Soil Sci. 58 : 61-69.

WINARNO, R. et LIE, T.A. (1979)
Competition between Rhizobium strains in nodule formation: interaction between nodulating and non-nodulating strains. Plant and soil, 51 : 135-142.

WITTENBERG, J.B. BERGERSEN, F.J., APPLEBY, C.A.et TURNER, G.L. (1974).
Facilitated oxygen diffusion. The role of leglemoglobin in N_2 fixation by bacteroïds isolated from soybean root nodules. J. Biol. Chem. 249 : 4057-4066.

WOLPERT, J.S. et ALBERSHEIM, P. (1976).
Host symbiont interactions I. The lectins of legumes interact with O-antigen containing lipopolysaccharides of their symbiont Rhizobia. Biochem. Biophys. Res. Commun. 70 : 729-737

WYNNE, J.C., ELKAN, G.H., MEISNER, C.M. SCHNEEWEIS, T.J. et LIGON, J.M. (1980). Greenhouse evaluations of strains of Rhizobium for peanuts.
Agron. J. 72 : 645-649.

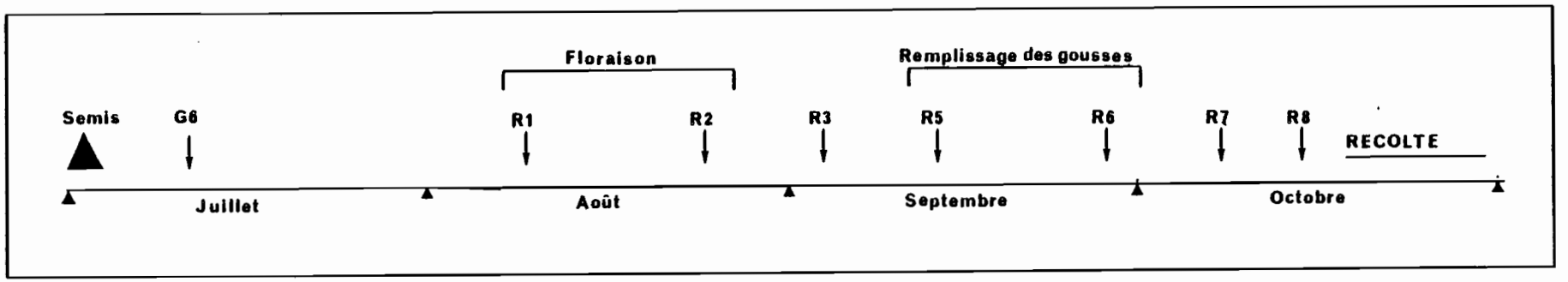
YAO, P.Y. et VINCENT, J.M. (1969).
Host specificity in the root hair curling factor of Rhizobium spp. Aust. J. Biol. Sc. n 22 : 413-423.

YAO, P.Y. et VINCENT, J.M. (1976).
Factors responsible for the curling and branching of clover root hairs by Rhizobium. Plant and Soil, 45 : 1-16.

ANNEXE I : Analyses physico-chimiques des sols de Bel air et Coular

Sol	Argile (%)	Limon (%)	Sable (%)	N total (ppm)	C/N	Passim. (ppm)	pH H_2O	pH KCl
Bel air	2,8	1,4	94,8	188	10,4	237	5,7	4,9
Coular	6,0	7,1	83,8	340	9,4	30	5,8	5,0

ANNEXE II: Cycle végétatif du soja et photopériodisme.



- Cycle du soja cv. 44A73, cultivé au Sénégal pendant la saison des pluies.
(le cycle du soja cv. Malayan est plus long de 10 jours)

Tableau: - Longueur approximative de la photoperiode effective sous diverses latitudes en suposant qu'une variété adequate soit semée le 20 mai et mûrisse le 20 septembre sous chaque latitude.

Latitude	Photopériode 20 mai (*)		Photopériode 20 septembre (**)		Différence	
	heures	minutes	heures	minutes	heures	minutes
10°	13	22	12	52	0	30
15°	13	34	12	55	0	39
20°	13	45	12	58	0	47
25°	14	12	13	00	1	12
30°	14	40	13	00	1	40
35°	15	15	13	08	2	07
40°	15	45	13	12	2	33
45	16	20	13	12	3	08

*20 novembre, pour l'hémisphère Sud.
**20 mars, pour l'hémisphère Sud.