

LA SYMBIOSE ENTRE

Rhizobium* ET *Sesbania rostrata

LÉGUMINEUSE À NODULES CAULINAIRES

Thèse de Doctorat d'Etat

soutenue le

par

Bernard Dreyfus

pour obtenir le grade

de Docteur ès-Sciences

devant le jury composé de

Président

Jean Tavlitzki

Rapporteur

Claudine Elmerich

Directeur de Thèse

Yvon Dommergues

Examineurs

Jean-Paul Aubert

Jean Dénarié

Jean Rigaud

RÉSUMÉ ET MOTS-CLÉS
DESTINÉS À FIGURER AU CATALOGUE AUTOMATISÉ DES THÈSES

Résumé : La symbiose entre *Rhizobium* et *Sesbania rostrata*,
légumineuse à nodules caulinaires.

Bernard DREYFUS (1982)

La légumineuse tropicale *Sesbania rostrata* possède à la fois des nodules racinaires et des nodules caulinaires fixateurs d'azote. L'infection de la tige de *S. rostrata* par les *Rhizobium* spécifiques a lieu au niveau de sites de nodulation prédéterminés et débute par une invasion intercellulaire des *Rhizobium* suivie du développement de cordons d'infection. La fixation d'azote par *S. rostrata* peut atteindre 200 kg d'azote fixé par hectare en 50 jours. La nodulation caulaire et la fixation d'azote ne sont pas inhibées par l'azote combiné du sol. La souche de *Rhizobium* de tige ORS571 est la seule souche de *Rhizobium* actuellement connue capable de croître aux dépens de l'azote moléculaire. Cette propriété a permis de développer une analyse génétique de la fixation d'azote de la souche ORS571 par isolement de mutants *Nif*⁻.

Mots-clés: Fixation d'azote/*Rhizobium*/*Sesbania rostrata*/nodules de tige/
gènes *nif*.

Au terme de ce travail réalisé en grande partie au Laboratoire de Microbiologie des Sols de l'ORSTOM à Dakar, j'exprime ma reconnaissance à tous ceux sans le concours desquels il n'aurait pu être mené à bien. Je tiens tout d'abord à remercier particulièrement Monsieur Y. DOMMERGUES, Directeur de Recherche au CNRS, qui dirige à Dakar l'équipe de recherche de l'ORSTOM sur la fixation de l'azote. Par ses conseils compétents et enthousiastes, il n'a cessé de m'encourager et de me soutenir dans cette entreprise.

Que Claudine ELMERICH, Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, soit particulièrement remerciée pour tout le temps qu'elle a consacré à lire et à améliorer les différents manuscrits que je lui ai soumis. J'ai toujours trouvé auprès d'elle et du Professeur J.P. AUBERT le meilleur accueil dans leur laboratoire de l'Institut Pasteur où ils m'ont fait bénéficier de leur grande expérience en génétique bactérienne.

Je n'oublie pas ceux qui ont permis à mes travaux d'aboutir en m'apportant leur précieuse collaboration : le Professeur E.L. SCHMIDT et B. TSIEN de l'Université du Minnesota, E. DUHOUX du Département de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences de Dakar, J.L. GARCIA et G. RINALDO, microbiologistes à l'ORSTOM ainsi que M. TOURE, Directeur de la Recherche Agronomique au Sénégal.

Les nombreux contacts que j'ai eus avec les laboratoires étrangers n'auraient pas été possibles sans le concours initial du Docteur A.H. GIBSON du CSIRO de Canberra, qui m'a en outre fait profiter de ses immenses connaissances en rhizobiologie.

Mes remerciements vont également à tous les membres de l'équipe du Laboratoire de Dakar qui m'ont aidé et m'ont honoré de leur amitié. Qu'ils me pardonnent si je ne puis les citer tous ici. Le concours de Marc BOUREAU, Claudine FRANCHE, Daniel GAUTHIER, Philippe de LAJUDIE, Lassana FALL et M. DIAWARA m'a été précieux.

Merci également à Mireille FERRAND qui a accepté de réaliser la dactylographie de cette thèse ainsi qu'à M. QUINET, du Service de Documentation de l'ORSTOM.

Je ne saurais oublier la Direction de l'ORSTOM et les autorités scientifiques Sénégalaises qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Je remercie enfin Messieurs Jean TAVLITZKI, Professeur à l'Université Paris VII, Jean DENARIE, Maître de Recherche à l'INRA et Jean RIGAUD, Professeur à la Faculté des Sciences de Nice, qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse.



S O M M A I R E

	Page
RÉSUMÉ.....	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	4
<u>CHAPITRE I</u> : LA DOUBLE NODULATION RACINAIRE ET CAULINAIRE CHEZ <u>SESBANIA ROSTRATA</u>	18
1.- INTRODUCTION.....	19
2.- MATERIEL ET METHODES.....	20
2.1.- Souches bactériennes.....	20
2.2.- Isolement de souches de <u>Rhizobium</u>	20
2.3.- Milieux de culture pour <u>Rhizobium</u>	21
2.4.- Culture de la plante-hôte.....	21
2.4.1.- Stérilisation et germination des graines...	21
2.4.2.- Milieux de culture des plantes.....	22
2.4.3.- Dispositifs de culture des plantes.....	
2.5.- Inoculation des plantes par les souches de <u>Rhizobium</u>	23
2.5.1.- Inoculation des racines.....	23
2.5.2.- Inoculation des tiges de <u>Sesbania rostrata</u> ..	23
2.6.- Evaluation de la fixation symbiotique (effectivité).....	24
3.- RESULTATS.....	25
3.1.- La nodulation spontanée des tiges et des racines.....	25
3.1.1.- Les nodules de racines.....	25
3.1.2.- Les nodules de tige.....	25
3.2.- Isolement des souches de <u>Rhizobium</u>	26
3.2.1.- Isolement de souches à partir de nodules de racines.....	26
3.2.2.- Isolement à partir des nodules de tige : la souche ORS571.....	27

3.3.- La spécificité des <u>Rhizobium</u> de tige et de racines de <u>Sesbania rostrata</u>	27
3.3.1.- La nodulation des racines de <u>Sesbania rostrata</u>	27
3.3.2.- La spécificité d'hôte (spectre d'hôte).....	28
3.3.3.- La nodulation de la tige. La spécificité tige-racines.....	29
4.- DISCUSSION ET CONCLUSION.....	30
 <u>CHAPITRE II</u> : ETUDE STRUCTURALE DE L'INFECTION DES TIGES	32
1- INTRODUCTION.....	33
2.- MATERIEL ET METHODES.....	36
2.1.- Culture des plantes et prélèvement des échantillons.....	36
2.2.- Etude au microscope photonique.....	36
2.3.- Etude au microscope électronique.....	37
3.- RESULTATS.....	38
3.1.- Les sites de nodulation de la tige.....	38
3.2.- Infection des tiges de <u>Sesbania rostrata</u> par les <u>Rhizobium</u>	39
3.2.1.- Invasion intercellulaire des <u>Rhizobium</u>	39
3.2.2.- Les cordons d'infection.....	40
3.2.3.- Invasion intracellulaire des <u>Rhizobium</u>	41
3.3.- Le développement du nodule.....	42
3.4.- Le nodule mature.....	42
4.- DISCUSSION ET CONCLUSION.....	44
4.1.- Les sites de nodulation de la tige.....	44
4.2.- Les trois stades d'infection de la tige de <u>Sesbania rostrata</u> et le développement du nodule.....	45
4.3.- Le nodule mature.....	47

/..

<u>CHAPITRE III : LA FIXATION D'AZOTE PAR LA SYMBIOSE</u>	
<u>RHIZOBIUM - <u>SESBANIA ROSTRATA</u></u>	48
1.- INTRODUCTION.....	49
2.- MATERIEL ET METHODES.....	51
2.1.- Souches bactériennes.....	51
2.2.- Milieux de culture pour la plante.....	51
2.3.- Méthode de culture des plantes.....	51
2.3.1.- Culture en tubes.....	51
2.3.2.- Culture en cylindres (Legg et Sloger, 1975)...	51
2.3.3.- Culture en microparcelles et au champ en vue de l'utilisation de <u>Sesbania rostrata</u> comme engrais vert.....	51
2.4.- Mesure de l'activité fixatrice d'azote sur les plantes.....	53
2.5.- Méthodes d'évaluation de la fixation d'azote par la plante entière.....	54
2.6.- Analyse d'azote dans les sols.....	55
3.- RESULTATS.....	56
3.1.- La fixation d'azote par <u>Sesbania rostrata</u>	56
3.1.1.- Mesure de l'activité fixatrice d'azote sur la plante entière.....	56
3.1.2.- Mesure de la quantité d'azote fixé par les nodules de tige.....	56
3.2.- Influence de l'azote combiné sur la nodulation caulinaire de <u>Sesbania rostrata</u>	57
3.2.1.- Effet de l'azote combiné NH_4NO_3 , 3 mM sur de jeunes plantes de <u>Sesbania rostrata</u> cultivées en tubes.....	57
3.2.2.- Effet de l'azote combiné sur la nodulation des plantes adultes.....	58
3.3.- Intérêt agronomique de <u>Sesbania rostrata</u>	59
4.- DISCUSSION ET CONCLUSION.....	61

./.

<u>CHAPITRE IV</u> : ETUDE TAXONOMIQUE DES <u>RHIZOBIUM</u> DE TIGE DE <u>SESBANIA ROSTRATA</u>	63
1.- INTRODUCTION.....	64
2.- MATERIEL ET METHODES.....	66
2.1.- Souches de <u>Rhizobium</u>	66
2.2.- Milieux de culture et inoculation.....	66
2.3.- Etude morphologique.....	67
2.4.- Etude de la croissance.....	67
2.5.- Tests physiologiques et nutritionnels.....	68
2.6.- Analyse numérique.....	68
2.7.- Composition en bases de l'ADN (GC %).....	68
2.8.- Comparaison des souches de tiges par immunofluorescence.....	69
3.- RESULTATS.....	70
3.1.- Analyse numérique.....	70
3.2.- Principaux caractères discriminants des <u>Rhizobium</u> de tige par rapport aux autres <u>Rhizobium</u>	71
3.2.1.- Nodulation des plantes-hôtes.....	71
3.2.2.- Caractères morphologiques.....	71
3.2.3.- Caractères physiologiques et biochimiques.....	72
3.2.4.- Caractères nutritionnels.....	73
3.3.- Composition en guanine plus cytosine de l'ADN (GC %).....	73
3.4.- Comparaison des souches de <u>Rhizobium</u> de tige par immunofluorescence.....	74
4.- DISCUSSION ET CONCLUSION.....	75

/..

<u>CHAPITRE V</u> : PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES ET ANALYSE	
GENETIQUE DE LA SOUCHE DE <u>RHIZOBIUM</u> DE	
TIGE : ORS571..... 77	
1.- INTRODUCTION.....	78
2.- MATERIEL ET METHODES.....	81
2.1.- Souches bactériennes et plasmides.....	81
2.2.- Milieux de culture.....	81
2.2.1.- Milieu complet YL.....	82
2.2.2.- Milieu synthétique LN.....	82
2.2.3.- Milieu pour la fixation d'azote LO.....	82
2.2.4.- Milieu YM.....	82
2.3.- Méthodes de culture de la souche ORS571.....	82
2.4.- Dosage de l'activité nitrogénase.....	83
2.4.1.- Mesures de l'activité nitrogénase en conditions de dérépression.....	84
2.4.2.- Mesures de l'activité nitrogénase en conditions de croissance.....	84
2.5.- Préparation des extraits bruts.....	85
2.6.- Isolement de mutants Nif ⁻ de la souche ORS571.....	86
2.7.- Extraction de l'ADN total.....	86
2.8.- Electrophorèse en gel d'agarose.....	87
2.9.- Mise en évidence de plasmides.....	87
2.10.- Hydrolyse par les enzymes de restriction.....	87
2.11.- Technique d'hybridation.....	88
2.11.1.- Transfert de l'ADN sur filtre de nitrocellulose.....	88
2.11.2.- Marquage des sondes d'ADN au ³² P par déplacement de coupure selon la technique de Rigby et coll. (1977).....	88
2.11.3.- Hybridation.....	89
2.12.- Isolement de phages.....	89
3.- RESULTATS.....	90
3.1.- Définition d'un milieu de croissance minimum.....	90
3.1.1.- Vitesse de croissance de la souche ORS571.....	91
3.1.2.- Etude de la résistance aux antibiotiques.....	91

./.

/..

3.2.- Etude de la fixation d'azote en culture libre.....	92
3.2.1.- Etude de l'activité nitrogénase en fonction de la tension d'oxygène.....	92
3.2.2.- Croissance de la souche ORS571 aux dépens de l'azote moléculaire.....	92
3.2.3.- Effet de la température sur l'activité nitrogénase.....	93
3.2.4.- Répression de la nitrogénase par les sources azotées.....	94
3.2.5.- Comparaison des propriétés de croissance et de fixation d'azote entre la souche ORS571 et les autres souches de <u>Rhizobium</u> étudiées..	94
3.3.- Recherche de mutants Nif ⁻ de la souche ORS571..	95
3.3.1.- Isolement de mutants Nif ⁻ sur boîte de Pétri.	95
3.3.2.- Analyse phénotypique des mutants Nif ⁻ sur la plante.....	96
3.4.- Homologie de l'ADN total de la souche ORS571 avec l'ADN <u>nif</u> de <u>Klebsiella pneumoniae</u>	97
3.5.- Analyse génétique des mutants Nif ⁻	98
3.6.- Recherche d'autres moyens d'analyse génétique de la souche ORS571.....	99
3.6.1.- Etudes préliminaires sur un phage de la souche ORS571.....	99
3.6.2.- Mise en évidence de plasmides.....	99
4.- DISCUSSION ET CONCLUSION.....	100
<u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	103
1.- RECHERCHES APPLIQUEES.....	105
2.- RECHERCHES FONDAMENTALES.....	106
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	110



R E S U M E

Cette étude a porté sur les différents aspects de la symbiose fixatrice d'azote entre les *Rhizobium* et la légumineuse tropicale *Sesbania rostrata* qui possède à la fois des nodules racinaires et des nodules caulinaires.

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

L'étude de l'infection de la tige par les *Rhizobium* spécifiques a mis en évidence un processus d'infection unique parmi les légumineuses connues. L'infection de la tige de *S. rostrata* se fait uniquement à l'emplacement des sites prédéterminés, appelés sites de nodulation, et qui correspondent à des ébauches racinaires. Dans un premier stade, les *Rhizobium* se multiplient dans les espaces intercellulaires des cellules de la base de l'ébauche racinaire. Ultérieurement, des cordons d'infection se développent et libèrent les *Rhizobium* dans les cellules de la plante-hôte où ils sont inclus à l'intérieur de membranes d'origine végétale, appelées membranes-enveloppes.

L'étude de la fixation d'azote par la symbiose a d'autre part, montré que *S. rostrata* qui présente une nodulation de tige très abondante (jusqu'à 40 g de nodules par plante), peut fixer l'équivalent de 200 à 250 kg d'azote/ha en 50 jours. Cette aptitude à fixer de grandes quantités d'azote a permis d'utiliser *S. rostrata* comme engrais vert en agriculture, et de faire ainsi passer, au champ, les rendements en riz de 1,5 t/ha à 4,5 t/ha.

Nous avons montré que, sur la tige de *S. rostrata*, la nodulation et la fixation d'azote ne sont pas inhibées par l'azote combiné du sol, même lorsqu'il est apporté à des doses très élevées (200 kg d'azote/ha). Cette propriété fait de *S. rostrata*, la seule légumineuse actuellement connue, capable d'utiliser simultanément l'azote de l'air et l'azote du sol.

L'étude taxonomique des *Rhizobium* de tige a montré qu'ils constituaient un groupe distinct à la fois des *Rhizobium* à croissance rapide et des *Rhizobium* à croissance lente et qu'ils étaient plus proches des *Rhizobium* à croissance lente que des *Rhizobium* qui nodulent les racines de *S. rostrata*. Les *Rhizobium* de tige de *S. rostrata* constituent sans doute une nouvelle espèce de *Rhizobium*.

L'étude physiologique a permis de montrer que la souche de *Rhizobium* de tige ORS571 est capable de croître en culture libre aux dépens de l'azote moléculaire comme seule source d'azote. Cette propriété, unique parmi tous les *Rhizobium* connus, a rendu possible l'obtention des mutants Nif⁻ de la souche ORS571 en utilisant les méthodes de la génétique classique. D'autre part, des extraits bruts présentant une activité nitrogénase ont été obtenus.

Les résultats d'hybridation entre l'ADN total de la souche ORS571 et des sondes *nif* de *Klebsiella pneumoniae* ont permis de cloner un fragment *Bam*HI de 13 kb qui hybride avec la sonde *nifHDK* de *K. pneumoniae*. Il a ainsi été possible de réaliser une étude génétique par construction de diploïdes partiels. Un des mutants *Nif*⁻ a été caractérisé à la fois par complémentation génétique et biochimique. Les résultats suggèrent que ce mutant possède une mutation dans un des gènes de structure de la nitrogénase.



INTRODUCTION GENERALE

✕✕

La fixation biologique de l'azote, c'est-à-dire la réduction enzymatique de l'azote moléculaire (N_2) en ammoniacque est à l'origine de la plus grande partie de l'azote combiné produit dans la nature (Dalton et Mortensen, 1972). L'azote combiné étant la seule forme d'azote biologiquement assimilable par les plantes et les animaux, la fixation biologique de l'azote joue donc un rôle essentiel dans le cycle de l'azote et dans l'écosystème tout entier.

Seul un groupe limité de procaryotes est capable de fixer l'azote. On connaît ainsi au moins une centaine d'espèces bactériennes appartenant à des genres très divers incluant les *Azotobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Rhodospirillaceae*, *Bacillaceae*, *Rhizobiaceae* et *Actinomycetaceae*, ainsi que de nombreuses cyanobactéries qui fixent l'azote (Burns et Hardy, 1975). Bien que tous ces microorganismes fixent l'azote dans des conditions physiologiques très variées, il est important de souligner qu'ils possèdent en commun un complexe enzymatique, appelé complexe nitrogénase, responsable de la réduction de l'azote moléculaire en ammoniacque. Ce complexe enzymatique est constitué de deux protéines dont les propriétés physico-chimiques sont constantes d'un genre ou d'une espèce à l'autre (Eady, 1980). La protéine I, appelée aussi molybdoferrédoxine ou MoFe protéine, est un tétramère formé de deux types de sous-unités différents. Elle contient du fer non hématique, du soufre labile et du molybdène.

et son rôle est la réduction du substrat. La protéine II, appelée aussi azoferrédoxine ou Fe protéine, est un dimère formé d'un seul type de sous-unité. Elle contient du fer non hémétique et du soufre labile et son rôle est le transfert des électrons à la MoFe protéine et la liaison Mg-ATP. Ces deux protéines sont inactives séparément et il est possible de reconstituer un complexe actif *in vitro* en mélangeant la protéine I d'une espèce avec la protéine II de la même ou d'une autre espèce (Garcia et coll., 1977; Emerich et Burris, 1978). Le fonctionnement de la nitrogénase nécessite non seulement la présence de sources d'électrons et de protons qui dépendent du métabolisme particulier des diazotrophes (Beneman et Valentine, 1972) mais aussi d'une grande quantité d'énergie sous forme d'ATP (Shanmugam et coll., 1978).

On peut classer les organismes fixateurs d'azote en deux grands groupes suivant leur relation avec les plantes :

- le groupe des fixateurs libres, non associés aux plantes, comprend des espèces telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter vinelandii*, *Clostridium pasteurianum* et de nombreuses cyanobactéries ;
- le groupe des bactéries symbiotiques qui ne fixent l'azote qu'en association avec les plantes. C'est le cas des *Rhizobium* pour les légumineuses, des *Frankia* pour les non-légumineuses et de quelques espèces de cyanophycées qui couplent ainsi la photosynthèse productrice d'ATP à la fixation d'azote.

Chez toutes ces espèces, la fixation d'azote est réprimée en présence de différentes sources d'azote combiné. D'autre part, toutes les nitrogénases purifiées connues sont dénaturées par de très faibles taux d'oxygène. Les organismes aérobies qui fixent l'azote atmosphérique

ont donc développé des mécanismes physiologiques élaborés pour maintenir les conditions nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase. Par exemple, chez certaines cyanophycées filamenteuses, la fixation d'azote n'a lieu que dans des cellules spécialisées appelées hétérocystes où le photosystème II producteur d'oxygène est déficient (Stewart et coll., 1969). De même, dans les nodules des légumineuses, nous verrons qu'il existe un mécanisme très élaboré de protection de la nitrogénase.

Depuis une dizaine d'années, *Klebsiella pneumoniae* est le fixateur libre le plus étudié pour les analyses biochimiques et génétiques des gènes de la fixation d'azote (*nif*) en raison de la possibilité de transposer directement les techniques de génétique utilisées chez *Escherichia coli*. Il a ainsi été possible de montrer que *K. pneumoniae* porte sur son chromosome 17 gènes contigus organisés en 7 opérons impliqués dans la fixation de l'azote (Elmerich et coll., 1978; MacNeil et coll., 1978; Merrick et coll., 1978; 1980; Kennedy et coll., 1981; Sibold, 1982). Les gènes qui codent pour les polypeptides du complexe de la nitrogénase sont *nifD* et *nifK* pour la protéine I, et *nifH* pour la protéine II. Deux gènes, *nifL* et *nifA*, groupés en un seul opéron, ont un rôle régulateur. La transcription de l'opéron *nifLA* n'a lieu qu'en absence d'ammoniaque et le produit du gène *nifA* est nécessaire pour activer tous les opérons *nif* (Sibold et coll., 1981; Drummond et coll., 1982). Le produit du gène *nifL* intervient dans la répression par l'oxygène (Hill et coll., 1981) et à un moindre degré, dans la répression par l'ammoniaque (Merrick et coll., 1982). La totalité des gènes *nif* de *K. pneumoniae* a été clonée dans des plasmides amplifiables (Pühler et coll., 1979; Cannon et coll., 1979; Riedel et coll., 1979; Gerbaud et coll., 1981).

Contrairement à *Klebsiella pneumoniae* qui fixe l'azote à l'état libre, les espèces bactériennes du genre *Rhizobium* ne fixent généralement l'azote que dans les nodosités qu'elles forment sur le système racinaire des légumineuses. La famille des *Leguminosae*, un des groupes les plus importants parmi les végétaux supérieurs, comprend trois sous-familles, les *Caesalpinaceae* (152 genres), les *Papilionaceae* (482 genres), et les *Mimosaceae* (56 genres) totalisant plus de 17 600 espèces (Hutchinson, 1964). On estime que 90% des espèces de *Papilionaceae* et *Mimosaceae* peuvent être nodulées par *Rhizobium* alors que seulement 30% des *Caesalpinaceae* le sont (Burns et Hardy, 1975). Bien que 10 à 15% seulement des légumineuses aient été examinées pour leur aptitude à noduler, on estime que la fixation d'azote par les *Rhizobium* représente près de la moitié de l'azote fixé annuellement par voie biologique (Hardy et Havelka, 1975). L'importance économique des légumineuses cultivées (soja, luzerne, arachide, etc...) explique sans aucun doute que les *Rhizobium* soient les bactéries fixatrices symbiotiques d'azote les plus étudiées, autant sur le plan fondamental qu'appliqué.

La symbiose *Rhizobium*-légumineuse qui conduit à la formation et au développement de nodules fixateurs d'azote est le résultat d'interactions complexes entre la bactérie et la plante. Normalement, chaque souche de *Rhizobium* ne peut former de nodules (souche infective) et fixer l'azote (souche effective) que sur un nombre limité d'espèces de légumineuses. Par exemple, une souche de *Rhizobium* isolée de *Trifolium pratense*odule en général les espèces du genre *Trifolium*, mais non les autres légumineuses. Cette spécificité d'hôte basée sur la nodulation d'un groupe de légumineuses, appelé groupe d'inoculation croisée, a conduit à la définition de plusieurs des espèces de *Rhizobium*.

D'autre part, des études systématiques fondées sur la taxonomie numérique (t'Mannetje, 1967) et l'hybridation d'ADN (Gibbins et Gregory, 1972) ont permis de distinguer parmi les espèces définies par leur spécificité d'infection, deux grands groupes de *Rhizobium* caractérisés par leur taux de croissance en culture :

- les *Rhizobium* à croissance rapide, qui correspondent généralement aux espèces qui infectent les légumineuses des pays tempérés : il s'agit de *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium leguminosarum* et *Rhizobium phaseoli* proches génétiquement (Johnston et Beringer, 1977) et de *Rhizobium meliloti* qui constitue un groupe à part;
- les *Rhizobium* à croissance lente, qui correspondent aux espèces suivantes : *Rhizobium japonicum*, *Rhizobium lupini* et les *Rhizobium* du groupe *Vigna* qui sont appelés par les anglo-saxons *Rhizobium* "cowpea" et qui nodulent la grande majorité des légumineuses tropicales.

Il existe aussi des *Rhizobium* tropicaux à croissance rapide, en particulier ceux qui nodulent les genres *Leucaena*, *Acacia* et *Sesbania* (Trinick, 1980; Dreyfus et Dommergues, 1981).

La spécificité de la symbiose entre les *Rhizobium* et leur plante-hôte, très importante sur le plan agronomique puisqu'aucune légumineuse ne peut fixer l'azote sans la présence des *Rhizobium* spécifiques, intervient probablement au cours des différentes étapes successives de l'infection qui conduisent à la formation de nodules fixateurs d'azote. Vincent (1980) définit les huit étapes suivantes dans le processus de nodulation de la plupart des légumineuses tempérées :

- (1) prolifération des *Rhizobium* dans la rhizosphère;
- (2) courbure des poils absorbants;
- (3) formation et progression des cordons d'infection;

(4) différenciation de certaines cellules corticales et initiation du méristème nodulaire; (5) libération des bactéries hors des cordons d'infection; (6) multiplication des bactéries dans le cytoplasme des cellules de l'hôte; (7) différenciation des bactéries en bactéroïdes; (8) établissement d'un nodule capable de fixer et d'assimiler l'azote.

On sait que les différentes espèces de *Rhizobium* peuvent proliférer dans la rhizosphère de nombreuses légumineuses (Dart, 1977); en revanche, l'attachement des bactéries au poil absorbant semble une étape très spécifique de la reconnaissance plante-bactéries faisant intervenir une glycoprotéine de l'hôte, une lectine. En effet, des lectines préparées à partir de graines ou de racines de soja se fixent sur la plupart des souches de *Rhizobium japonicum* mais non sur d'autres espèces de *Rhizobium* (Bohlool et Schmidt, 1974). De même, Dazzo et coll. (1981) ont montré qu'une lectine de trèfle s'attachait à des récepteurs semblables sur la plante et la bactérie. Les exopolysaccharides bactériens pourraient jouer un rôle dans l'attachement des cellules à la paroi (Napoli et Albersheim, 1980); cependant Sanders et coll. (1981) ne trouvèrent aucune corrélation entre la production d'exopolysaccharides et l'aptitude à noduler.

Après l'attachement des bactéries à la paroi du poil absorbant, l'extrémité de celui-ci se courbe et par invagination de la paroi, il se forme, dans la plupart des cas, un cordon d'infection contenant les bactéries (Dart, 1977). Les bactéries se multiplient à l'intérieur du cordon d'infection qui progresse vers les cellules du cortex racinaire. Les bactéries en division dans le cordon d'infection semblent produire une matrice mucopolysaccharidique qui les entoure (Sanders et coll., 1977) ainsi que des microfibrilles de cellulose qui pourraient servir à la

synthèse de la paroi du cordon. La présence des cordons d'infection provoque une différenciation à distance des cellules corticales internes, qui s'organisent alors en méristème avant même d'être envahies par les cordons d'infection (Truchet, 1978). Les cordons d'infection qui se divisent en de nombreuses branches pénètrent alors dans ce tissu méristématique nouvellement formé. Par dissolution de la paroi du cordon d'infection, les bactéries sont alors libérées dans le cytoplasme des cellules méristématiques qu'elles envahissent complètement (Verma et Zogbi, 1978). A l'intérieur du cytoplasme, les bactéries sont incluses dans une membrane d'origine végétale appelée membrane enveloppe (Tu, 1975). Chez les *Rhizobium* tempérés à croissance rapide, la taille des bactéries augmente alors jusqu'à 40 fois pour *Rhizobium leguminosarum* ou *Rhizobium trifolii* et des formes en X ou Y apparaissent (Dart, 1975), leur contenu en ADN augmente (Bisseling et coll., 1977) et ils ne se divisent pas (van den Bos et Broughton, 1981). En raison de cette différence marquée avec les *Rhizobium* en culture libre, les formes symbiotiques incluses dans la membrane enveloppe sont appelées bactéroïdes. Par contre, chez les *Rhizobium* à croissance lente comme *Rhizobium japonicum* et les *Rhizobium* du groupe *vigna*, les bactéries vont poursuivre leurs divisions à l'intérieur de la membrane enveloppe et on observe, par exemple chez le soja, plusieurs bactéries incluses par membrane enveloppe; dans ce cas, on utilise aussi le terme bactéroïdes, bien que ceux-ci conservent une forme de bâtonnet et un volume réduit et ne se distinguent pas morphologiquement des formes libres. Il existe d'ailleurs chez quelques légumineuses tropicales un deuxième type d'infection caractérisé par l'absence de cordons d'infection (Chandler, 1978).

C'est au stade d'inclusion des bactéroïdes dans la membrane enveloppe que commence la fixation d'azote et que l'ammoniaque produit est assimilé par la plante. Parallèlement à l'expression des gènes de la fixation d'azote, un certain nombre de gènes de la plante-hôte, impliqués dans la symbiose, s'expriment dans les nodules en formation (Legocki et Verma, 1980; Verma et coll., 1981). Il s'agit essentiellement du complexe d'hémoprotéines, appelé légghémoglobine, très spécifique des nodules des légumineuses (Appleby, 1974). La légghémoglobine, qui colore en rouge les nodules, constitue 20 à 30% des protéines cellulaires du nodule (Verma et Bal, 1976). La partie protéique de la légghémoglobine est synthétisée par la plante et récemment 7 gènes de la légghémoglobine ont été localisés sur un fragment de 75 kb de l'ADN d'un chromosome de soja (Marcker, 1982). Par contre, l'hème du pigment est synthétisé par le *Rhizobium* (Avissar et Nadler, 1978). La légghémoglobine, par sa grande affinité avec l'oxygène, permet un flux élevé d'oxygène vers les bactéroïdes, organismes aérobies, à une faible pression, condition indispensable au bon fonctionnement de la nitrogénase (Bergersen, 1978). La présence de légghémoglobine dans le nodule semble indispensable au fonctionnement de la nitrogénase, sauf dans le cas de la non-légumineuse *Parasponia* où, jusqu'à présent, aucune légghémoglobine n'a été trouvée.

D'autres protéines spécifiques des nodules, appelées nodulines, ont été mises en évidence récemment (Legocki et Verma, 1980). Il semble que ces nodulines, dont les fonctions restent inconnues, apparaissent aussi avant l'expression de la nitrogénase dans les bactéroïdes et parallèlement à la légghémoglobine (Verma et coll., 1981).

Chez les *Rhizobium*, l'étude génétique de la fixation de l'azote est difficile, car les bactéries ne fixent en général l'azote qu'en symbiose avec la plante. C'est pourquoi toute analyse de mutant affecté dans un gène *nif* nécessite au préalable l'inoculation de la plante-hôte, et il n'existe jusqu'à présent aucun moyen direct d'isoler des mutants Nif^- sur boîte de Pétri en utilisant les méthodes classiques de la génétique bactérienne. Quelques souches de *Rhizobium* à croissance lente (*Rhizobium japonicum* et *Rhizobium* "cowpea") présentent, dans certaines conditions microaérobies, une activité nitrogénase en culture pure (Pagan et coll., 1975; Kurz et La Rue, 1975; McComb et coll., 1975). Cependant, ces souches ne peuvent croître aux dépens de l'azote moléculaire et une source d'azote combiné doit être rajoutée au milieu de culture, rendant ainsi impossible la sélection directe des mutants Nif^- sur boîte de Pétri. Pour ces raisons, la similitude entre les nitrogénases des différentes espèces fixatrices d'azote a été utilisée pour rechercher une homologie au niveau des gènes de structure de la nitrogénase. C'est ainsi que Ruvkun et Ausubel (1980) ont montré de l'hybridation positive entre l'ADN total de 13 souches fixatrices d'azote dont *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium trifolii* et *Rhizobium phaseoli*, et la sonde plasmidique pSA30 (Cannon et coll., 1979), porteuse des gènes *nifHDK* de *Klebsiella pneumoniae*, qui sont les gènes de structure du complexe nitrogénase. Les gènes *nif* de la nitrogénase de *R. meliloti* ont ainsi été clonés (plasmide pRMR1, (Ruvkun et Ausubel, 1981)). Par la suite, plusieurs groupes ont cloné les gènes de structure du complexe nitrogénase de *R. meliloti* (Ditta et coll., 1980; Banfalvi et coll., 1981; Corbin et coll., 1982), *R. leguminosarum* (Johnston et coll., 1982) et *R. japonicum* (Hennecke, 1981). Il ressort de ces études que les gènes

nifH, *nifD* et *nifK* sont présents chez *R. meliloti* et *R. leguminosarum* où ils forment un seul opéron transcrit dans cet ordre, c'est-à-dire dans le même sens que chez *K. pneumoniae* (Ausubel et coll., 1982; Krol et coll., 1982). Par contre, chez *R. japonicum* *nifH* est séparé de *nifDK* (Hennecke et coll., 1982).

En ce qui concerne la régulation de l'expression des gènes *nif*, la première indication de la présence d'un gène équivalent au gène *nif* de *K. pneumoniae* a été donnée par Kennedy et coll. (1981) : les souches de *Rhizobium* "cowpea", CB756 et 32HI, produisent un composé coloré en présence de 6-cyanopurine, cette coloration étant spécifiquement associée à la présence du gène *nifA* chez *K. pneumoniae* (MacNeil et Brill, 1978). Très récemment, Johnston et coll. (1982) ont montré, directement par hybridation avec un plasmide (pMC71a) qui porte les gènes *nifA* et partiellement *nifL*, que *nifA* était présent chez *R. leguminosarum*. Parallèlement à ces études d'hybridation et de clonage des gènes *nif* de *Rhizobium*, on a cherché à localiser ces gènes. Après la découverte de plasmides de haut poids moléculaire chez *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. japonicum* et *Rhizobium* sp. (Nutti et coll., 1977), ainsi que chez *R. meliloti* (Casse et coll., 1978), Nutti et coll. (1979) montrèrent, par hybridation avec la sonde pSA30, qu'une partie des gènes *nif* était située sur un grand plasmide de *R. leguminosarum*. Les mêmes résultats ont été obtenus chez *R. meliloti* (Rosenberg et coll., 1980), *R. trifolii* et *R. phaseoli* (Prakash et coll., 1981). D'autre part, Johnston et coll. (1978) montrèrent par conjugaison entre *R. trifolii* et *R. leguminosarum* que des gènes contrôlant la symbiose étaient portés par un grand plasmide. Ces résultats furent confirmés par Hooykaas et coll. (1981) : le transfert d'un grand plasmide de *Rhizobium trifolii* à *Rhizobium leguminosarum* et *Agrobacterium tumefaciens* rend les transconjugants

capables de noduler *Trifolium* (nodulation ineffective pour *A. tumefaciens*). De plus, un mutant Fix^- (c'est-à-dire incapable de fixer l'azote dans les nodules de la plante) affecté dans les gènes de structure de la nitrogénase, redevient Fix^+ après transfert du plasmide de *R. trifolii*, montrant ainsi que ce grand plasmide porte à la fois des gènes impliqués dans la nodulation et la fixation d'azote. De même, chez *R. meliloti*, un mégaplasmide de masse moléculaire supérieure à 300×10^6 d porte des gènes essentiels pour la nodulation (*nod*) et la fixation d'azote (*nif*) (Rosenberg et coll., 1981; Banflavi et coll., 1981). Ce type de plasmide, appelé pSym, a été retrouvé chez *R. leguminosarum* (Johnston et coll., 1982), *R. trifolii* et *R. "parasponia"* (Rolfe et coll., 1982). Il est très intéressant de noter que les gènes *nod* sont groupés avec les gènes *nif* sur ces plasmides pSym : un morceau d'ADN de 20 kb sépare *nod* de *nif* chez *R. meliloti* (Ausubel, communication personnelle) et chez *R. leguminosarum*, les gènes *nod* sont séparés de *nifA* de 6 kb, étant lui-même séparé de *nifHDK* de 13 kb (Johnston, communication personnelle).

Chez les légumineuses, la nodulation de la tige par les *Rhizobium*, ou nodulation caulinaire, reste exceptionnelle et aucune étude expérimentale sur ce sujet n'avait jusqu'ici été menée. Seules trois espèces appartenant à deux genres différents étaient connues pour leur nodulation caulinaire : *Neptunia oleracea* (Schaede, 1940), *Aeschynomene indica* (Arora, 1954; Yatazawa et Yoshida, 1979) et *Aeschynomene paniculata* (Suessenguth et Beyerle, 1936). *Neptunia oleracea* est une plante aquatique dont la tige flottante porte des racines; les nodules apparaissent à la base de ces racines. *Aeschynomene indica* présente

sur sa tige au niveau des lenticelles des renflements qui correspondent aux nodules fixateurs d'azote. D'autre part, sur certaines plantes, dont *Vicia faba* (Fyson et Sprent, 1980) et *Arachis hypogaea* (Dart, communication personnelle), il est possible d'obtenir des nodules au niveau de l'épicotyle, mais il ne s'agit pas là de véritables nodules de tige.

Les données sur la nodulation de tige, tant en ce qui concerne les *Rhizobium* que la plante-hôte, étant pratiquement inexistantes, l'objet de mon travail a consisté à étudier la nodulation caulinaire chez *Sesbania rostrata* que j'ai découverte dans le nord Sénégal.

Sesbania rostrata (Brem.) (Berhaut, 1976) est une légumineuse annuelle qui pousse durant la saison des pluies dans les sols inondés du Sahel, du Sénégal à l'Ethiopie. On la trouve aussi dans la même zone climatique de l'hémisphère sud, de l'Angola au Mozambique et à Madagascar. Au nord du Sénégal, elle forme des peuplements denses sur le pourtour du lac de Guiers, dans la vallée du fleuve Sénégal et même dans les mares temporaires du Ferlo; cette dernière région reçoit moins de 300 mm de pluies par an. La hauteur maximum de *S. rostrata* est atteinte en trois mois; elle varie le plus souvent entre 2 et 4 m mais peut atteindre 5 m (figure 1). Sa vitesse de croissance très grande (3 cm par jour), sa floraison (autogame et photodépendante) précoce lui permettent de fructifier à la fin de la courte saison des pluies de ces régions sahéliennes (2 à 3 mois). Bien que *S. rostrata* puisse pousser en terrain exondé mais humide, elle préfère les zones de bas-fonds inondés sous 10 à 15 cm d'eau.

Comme toutes les espèces connues du genre *Sesbania*, *S. rostrata* possède des nodules racinaires. Cependant, la caractéristique remarquable et unique de cette espèce de *Sesbania* est la présence de nodules de tige (figure 1). Ces nodules avaient jusqu'à présent été ignorés en tant que tels par les botanistes et systématiciens des plantes qui avaient fait de la présence sur la tige de "glandes" ou de "verrues" une des caractéristiques de l'espèce. Il est cependant remarquable de noter que vers 1890 le grand botaniste français H. Perrier de la Bathie prélevant *S. rostrata* dans les environs de Majunga à Madagascar, notait déjà : "plante remarquable par l'abondance des tubérisations (caduques) de ses racines et de la base des tiges. Cette plante serait probablement intéressante comme légumineuse améliorante." (Herbier du Muséum d'Histoire Naturelle, Paris, N° 13003).

L'objet de mon travail a donc été l'étude des différents aspects de la symbiose *Sesbania rostrata* - *Rhizobium* au niveau des nodules de tige et de leurs *Rhizobium* spécifiques.

Dans un premier temps, l'étude de la double nodulation caulinaire et racinaire ainsi que l'étude structurale de l'infection des tiges ont été effectuées.

L'étude de la fixation d'azote par *S. rostrata* a ensuite permis de déterminer les propriétés uniques de la nodulation de tige et d'envisager, grâce au potentiel fixateur d'azote très élevé de cette symbiose, des applications agronomiques possibles.

Dans un second temps, les études des *Rhizobium* de tige en culture libre ont été menées. Des études taxonomiques, physiologiques et génétiques ont montré que les *Rhizobium* de tige de *S. rostrata* avaient des propriétés différentes des autres *Rhizobium* connus, ouvrant ainsi la voie à une analyse génétique classique de la fixation d'azote par les *Rhizobium*.



FIGURE 1 : *Sesbania rostrata* âgée de 3 mois avec ses nodules caulinares.

CHAPITRE I

LA DOUBLE NODULATION RACINAIRE ET CAULINAIRE CHEZ *SESBANIA ROSTRATA*



1.- INTRODUCTION

Bien que l'on connaisse depuis longtemps l'existence de nodules de tige chez plusieurs espèces appartenant aux genres *Aeschynomene* et *Neptunia*, aucune étude expérimentale de la nodulation caulinaire n'a encore été réalisée jusqu'à présent. Les mécanismes de formation des nodules de tige et la nature des *Rhizobium* responsables de cette nodulation atypique restent donc inconnus. C'est pourquoi dans ce premier chapitre, nous avons étudié les conditions expérimentales de la nodulation des tiges de *Sesbania rostrata* et comparé les nodulations racinaires et caulinaires de cette légumineuse. Pour cela, nous avons tout d'abord isolé des souches de *Rhizobium* à la fois à partir des nodules de tige et de racines de *S. rostrata*. Nous avons ensuite comparé les caractéristiques symbiotiques respectives de ces souches de *Rhizobium* sur la tige et les racines de *S. rostrata* ainsi que sur les racines d'autres espèces de légumineuses tropicales afin de déterminer à quel groupe d'inoculation croisée appartiennent les *Rhizobium* de tige.

2.- MATERIEL ET METHODES

2.1.- Souches bactériennes :

La liste des souches de *Rhizobium* ainsi que leur plante-hôte d'origine sont données au tableau 1. La souche de *Rhizobium* "cowpea" CB756 a été obtenue du Dr. A.H. Gibson.

2.2.- Isolement des souches de *Rhizobium* :

L'isolement des souches de *Rhizobium* se fait à partir de jeunes nodules de tige ou de racines. Chaque nodule, immédiatement après prélèvement, est stérilisé superficiellement par immersion rapide dans l'éthanol (90%) puis trempé pendant 3 mn dans une solution 0,1% d' HgCl_2 . Le nodule est rincé abondamment à l'eau distillée stérile puis broyé dans une goutte physiologique. A partir de ce broyat, on ensemence par épuisement à l'anse de platine sur milieu de croissance gélosé YM (voir paragraphe 2.3.) en boîtes de Pétri. On incube les boîtes à 30°C. Une autre méthode d'isolement plus rapide consiste à casser aseptiquement le nodule frais et à piquer avec un filament de platine sa partie centrale avant d'ensemencer le milieu gélosé. Après plusieurs purifications, les souches sont testées pour leur aptitude à former des nodules sur la plante-hôte et conservées sur gélose inclinée YM à +4°C en tubes à vis.

TABLEAU 1 : Souches de *Rhizobium*

Souche	Plante	Origine d'isolement	Source
ORS571	<i>Sesbania rostrata</i>	Nodules de tige	l'auteur
ORS51		Nodules de racines	
ORS52			
ORS53			
ORS56			
ORS57			
ORS502	<i>Sesbania pubescens</i>	Nodules du collet	l'auteur
ORS507	<i>Sesbania pachycarpa</i>	Nodules de racines	
ORS301	<i>Aeschynomene afraspera</i>	Nodules de tige	
CB756	<i>Macrotyloma africanum</i>	Nodules de racines	A.H. Gibson

2.3.- Milieux de culture pour "Rhizobium" :

Le milieu gélosé YM (Vincent, 1970) utilisé pour l'isolement et la conservation des souches a la composition suivante (pour 1 litre) : mannitol : 10 g; Na-glutamate : 0,5 g; K_2HPO_4 : 0,5 g; $MgSO_4$: 0,2 g; $NaCl_2$: 0,1 g; extrait de levure : 1 g; $FeCl_3$: 4 mg; agar : 20 g. Le pH est ajusté à 6,8 et le milieu autoclavé à 120°C pendant 20 mn. Le même milieu sans agar (milieu YEM) est utilisé pour les cultures liquides.

2.4.- Culture de la plante-hôte :

2.4.1.- Stérilisation et germination des graines :

Avant de les utiliser, les graines sont traitées ou stérilisées superficiellement par immersion dans l'acide sulfurique concentré pendant une durée déterminée par la dureté de l'enveloppe propre à chaque espèce (tableau 2). Les graines sont ensuite abondamment rincées à l'eau distillée stérile, déposées dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée à 9‰ et mises à germer à 30°C à l'obscurité et en atmosphère humide, les boîtes étant renversées afin que la radicelle ne s'enfonce pas dans l'agar. Lorsque la radicelle atteint 1 à 2 cm de long, au bout d'environ 24 h d'incubation, les jeunes plantules sont semées soit dans le sol, soit en pots, soit en tubes de gélose inclinés en conditions aseptiques.

TABEAU 2 : Durée des traitements à l'acide sulfurique pour
stérilisation et germination des graines de légumineuses

Nature des graines	Temps de stérilisation dans H ₂ SO ₄
<i>Sesbania rostrata</i>	30 mn
<i>Sesbania aculeata</i>	10 mn
<i>Sesbania cannabina</i>	30 mn
<i>Sesbania pachycarpa</i>	1 h
<i>Sesbania paludosa</i>	1 h
<i>Sesbania pubescens</i>	1 h
<i>Aeschynomene</i> sp.	30 mn
<i>Macroptilium atropurpureum</i> (Siratro)	3 mn

2.4.2.- Milieux de culture des plantes :

Le milieu de Jensen (Vincent, 1970), que nous avons appelé milieu J0, est utilisé pour les cultures en tubes des plantes et contient par litre :

K_2HPO_4 : 0,2 g; NaCl : 0,2 g; $MgSO_4$ ($7H_2O$) : 0,2 g; $CaHPO_4$: 1 g;
 $FeCl_3$ ($6H_2O$) : 0,14 g; H_3BO_3 : 2,86 mg; $MnSO_4$ ($4H_2O$) : 2,03 mg;
 $ZnSO_4$ ($7H_2O$) : 0,22 mg; $CuSO_4$ ($5H_2O$) : 0,08 mg; Na_2MoO_4 (H_2O) : 0,09 mg.
 Le pH est ajusté à 6,7. Le milieu est autoclavé 20 mn à 120°C.

Pour l'étude de la nodulation des tiges de *Sesbania rostrata* nous avons utilisé le milieu JN qui diffère du milieu J0 par l'addition d'une source d'azote : NH_4NO_3 (3 mM).

2.4.3.- Dispositifs de culture des plantes :

→ Cultures en tubes :

La technique utilisée est celle mise au point par Gibson (1963). Après germination (voir ci-dessus), chaque plantule est mise en culture sur un tube de 30 x 170 mm contenant une gélose nutritive inclinée (Jensen) et muni d'un capuchon constitué par une double feuille d'aluminium percée d'un trou. La racine est introduite dans le tube de façon à être en contact avec la gélose, la tige restant à l'air libre (figure 2). Pour éviter le dessèchement de l'enveloppe cotylédonaire et permettre aux cotylédons de se libérer spontanément de l'enveloppe de la graine, il est nécessaire de laisser les tubes en atmosphère humide pendant 24 h sous éclairage. Les plantes sont ensuite inoculées et placées en serre. Elles sont récoltées entre 4 et 5 semaines. Chaque traitement élémentaire comporte 12 répétitions.

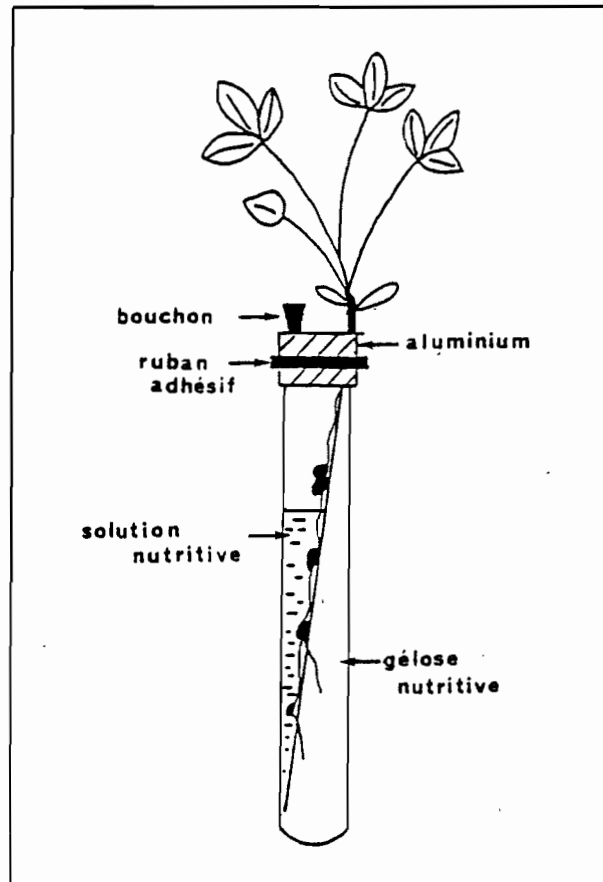


FIGURE 2 : Dispositif de culture des plantes en tube contenant une géluse nutritive inclinée.

→ *Cultures en vases de végétation :*

Chaque plantule est repiquée dans un pot contenant 2 kg de sol préalablement stérilisés 1 h à 120°C. Chaque traitement comporte 10 répétitions.

2.5.- Inoculation des plantes par les souches de *Rhizobium* :

2.5.1.- Inoculation des racines :

Les racines des plantes sont inoculées par 1 ml de culture stérile de *Rhizobium* contenant 10^8 bactéries/ml et provenant d'une culture en phase exponentielle de croissance en milieu YM. L'inoculation des tubes est faite 3 jours après la mise en place de la plantule sur le tube. Le tube est alors rempli de milieu liquide de Jensen jusqu'au bord supérieur du tube afin que toute la surface des racines soit en contact avec les *Rhizobium* en suspension dans la solution nutritive.

2.5.2.- Inoculation des tiges de *Sesbania rostrata* :

Lorsque les jeunes plantes de *S. rostrata* ont atteint une taille de 30 cm environ, leurs tiges sont inoculées par pulvérisation d'une culture pure de *Rhizobium* contenant 10^8 bactéries/ml. Le pulvérisateur utilisé est du même type que ceux utilisés pour les traitements insecticides.

2.6.- Evaluation de la fixation symbiotique (effectivité) :

Pour évaluer l'effectivité de la fixation symbiotique, nous avons déterminé les poids frais ou sec des parties aériennes des plantes; l'interprétation des résultats a été faite en utilisant le test statistique de Duncan (1955). Pour l'étude du spectre d'hôte l'effectivité des souches est exprimée en pourcentage du poids sec de la partie aérienne par rapport à la souche la plus effective (100 %) sur chacune des plantes-hôtes. Une souche effective (E) correspond à un pourcentage de 75 à 100 % et une souche ineffective (I) correspond au même pourcentage que le témoin non inoculé. (Dans le cas de *Sesbania rostrata* cultivée en tubes durant 3 semaines, le poids sec de la partie aérienne du témoin non inoculé est environ 30 % du poids sec de la plante inoculée avec la souche ORS571). Une souche peu effective (PE) correspond à un pourcentage intermédiaire.

3.- RESULTATS

3.1.- La nodulation spontanée des tiges et des racines :

3.1.1.- Les nodules de racines :

Semée dans son milieu naturel dans un sol non inondé, la jeune plante de *Sesbania rostrata* (15 jours à 1 mois) présente deux types de nodules racinaires (figure 3). Au niveau du collet et sur la base de la racine principale se trouve une couronne de gros nodules allongés à méristème terminal et souvent divisés en deux ou trois lobes. Ces nodules mesurent de 0,2 à 1,5 cm de long. Des nodules racinaires appartenant à un deuxième type apparaissent en chapelet sur les racines latérales. Ce sont des nodules sphériques, petits (1 à 2 mm de diamètre) et nombreux. Lorsque la plante pousse en terrain inondé, les gros nodules du collet disparaissent rapidement et seuls, subsistent les nodules portés par les racines latérales de surface. Ces racines peuvent flotter dans l'eau et portent de très nombreux nodules qui présentent alors un cortex vert. La masse de ces nodules (2 à 4 g) reste cependant faible par rapport à celle des nodules de tige (15 à 40 g).

3.1.2.- Les nodules de tige :

Dans la nature, on observe souvent une nodulation caulinaire spontanée sur toute la hauteur de la plante et même sur les branches latérales (figure 4). Cependant, la distribution des nodules

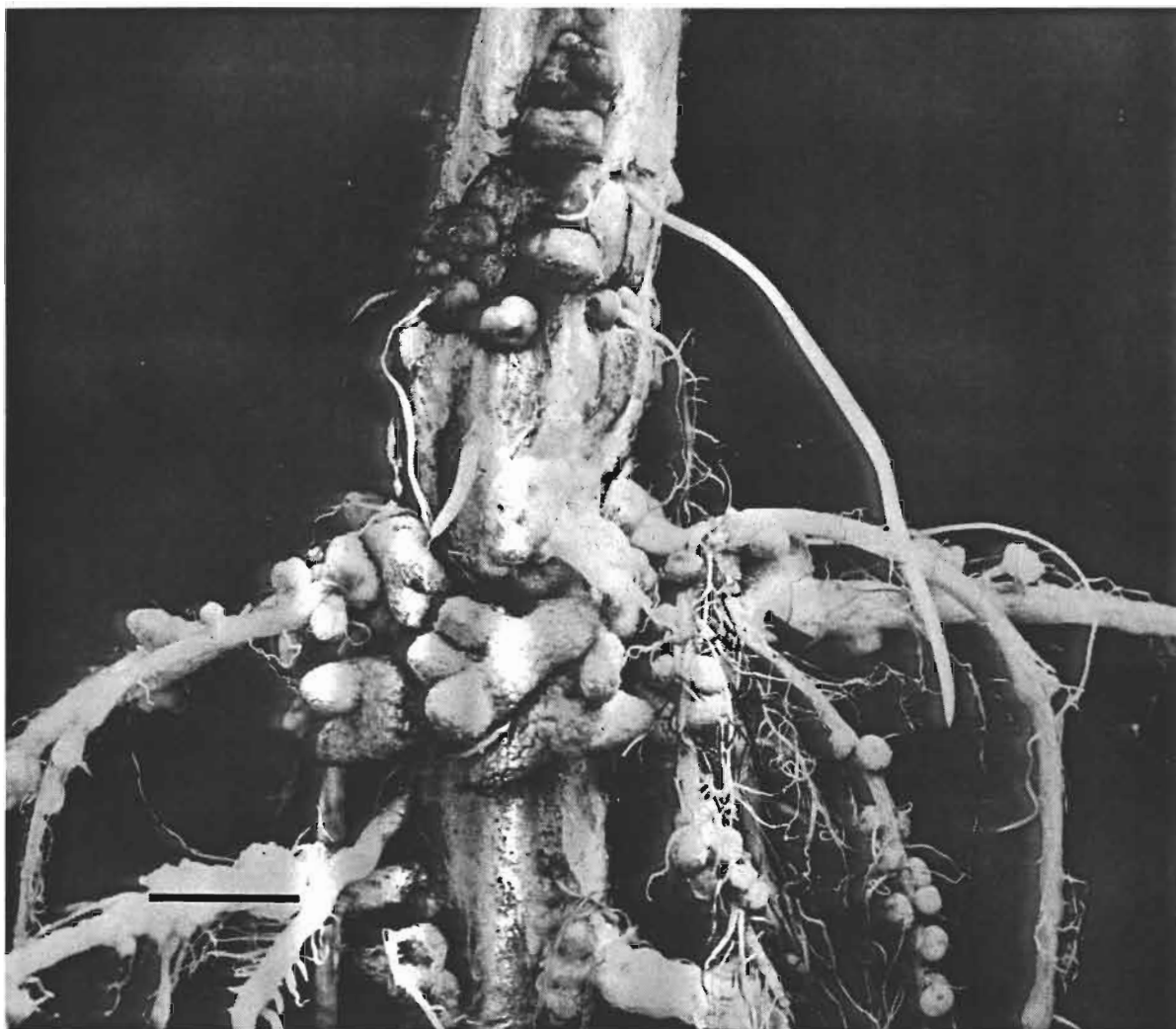


FIGURE 3 : Diversité morphologique des deux types de nodules racinaires chez *Sesbania rostrata*.

La barre représente 1 cm.



FIGURE 4 : Nodulation spontanée de la tige de *Sesbania rostrata* observée dans la nature.

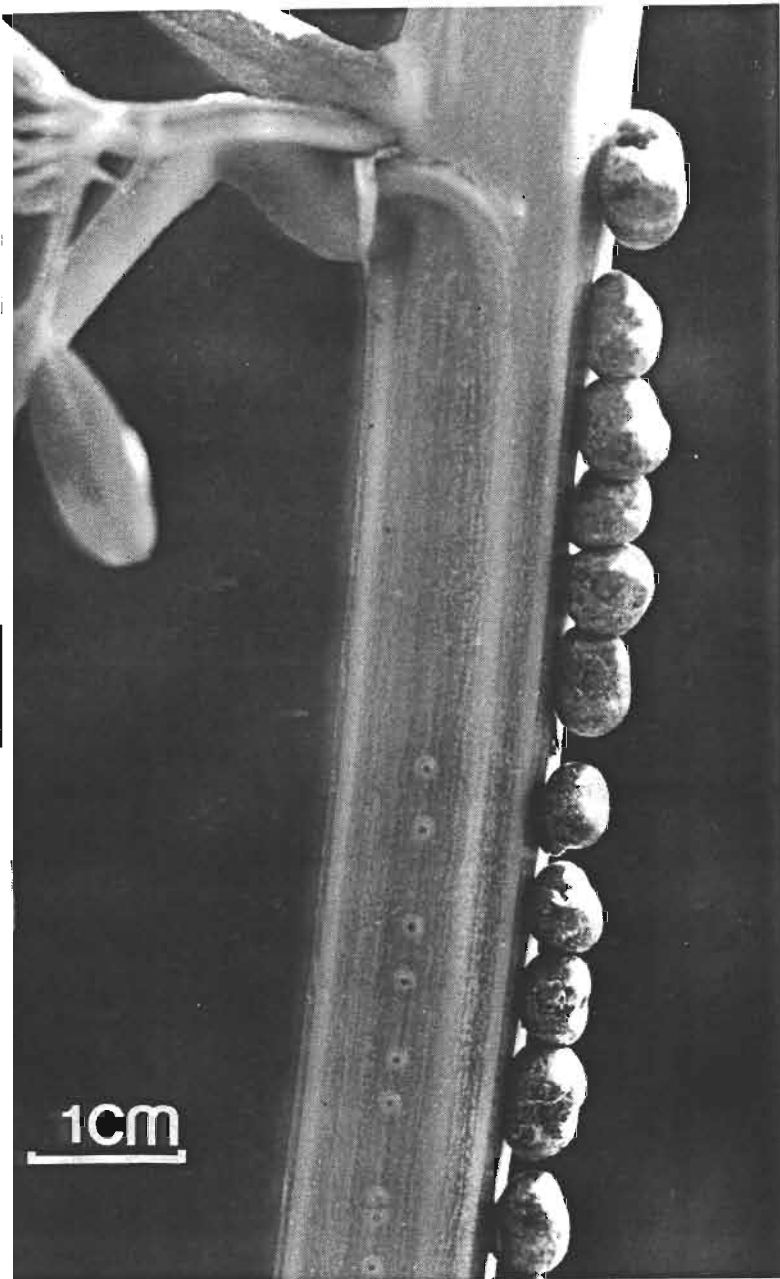
La barre représente 1 cm.

est souvent irrégulière. La poussière semble jouer un grand rôle dans la nodulation spontanée des tiges car les plantes qui poussent en bordure des pistes sont les plus nodulées. Les nodules se forment au niveau de sites d'infection que nous avons appelés sites de nodulation (voir Chapitre II) disposés suivant des lignes verticales de la tige (figure 5A). Tous ces sites ne sont pas spontanément infectés, aussi le nombre et le poids des nodules de tige peuvent-ils varier d'une plante à l'autre. Les nodules sont sphériques, parfois rendus irréguliers par un ou plusieurs lobes. Un cortex vert entoure la zone centrale rouge, leur diamètre varie de 0,3 à 0,8 cm et leur poids peut atteindre plus de 40 g (poids frais) par plante adulte de 3 à 4 m de haut.

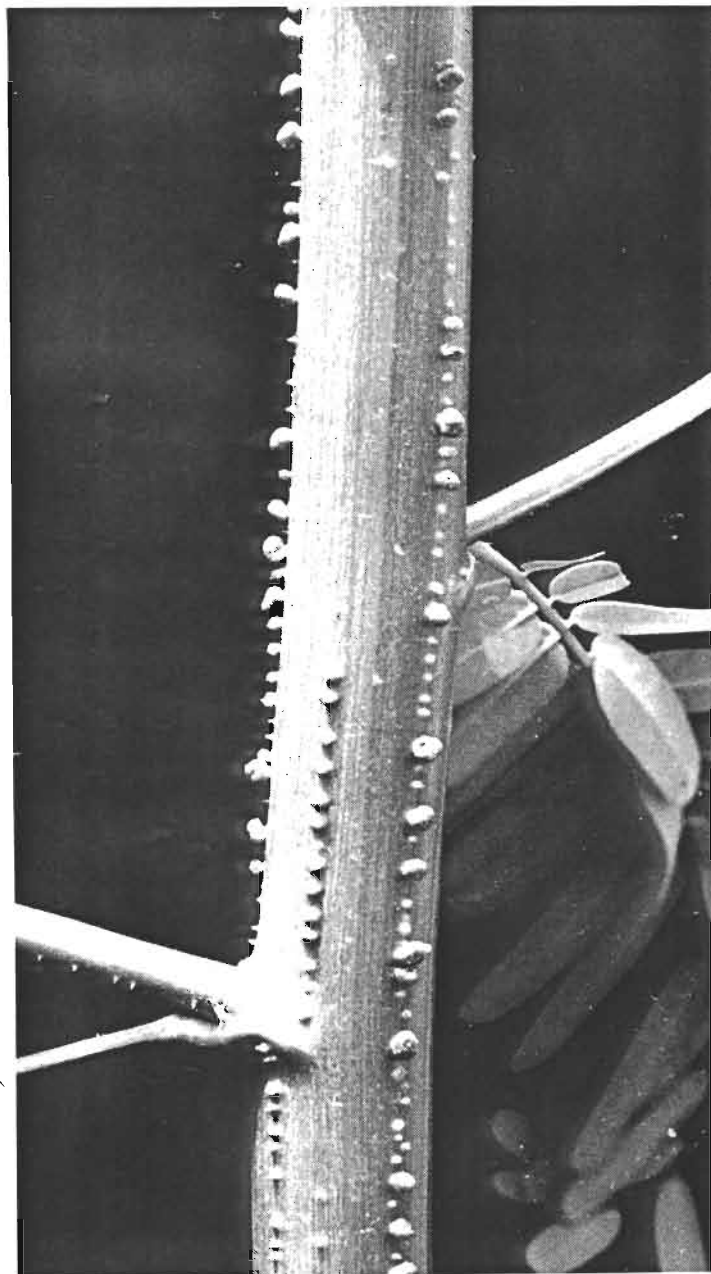
3.2.- Isolement des souches de *Rhizobium* :

3.2.1.- Isolement de souches à partir de nodules de racines :

Nous avons isolé vingt souches de *Rhizobium* à partir des nodules racinaires de *Sesbania rostrata*. Toutes ces souches sont des *Rhizobium* à croissance rapide. Cinq souches présentant sur milieu YM une morphologie de colonies différente ont été plus particulièrement étudiées (souches ORS51, ORS52, ORS53, ORS56, ORS57). Leurs capacités symbiotiques ont été comparées à celles des trois autres souches de *Rhizobium* racinaires isolées de *Sesbania pubescens* (ORS502), *Sesbania pachycarpa* (ORS507) et *Aeschynomene afraspera* (ORS301) (tableau 1).



A



B

FIGURE 5 : A - Tige de *Sesbania rostrata*. Sur la face antérieure on observe une rangée de sites de nodulation non infectés. Sur le côté, on observe une rangée de nodules provenant de l'infection des sites de nodulation inoculés par la souche de *Rhizobium* de tige ORS571.

B - Formation de "pseudonodules" sur la tige de *Sesbania rostrata* inoculée par la souche de *Rhizobium* de racines ORS57.

Dans les deux cas, la barre représente 25 μ m.

3.2.2.- Isolement à partir des nodules de tige : la souche ORS571 :

Une vingtaine de souches ont été isolées à partir de nodules de tige récoltés en différents lieux du nord Sénégal. Toutes ces souches présentant le même type de colonies sur gélose et des caractéristiques symbiotiques très proches, nous avons plus particulièrement utilisé pour notre étude une de ces souches, la souche ORS571.

3.3.- La spécificité des *Rhizobium* de tige et de racines chez *Sesbania rostrata* :

3.3.1.- La nodulation des racines de *Sesbania rostrata* :

Afin de déterminer et comparer les capacités symbiotiques des *Rhizobium* isolés des nodules racinaires et caulinaires de *S. rostrata*, nous avons inoculé les racines de jeunes plantes de *S. rostrata* cultivées en tubes, avec la souche ORS571 et les 5 souches de racines. Les résultats de la nodulation et la fixation d'azote par ces souches sont rapportés dans le tableau 3. La souche de tige ORS571 nodule les racines de *S. rostrata* comme les *Rhizobium* isolés des racines. La vitesse de nodulation est la même pour toutes les souches testées, les jeunes nodules sont visibles à l'oeil nu à la base des radicelles 3 jours après l'inoculation. Trois semaines après l'inoculation, les poids frais des parties aériennes des plantes ne diffèrent pas significativement, bien que le chiffre le plus élevé corresponde à la souche ORS571 (tableau 3). L'effectivité de la souche de tige ORS571 est donc, au niveau des nodules racinaires, comparable à celle des souches de racines.

TABLEAU 3 : Nodulation des racines de *Sesbania rostrata* par la souche de tige ORS571 et cinq souches de racines

Souches de :	Nodules (poids frais, mg/plante)	Parties aériennes (poids frais, g/plante)
<u>Tige :</u>		
ORS571	262*	2,42 a
<u>Racines :</u>		
ORS51	239 a	2,02 a
ORS52	212 ab	1,88 a
ORS53	188 b	2,07 a
ORS56	243 a	2,14 a
ORS57	197 b	1,97 a
Témoin non inoculé	0	0,18 b

Les plantes ont été récoltées trois semaines après l'inoculation.

* Chaque chiffre est le moyenne de 12 répétitions. Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($P = 0,05$) (Test de Duncan, 1955).

3.3.2.- La spécificité d'hôte (spectre d'hôte) :

La souche de tige ORS571 ainsi que les cinq souches isolées de nodules de racines ont été inoculées aux racines de sept plantes-hôtes afin de comparer leur nodulation et leur fixation symbiotique de l'azote (effectivité) sur ces plantes. Les plantes-hôtes sont, outre *Sesbania rostrata*, quatre autres espèces de *Sesbania* ne nodulant que sur les racines (*Sesbania aculeata*, *Sesbania cannabina*, *Sesbania pachycarpa* et *Sesbania paludosa*), *Aeschynomene afraspera* et Siratro (*Macroptilium atropurpureum*). *A. afraspera* a été choisie comme espèce ayant des nodules de tige et de racines et Siratro comme plante-hôte à large spectre, bien connue pour son aptitude à être nodulée par un très grand nombre de *Rhizobium* tropicaux appartenant au groupe "cowpea" des *Rhizobium* à croissance lente dont fait partie la souche CB756. Afin de compléter l'étude du spectre d'hôte, nous avons testé les ~~deux~~ souches isolées de *S. pachycarpa* (ORS507) et de *S. pubescens* (ORS502), la souche isolée de nodules de tige d'*Aeschynomene* (ORS301) et la souche CB756 (tableau 1). Les résultats sont rapportés au tableau 4. Le spectre de nodulation montre que la souche ORS571 fait partie du même groupe d'inoculation croisée que les souches isolées de nodules de racines des diverses espèces de *Sesbania*. Par contre, la souche ORS571 n'est effective que sur *S. rostrata*. Aucun nodule n'est formé par les souches de *Sesbania* (tige et racines) sur *A. afraspera* et Siratro.

TABLEAU 4 : Nodulation et effectivité des neuf souches de *Rhizobium* dont la souche de tige ORS571 sur les racines de cinq espèces de *Sesbania* dont *Sesbania rostrata*, *Aeschynomene afraspera* et *Macroptilium atropurpureum*.

Plante-hôte	Souches de <i>Rhizobium</i>									
	ORS571 (<i>Sesbania rostrata</i>)*	ORS51 (<i>Sesbania rostrata</i> , racines)*	ORS52	ORS53	ORS56	ORS57 (<i>Sesbania rostrata</i> , racines)*	ORS502 (<i>Sesbania pubescens</i>)*	ORS507 (<i>Sesbania pachycarpa</i>)*	ORS301 (<i>Aeschynomene afraspera</i>)*	CB756 (<i>Rhizobium</i> "cowpea")*
<i>Sesbania rostrata</i>	E	E	E	E	E	E	I	I	0	0
<i>Sesbania aculeata</i>	I	I	PE	E	E	E	PE	PE	0	0
<i>Sesbania cannabina</i>	0	0	I	PE	I	E	I	PE	0	0
<i>Sesbania pachycarpa</i>	I	E	PE	E	PE	E	E	E	0	0
<i>Sesbania paludosa</i>	I	0	I	E	I	0	0	0	0	0
<i>Aeschynomene afraspera</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	E	0
<i>Macroptilium atropurpureum</i> (Siratro)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	E

E, PE, I et 0 signifient respectivement : nodulation effective - peut effective - ineffective - et pas de nodulation.

*Plante-hôte à partir de laquelle la souche a été isolée.

3.3.3.- La nodulation de la tige. La spécificité tige-racines :

Nous avons montré au paragraphe 3.3.1. que la souche de tige ORS571 nodulait de façon effective les racines de *Sesbania rostrata* et qu'elle se comportait donc comme les souches isolées de nodules de racines. Nous avons ensuite inoculé ORS571 et les cinq souches de racines sur la tige de *S. rostrata*. Les plantes étaient âgées d'un mois. Deux jours après inoculation par pulvérisation de la souche ORS571, les nodules apparaissent sur la tige et atteignent 0,5 cm de diamètre en 12 jours. Par contre aucune des cinq souches de racines ne forme de nodules fixateurs d'azote sur la tige. Seule la souche de racines ORS502 isolée de *Sesbania pubescens* forme des nodules ineffectifs sur la tige de *Sesbania rostrata* et, environ 2 semaines après l'inoculation par les souches de racines ORS51 et ORS57, des "pseudonodules" se forment au niveau des sites de nodulation. Ceux-ci sont plus ou moins développés et peuvent atteindre au maximum (souche ORS57) 1 mm de diamètre (figure 5). Nous avons testé de nombreuses souches isolées de nodules racinaires de diverses espèces de *Sesbania*; jusqu'à présent, seule la souche ORS571 nodule effectivement la tige de *S. rostrata*. Les souches ORS301 et CB756 inoculées à la tige ne donnent aucun "pseudonodule", ni même un léger renflement des sites de nodulation.

Ainsi, pour la nodulation de la tige, le spectre d'hôte de la souche ORS571 isolée de nodules de tige, est différent du spectre d'hôte des *Rhizobium* des nodules racinaires.

4.- DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans ce premier chapitre, nous avons montré que les nodules de tige de *Sesbania rostrata* étaient formés par une souche de *Rhizobium* (la souche ORS571) capable aussi de noduler effectivement les racines de *S. rostrata* comme les *Rhizobium* isolés de nodules racinaires. La spécificité des *Rhizobium*, c'est-à-dire leur aptitude à noduler tel ou tel groupe de légumineuses étant à la base de leur classification, nous avons montré, en ce qui concerne la nodulation racinaire, que la souche ORS571 appartient au même groupe de nodulation croisée que les souches isolées de nodules racinaires de diverses espèces de *Sesbania*. On sait d'ailleurs depuis longtemps (Allen et Allen, 1936) que les *Rhizobium* spécifiques qui nodulent le genre *Sesbania* constituent un groupe de *Rhizobium* tropicaux à croissance rapide très différent de la grande majorité des *Rhizobium* tropicaux constitués par les *Rhizobium* à croissance lente du groupe "cowpea". Il n'est donc pas surprenant que les souches de *Rhizobium* isolées de *Sesbania* (racines et tige) ne nodulent pas *Macroptilium atropurpureum* et que la souche "cowpea" CB756 ne nodule ni la tige ni les racines de *Sesbania rostrata*. Par contre, la spécificité tige-racines de *S. rostrata* est surprenante. Seule la souche ORS571 est capable de former de véritables nodules fixateurs d'azote sur la tige de *S. rostrata*. Ceci montre que la spécificité de nodulation entre la tige et les racines est grande et pose le problème de l'origine de cette spécificité. Le fait que

certaines des souches qui nodulent de façon effective les racines de *S. rostrata*, forment des nodules ineffectifs ou des "pseudonodules" sur la tige, suggère que les premiers stades de la nodulation et en particulier, les stades de reconnaissance par les lectines ne sont pas en cause. La spécificité tige-racines pourrait donc se situer au stade du développement du nodule et mettre en jeu des différences physiologiques entre les souches de *Rhizobium*. L'hypothèse d'une adaptation à l'oxygène de la fixation d'azote de la souche ORS571 (voir Chapitre V) pourrait expliquer cette spécificité.

Sesbania rostrata possède donc une propriété unique parmi toutes les légumineuses connues, celle de posséder une nodulation racinaire et une nodulation caulinaire distinctes; bien plus, les souches de *Rhizobium* responsables de la nodulation caulinaire et racinaire sont différentes. La souche ORS571 isolée de nodules de tige, est aussi unique dans son aptitude à noduler à la fois les racines et la tige de *S. rostrata*. L'étude plus précise de la nodulation caulinaire de *S. rostrata* et du *Rhizobium* de tige (ORS571) fera donc l'objet des chapitres suivants.

CHAPITRE II

ETUDE STRUCTURALE DE L'INFECTION DES TIGES

✕ ✕ ✕

1.- INTRODUCTION

Bien que les biologistes divergent très souvent sur la définition du mot symbiose, on peut la considérer comme une association étroite et bénéfique entre deux (rarement plus) organismes différents sous influence réciproque de leurs métabolismes. Parmi toutes les symbioses, l'association *Rhizobium*-légumineuse, considérée comme spécifique et permanente, est sans aucun doute la mieux connue et la plus étudiée (voir les revues de Dart, 1977; Vincent, 1977; Dénarié et Truchet, 1979; Meijer et Broughton, 1982). La formation par les *Rhizobium* d'un nodule fixateur d'azote sur les racines d'une légumineuse est l'aboutissement d'un processus complexe faisant intervenir les gènes de la bactérie et ceux de la plante-hôte.

Il existe deux types d'infection par les *Rhizobium* des racines des légumineuses. Nous avons vu dans l'introduction générale que chez la plupart des légumineuses, l'attachement de la bactérie à l'extrémité d'un poil absorbant est suivi de l'invagination de la paroi végétale et de la formation d'un cordon d'infection contenant les bactéries. Après multiplication des cordons d'infection dans les tissus méristématiques du cortex racinaire, les *Rhizobium* sont libérés dans le cytoplasme des cellules par dissolution de la paroi du cordon d'infection.

Le deuxième type d'infection que l'on observe chez certaines légumineuses tropicales, est caractérisé par l'absence de cordons d'infection et ne se fait pas par l'intermédiaire des poils absorbants (Dart, 1977). Il en est ainsi chez *Arachis hypogaea* (Allen et Allen, 1940; Chandler, 1978) et chez plusieurs espèces d'*Aeschynomene* (Suessenguth et Beyerle, 1936; Arora, 1954; Napoli et coll., 1975) et de *Stylosanthes* (Ranga Rao, 1977) où aucun cordon d'infection n'a jamais été observé. Dans ce cas, les *Rhizobium* pénètrent directement dans l'espace intercellulaire du cortex racinaire au niveau du point d'émergence des racines latérales. La multiplication intercellulaire des bactéries s'accompagne d'une intense multiplication des cellules adjacentes du cortex et les *Rhizobium* envahissent directement ces cellules en division, sans doute par dissolution de la paroi (Chandler, 1978). L'infection intracellulaire par les *Rhizobium* se poursuit alors par divisions successives des cellules du cortex déjà envahies pour former le jeune nodule.

Dans ces deux types d'infection des légumineuses, chaque bactérie qui envahit le cytoplasme d'une cellule est immédiatement incluse dans une membrane enveloppe (Dart, 1975). Cependant, nous avons vu que chez la plupart des *Rhizobium* à croissance lente, les bactéroïdes ne se distinguent pas morphologiquement des formes libres et que, dans certains cas, ils continuent à se diviser à l'intérieur des membranes enveloppes.

Il était donc intéressant de savoir si l'infection des tiges de *Sesbania rostrata* se déroulait suivant le mode habituel par l'intermédiaire de poils absorbants et de cordons d'infection ou, comme c'est le cas chez l'arachide, par pénétration intercellulaire puis intracellulaire directe. L'objet de ce chapitre a donc été de décrire les différentes étapes de l'infection qui mènent à la formation des nodules de tige de *S. rostrata*. Contrairement aux autres légumineuses chez lesquelles on ne peut prévoir l'endroit précis où les nodules vont se former, *S. rostrata* présente sur ses tiges des sites de nodulation déjà formés avant toute inoculation par les *Rhizobium*; cette propriété de *S. rostrata* facilite grandement l'étude des premiers stades de l'infection des tiges.

2.- MATERIEL ET METHODES

2.1.- Culture des plantes et prélèvement des échantillons :

Les plantes de *Sesbania rostrata* sont cultivées en plein air à Dakar pendant la saison chaude (température : 25° à 30°C; humidité relative : 65 à 80%), dans des pots contenant 2 kg de sol. Lorsque les plantes sont âgées de 1 mois, des prélèvements de tige sont effectués sur les plantes non inoculées, en vue de l'étude structurale des sites de nodulation non infectés. Simultanément, pour l'étude du processus d'infection, d'autres plantes du même âge et cultivées dans des conditions identiques sont inoculées par pulvérisation sur les tiges d'une culture de 1 jour de la souche ORS571 (10^8 bactéries/ml). Chaque jour après cette inoculation et pendant 6 jours, une bande d'écorce portant les sites de nodulation infectés (se transformant rapidement en jeunes nodules) est prélevée sur les tiges. Une série de tiges non inoculées est prise comme témoin. Des prélèvements sont effectués 15 jours après l'inoculation des tiges pour l'étude des nodules matures.

2.2.- Etude au microscope photonique :

Les échantillons de tige d'environ 1 cm de longueur ont été fixés au Nawashine, coupés en série à une épaisseur de 10 μ m et colorés à l'hématoxyline ferrique de Régaut (Langeron, 1949). La vascularisation a été mise en évidence sur des coupes réalisées à main levée après coloration par le carmin aluné et le vert d'iode (Lison, 1960).

Pour étudier les nodules matures, on les a préalablement fixés, entiers, dans une solution de formol/acide acétique/50% éthanol (V/V = 13/5/200) pendant au moins 72 h. Après inclusion dans la paraffine, les nodules ont été coupés à 15 ou 18 μm et colorés à la safranine et au vert lumière (Lison, 1960).

2.3.- Etude au microscope électronique :

Les échantillons végétaux ont été préfixés au glutaraldéhyde à 2,5% dans 0,025 M de tampon cacodylate puis fixés dans de l'acide osmique à 1% et enfin, inclus dans la résine. Les coupes ont été faites à l'ultramicrotome et colorés au citrate de plomb.

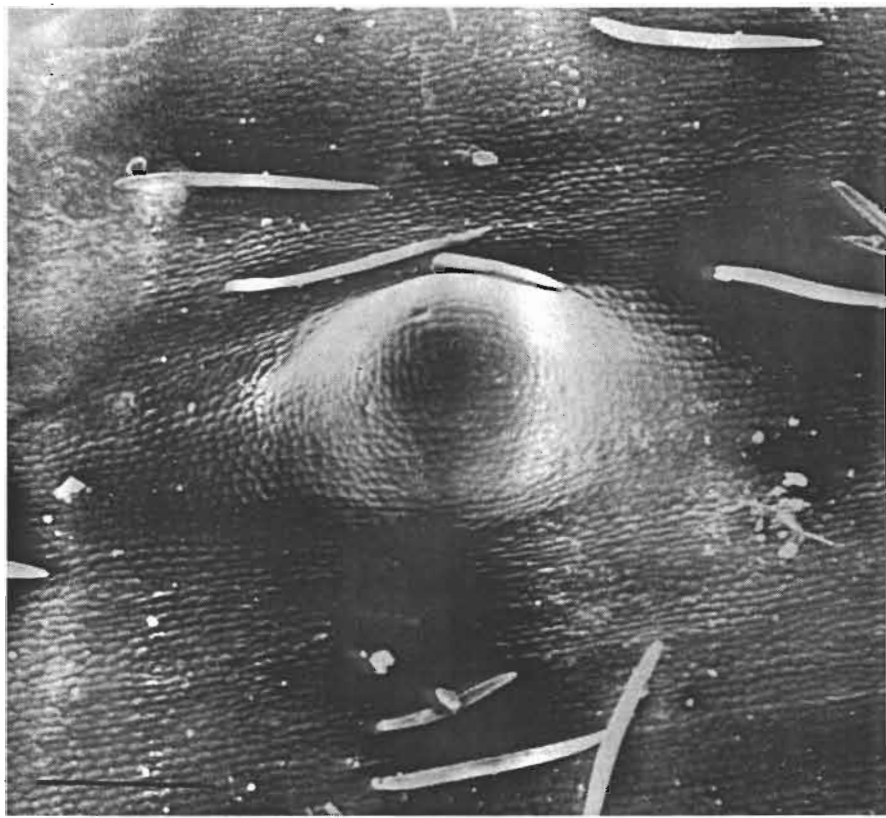
Les observations de surface ont été faites au microscope électronique à balayage soit à partir des échantillons fixés dans l'acide osmique, soit après traitement cryogénique du matériel végétal (Tsien et Schmidt, 1981; Duhoux et Dreyfus, 1982).

3.- RESULTATS

3.1.- Les sites de nodulation de la tige :

Comme nous l'avons décrit dans le premier chapitre, les sites de nodulation qui ressemblent à l'oeil nu à de petites pointes ou épines, sont disposés régulièrement suivant trois ou quatre génératrices sur toute la longueur de la tige (figure 5). Ces sites sont une des caractéristiques botaniques de l'espèce *Sesbania rostrata* et leur formation est indépendante de toute inoculation par les *Rhizobium*. Ils apparaissent très tôt sur la jeune plantule, les premiers à l'aisselle des cotélydons, et sont formés continuellement à partir des méristèmes apicaux de la tige et des branches, aussi longtemps que dure la croissance de la plante (figure 1). Observés au photomicroscope près du méristème apical de la tige, le site de nodulation en formation se présente tout d'abord sous la forme d'un renflement de la tige (figure 6A). Un ou deux jours plus tard, le renflement s'accroît et se transforme en dôme épidermique percé en son centre par un apex mesurant entre 0,2 et 0,8 mm de long (figure 6B). Une cavité annulaire se forme entre la base de l'apex et le dôme épidermique (figure 7). Les coupes histologiques (figure 8) indiquent que cet apex possède une structure typique d'ébauche racinaire, dans laquelle on reconnaît une zone méristématique (Zm), une coiffe (C) et un cylindre central (CC). La partie centrale de l'ébauche racinaire est vascularisée,

A



B

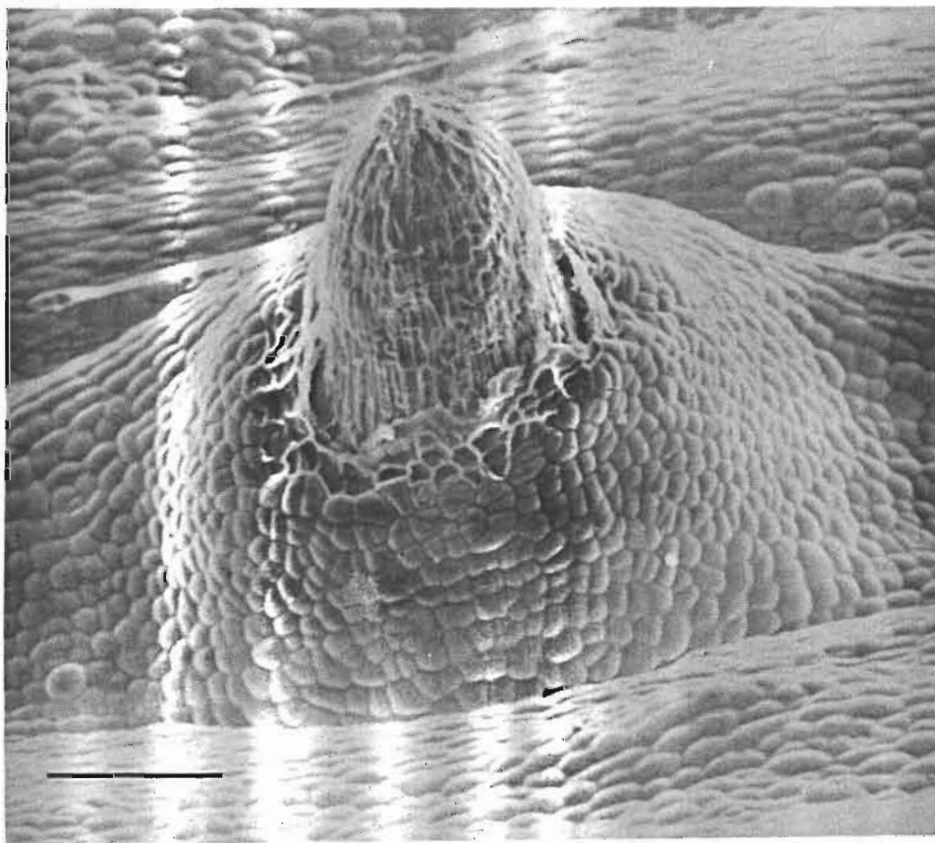


FIGURE 6 : A - Le site de nodulation en formation se présente sous la forme d'un renflement de la tige.

B - Le site de nodulation s'est développé en un dôme épidermique percé par une ébauche racinaire.

Dans les deux cas, la barre représente 25 μm .



FIGURE 7 : Coupe longitudinale du site de nodulation non infecté montrant la cavité annulaire entre la base de l'ébauche racinaire et l'épiderme.

La barre représente 50 μm .

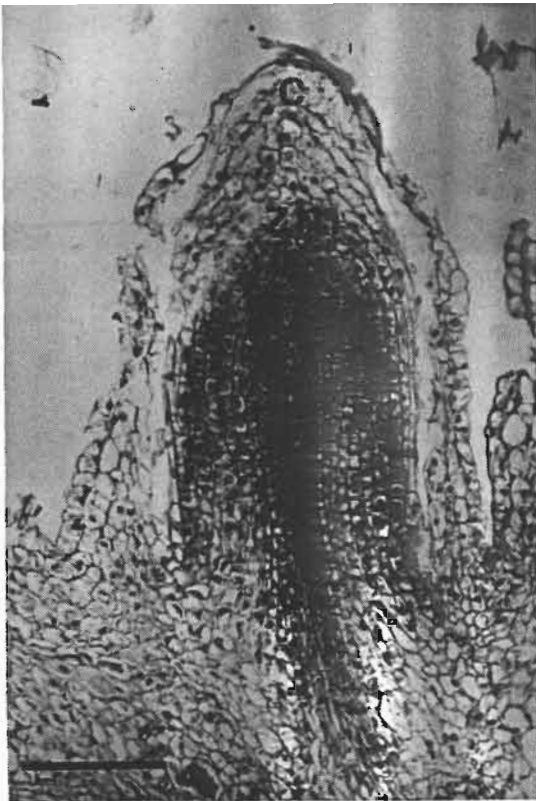
cette vascularisation se raccordant à celle de la tige (figure 8). La potentialité racinaire de l'apex du site de nodulation peut être confirmée expérimentalement : si on plonge pendant plusieurs jours une tige sectionnée dans l'eau, la plupart des apex des sites de nodulation immergés donnent naissance à des racines qui s'allongent et se ramifient (figure 9).

3.2.- Infection des tiges de *Sesbania rostrata* par les *Rhizobium* :

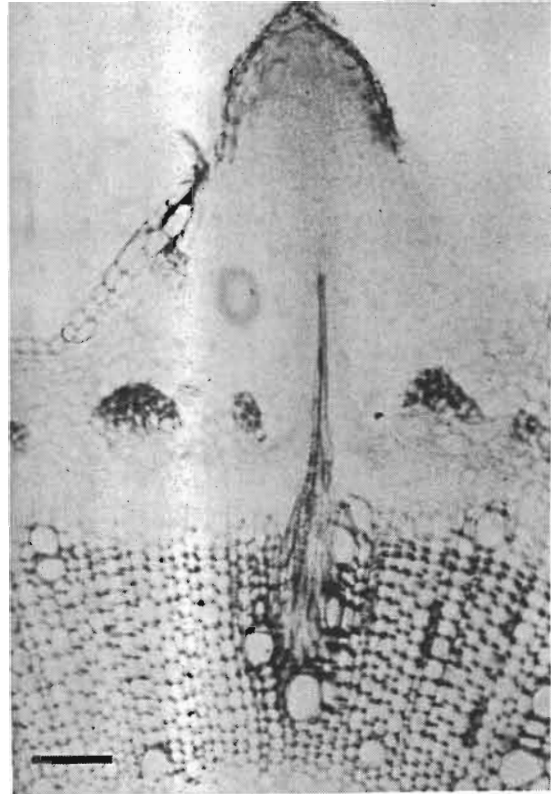
La structure des sites de nodulation ayant été définie, nous avons étudié par ultramicroscopie les différentes étapes de l'infection et en particulier, le mode de pénétration du *Rhizobium* au niveau du site de nodulation. La formation du nodule a été suivie pendant 6 jours suivant la technique décrite au paragraphe 2.1. Ces observations nous ont conduit à distinguer trois étapes dans les processus de pénétration des *Rhizobium* dans les cellules : une invasion intercellulaire des *Rhizobium*, le développement des cordons d'infection et enfin l'invasion intracellulaire des *Rhizobium*.

3.2.1.- Invasion intercellulaire des *Rhizobium* :

C'est dans la cavité annulaire, située entre l'ébauche racinaire et l'épiderme de la tige (figure 7), que l'on observe, dès le 1er jour après l'inoculation, des *Rhizobium* présents entre les cellules dont ils recouvrent par endroits la surface (figure 10). Deux à trois jours après l'inoculation, les observations faites à la base de l'ébauche racinaire confirment la pénétration intercellulaire des *Rhizobium*. Ceux-ci se sont



A



B

FIGURE 8 : Coupes longitudinales d'un site de nodulation présentant une structure typique d'ébauche racinaire dont la vascularisation se raccorde à celle de la tige.

Dans les deux cas, la barre représente 100 μ m.



FIGURE 9 : Jeune tige de *Sesbania rostrata* immergée 10 jours dans l'eau. La plupart des sites de nodulation ont donné naissance à des racines adventives.

La barre représente 1 cm.

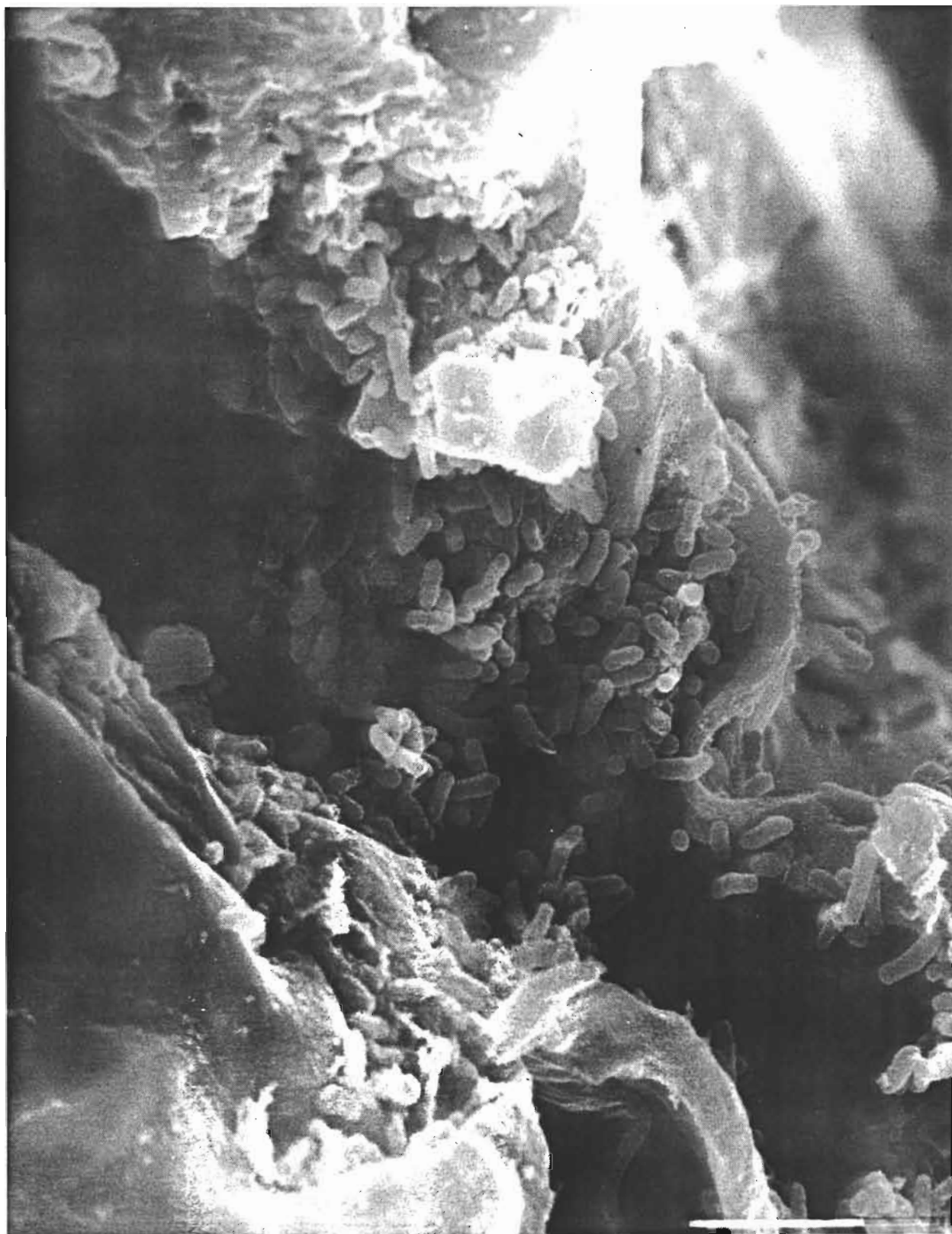


FIGURE 10 : Un jour après l'inoculation, les *Rhizobium* sont attachés à la surface des cellules de la base de l'ébauche racinaire. La barre représente 5 μm .

multipliés très rapidement dans les espaces intercellulaires où ils forment des poches (figures 11 et 12). La pression de ces poches est telle que les cellules environnantes de l'hôte sont déformées. Dans ces poches, les *Rhizobium* sont inclus dans une substance dense aux électrons qui semble se dissoudre au contact des bactéries qui s'y multiplient en très grand nombre. Simultanément on observe une prolifération méristématique des cellules du cortex de la base de l'ébauche racinaire (figure 13). A ce stade de l'invasion par les *Rhizobium* (2ème, 3ème jour après l'inoculation), une transformation du site de nodulation visible à l'oeil nu intervient. La base de l'ébauche racinaire s'élargit, seul le sommet de l'apex reste inchangé (figure 13).

3.2.2.- Les cordons d'infection :

Après le stade de multiplication des *Rhizobium* dans l'espace intercellulaire, des cordons d'infection apparaissent dans les cellules en division de la base de l'ébauche racinaire (figure 14). Les cordons d'infection apparaissent tout d'abord autour des poches de multiplication intercellulaire dont ils pourraient constituer des ramifications qui pénètrent, après avoir envahi de nouveaux espaces intercellulaires, comme de véritables doigts de gant, dans le cytoplasme des cellules (figure 15). Ces cordons d'infection sont cylindriques, leur diamètre, de 0,3 à 2 μm , est comparable à celui d'une cellule de *Rhizobium*. Ils sont entourés d'une membrane cellulosique épaisse et contiennent les *Rhizobium* souvent alignés les uns à la suite des autres (figure 15). Observé à plus fort grossissement (figure 16), le cordon d'infection semble contenir, au voisinage des *Rhizobium*, une substance dense aux électrons qui pourrait être identique à celle observée dans les poches de multiplication intercellulaire (voir paragraphe 3.2.1.). La paroi cellulosique du cordon apparaît double.



FIGURE 11 : Multiplication des *Rhizobium* dans l'espace intercellulaire, trois jours après l'inoculation des sites d'infection.
Grossissement X4500.

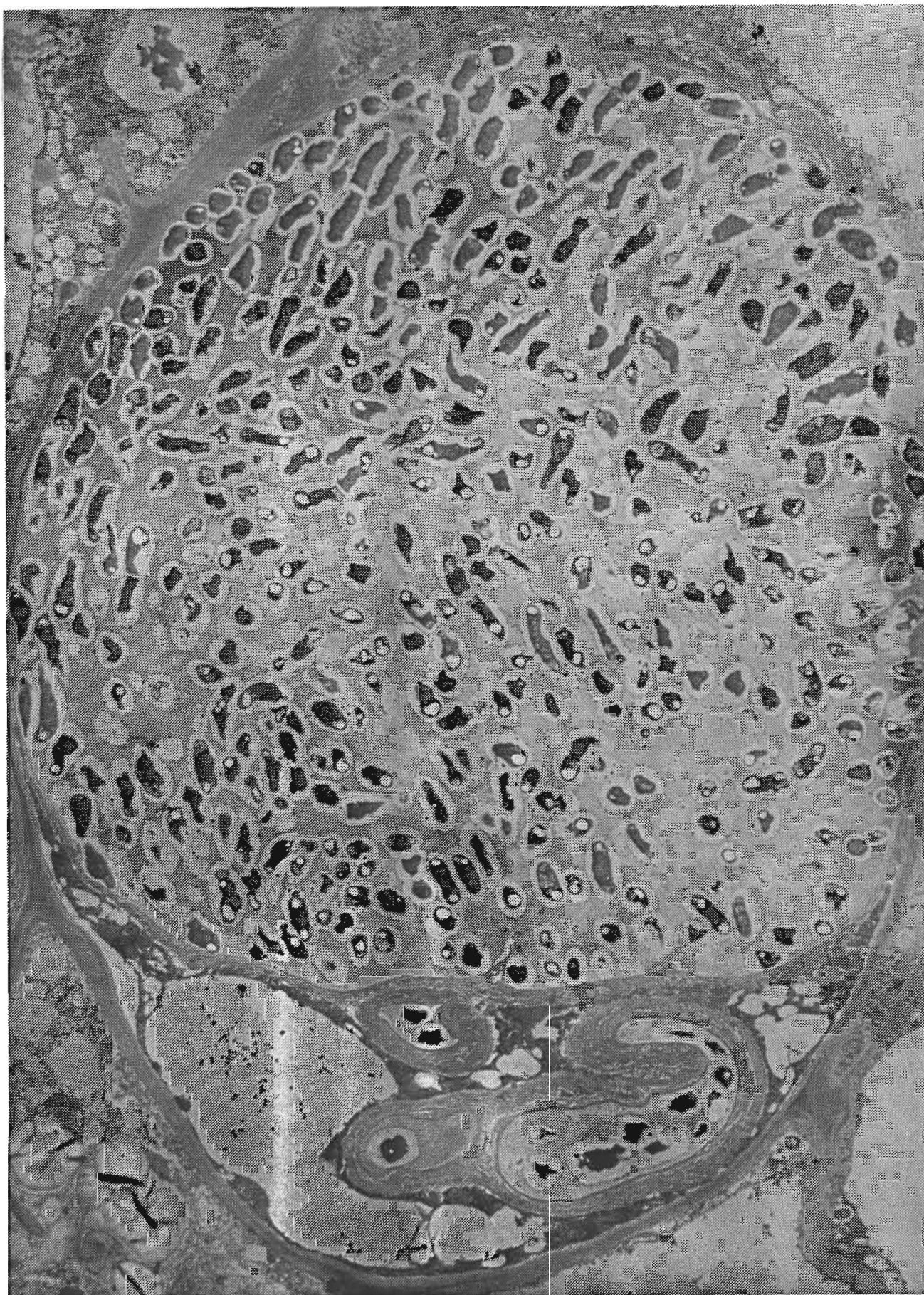


FIGURE 12 : Dans l'espace intercellulaire, les *Rhizobium* sont inclus dans une substance dense aux électrons.

Grossissement X6000.

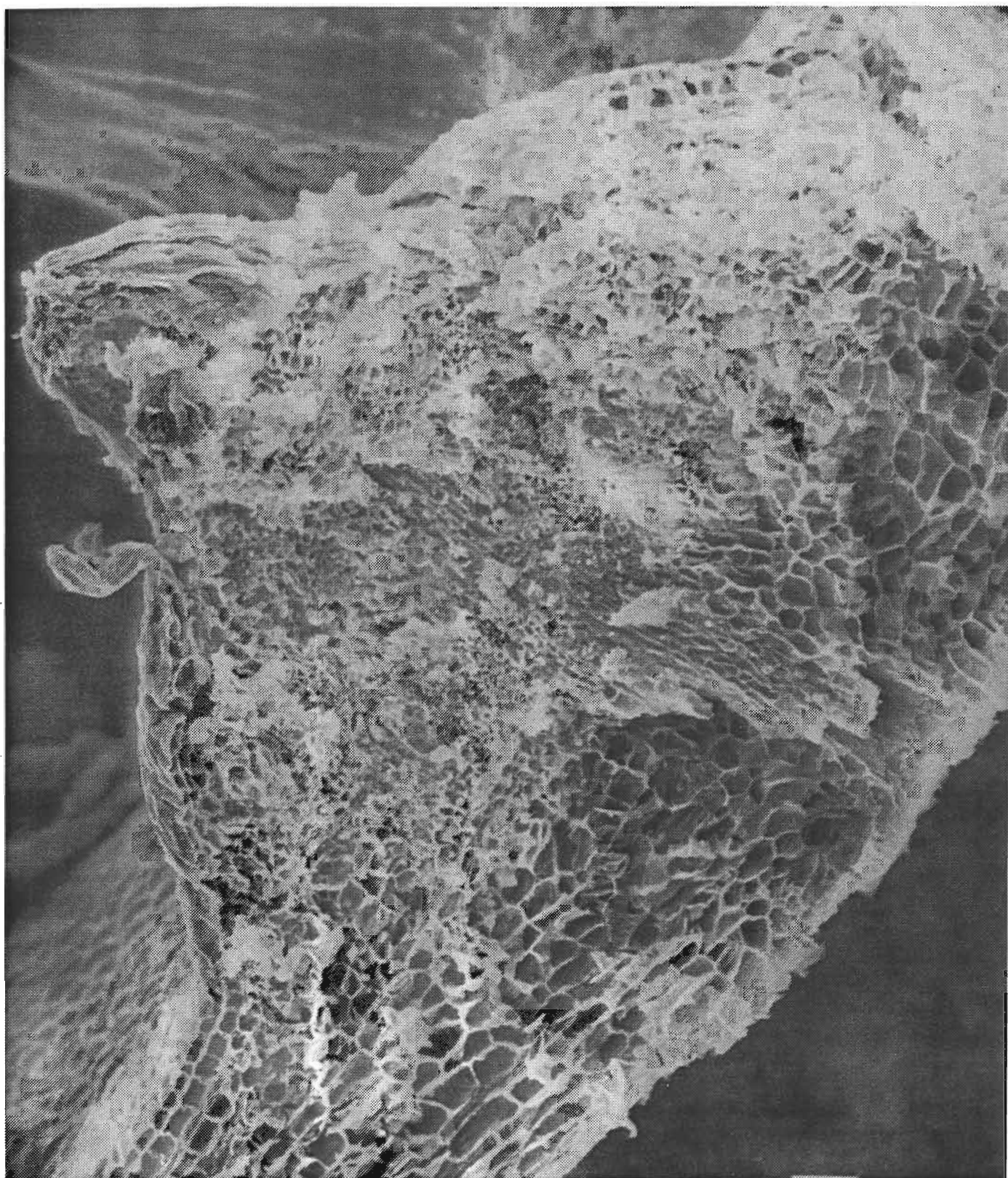


FIGURE 13 : Trois jours après l'inoculation, la base de l'ébauche racinaire s'élargit.

La barre représente 50 μM .

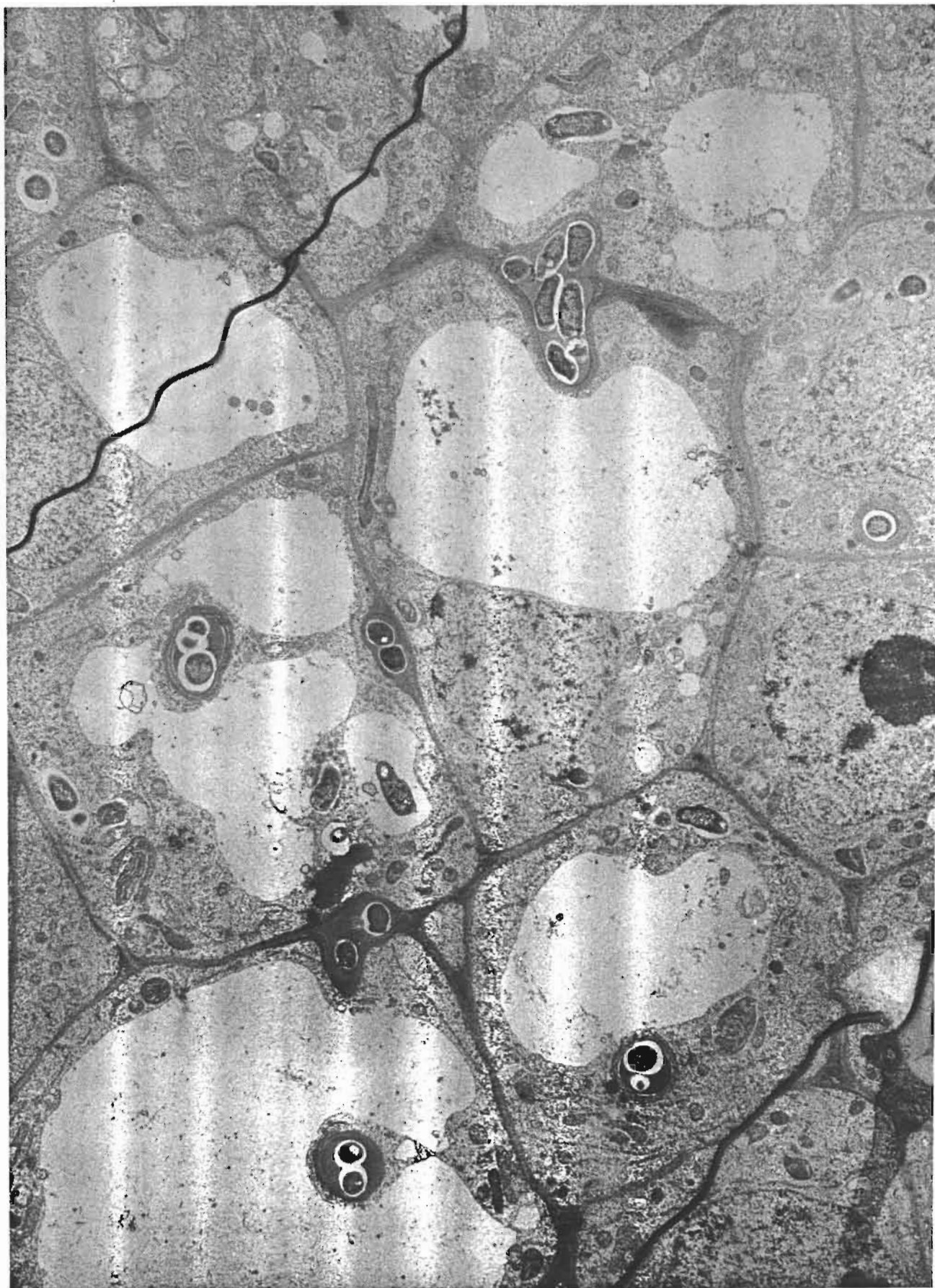


FIGURE 14 : Formation des cordons d'infection.

Grossissement X6000.

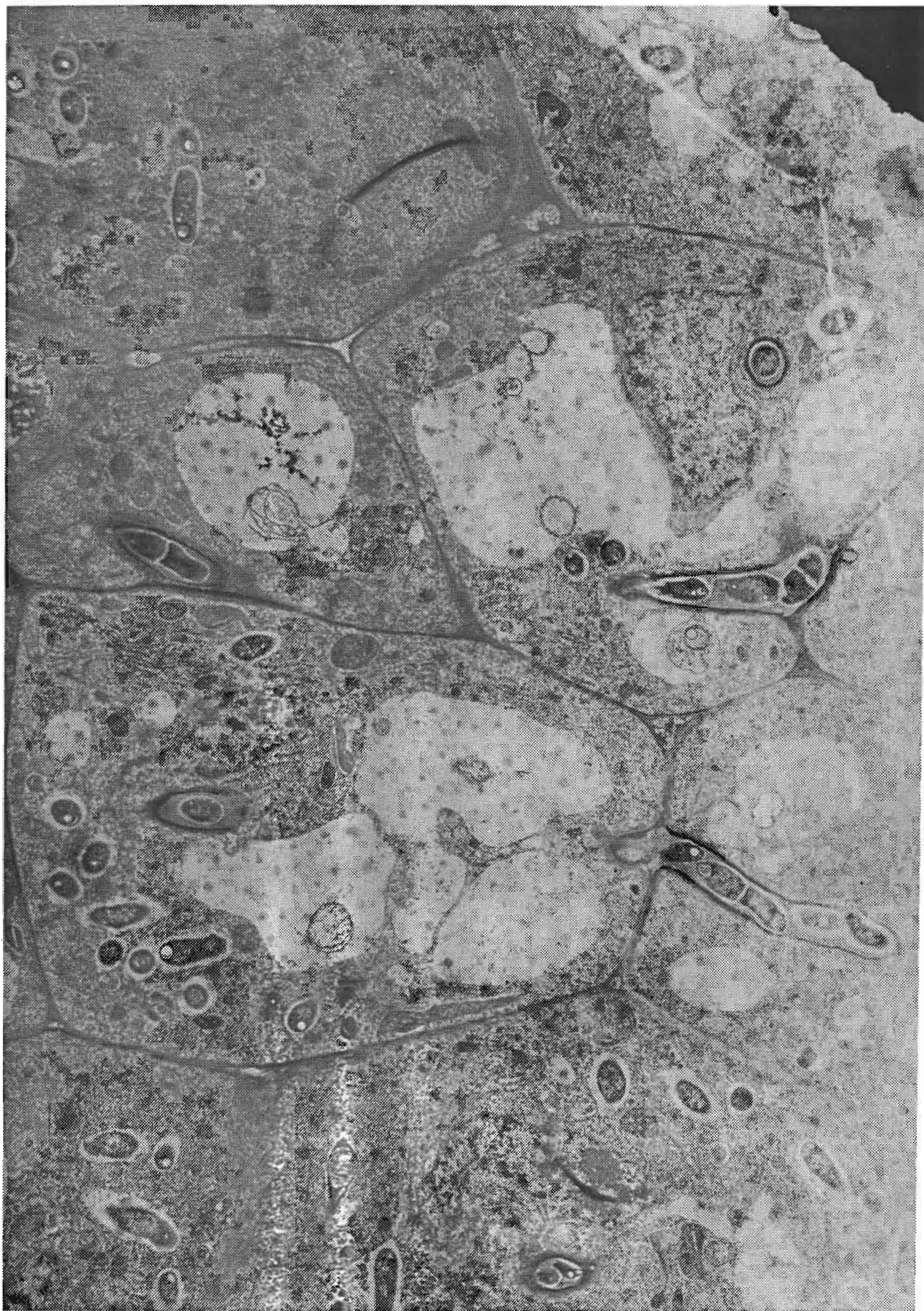


FIGURE 15 : Les cordons d'infection pénètrent à l'intérieur du cytoplasme des cellules.

Grossissement X6000.



FIGURE 16 : Gros plan d'un cordon d'infection montrant sa double paroi
et une substance dense aux électrons entourant les *Rhizobium*.
Grossissement X30 000

3.2.3.- Invasion intracellulaire des *Rhizobium* :

En même temps que les cordons d'infection continuent à se diviser et à envahir de nouvelles cellules, les *Rhizobium* commencent à être libérés dans le cytoplasme des cellules. La paroi de l'extrémité d'une branche du cordon d'infection s'ouvre, sans doute par dissolution (Verma et Zogbi, 1978) et laisse échapper les *Rhizobium* dans le cytoplasme de la cellule (figures 17 et 18). Avant d'être libérés entièrement du cordon d'infection, les *Rhizobium* sont déjà entourés de la membrane enveloppe (voir Introduction du Chapitre II), qui les isole du cytoplasme de la cellule végétale (figure 17). A ce stade de pénétration intracellulaire des *Rhizobium*, on ne trouve qu'une seule bactérie par membrane enveloppe et aucune différence morphologique nette n'apparaît entre les formes libres du *Rhizobium* de tige et les formes symbiotiques, ou bactéroïdes inclus dans la membrane enveloppe. La figure 17 montre que la cellule végétale qui vient d'être envahie par les *Rhizobium* ainsi que les cellules adjacentes présentent un noyau très élargi et dense ainsi qu'un réticulum endoplasmique très important démontrant une grande activité cellulaire. Par la suite, le cytoplasme de la cellule-hôte est progressivement et complètement envahi par les bactéroïdes inclus individuellement dans leur membrane enveloppe (figure 19).



FIGURE 17 : Libération d'une cellule de *Rhizobium* à partir d'un cordon d'infection.

Grossissement X14 850.



FIGURE 18 : Aussitôt après leur libération hors des cordons d'infection, les *Rhizobium* envahissent le cytoplasme des cellules. Chaque *Rhizobium* est entouré d'une membrane enveloppe. Grossissement X24 000.

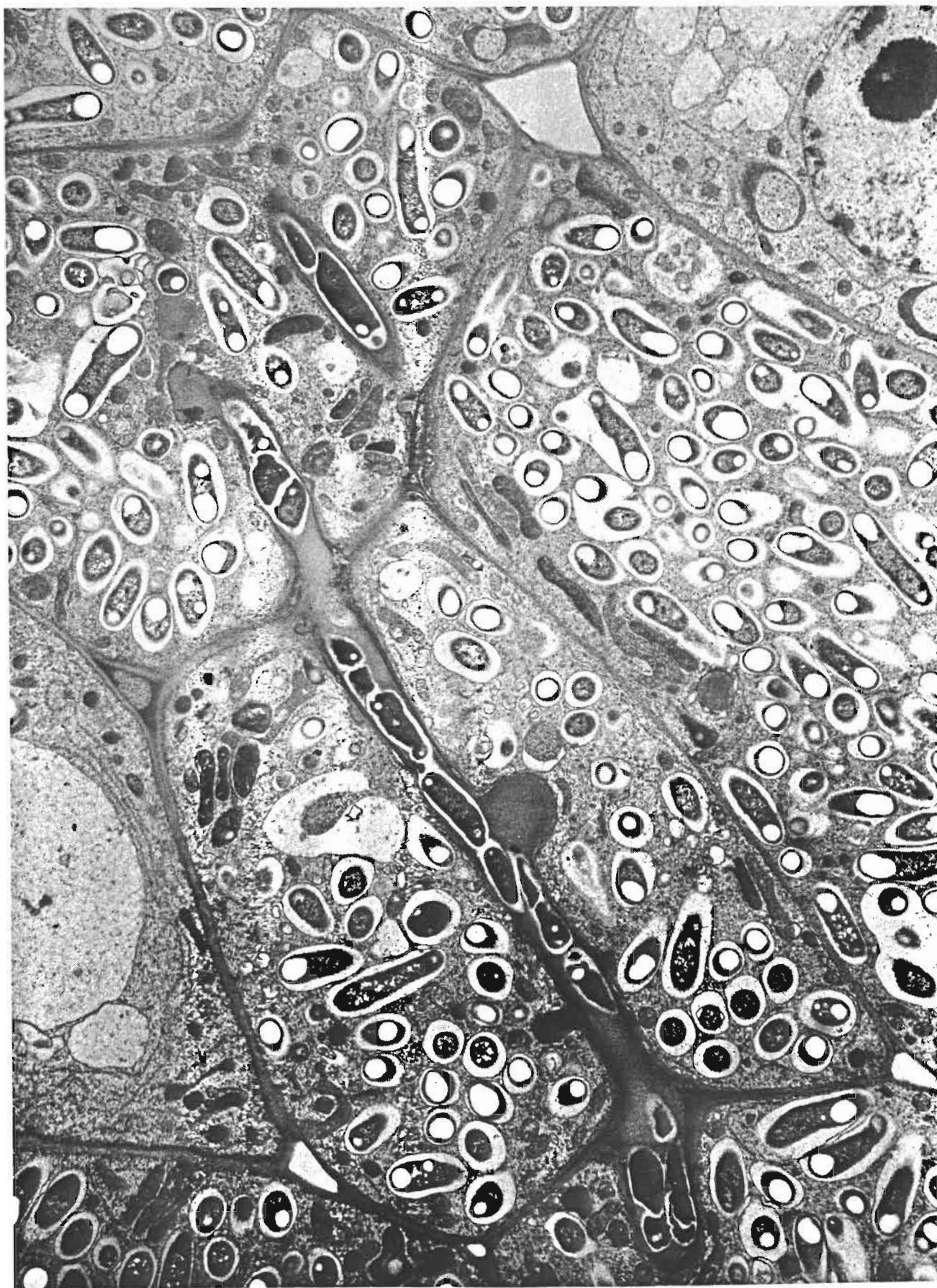


FIGURE 19 : Six jours après l'inoculation, le cytoplasme des cellules est envahi par les *Rhizobium*.

Grossissement X9000.

3.3.- Le développement du nodule :

Dès le 5ème ou 6ème jour après l'inoculation, de nombreuses cellules végétales sont envahies par les bactéries. Ces cellules infectées forment une zone bien délimitée, séparée des autres cellules non infectées par trois ou quatre rangs de cellules, que nous avons appelées cellules tampons, contenant de très larges vacuoles (figure 20). A ce stade, les cellules de la zone infectée commencent à se colorer en rouge, ceci étant dû à la synthèse de légghémoglobine. Le nodule du 6ème jour présente une activité réductrice d'acétylène, démontrant que la nitrogénase des bactéroïdes est maintenant fonctionnelle. La coupe d'un nodule de 6 jours (figure 21) montre l'emplacement, à la base du jeune nodule, de deux zones qui forment, de part et d'autre des vaisseaux conduisant à l'apex, la région infectée. Celle-ci constitue un anneau torique à la base du nodule. Au sommet du jeune nodule, la zone méristématique de l'apex demeurée latente malgré l'infection, conserve tout son potentiel racinaire puisque, immergée dans l'eau, elle se développe encore en racine adventive (figure 22).

3.4.- Le nodule mature

Quinze jours après l'inoculation des *Rhizobium* le nodule atteint sa taille maximum (0,3 à 0,8 cm de diamètre). La section du nodule vue au microscope (figure 23) montre que le nodule de tige, mature, ressemble aux nodules ronds ou ovales typiques que l'on trouve par exemple sur les racines de soja (*Glycine max*) ou cowpea (*Vigna unguiculata*) (Dart, 1977). La zone infectée par les bactéroïdes (zone sombre) s'est maintenant développée et remplit tout l'intérieur du nodule sauf quelques îlots de cellules non infectées. Elle est entourée par un cortex de couleur verte contenant les

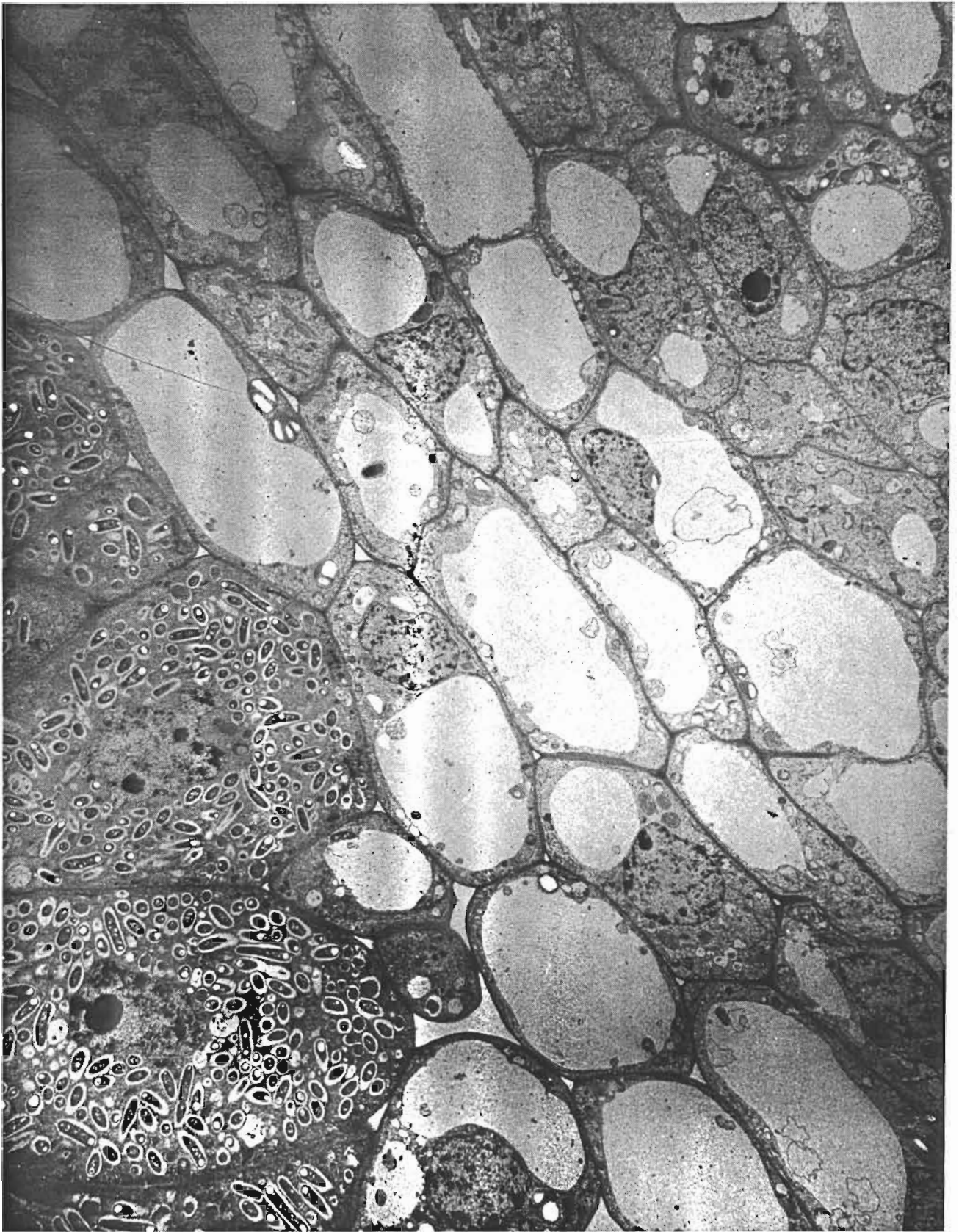


FIGURE 20 : Les cellules infectées par les *Rhizobium* forment une zone bien délimitée dans le nodule.

Grossissement X3000.

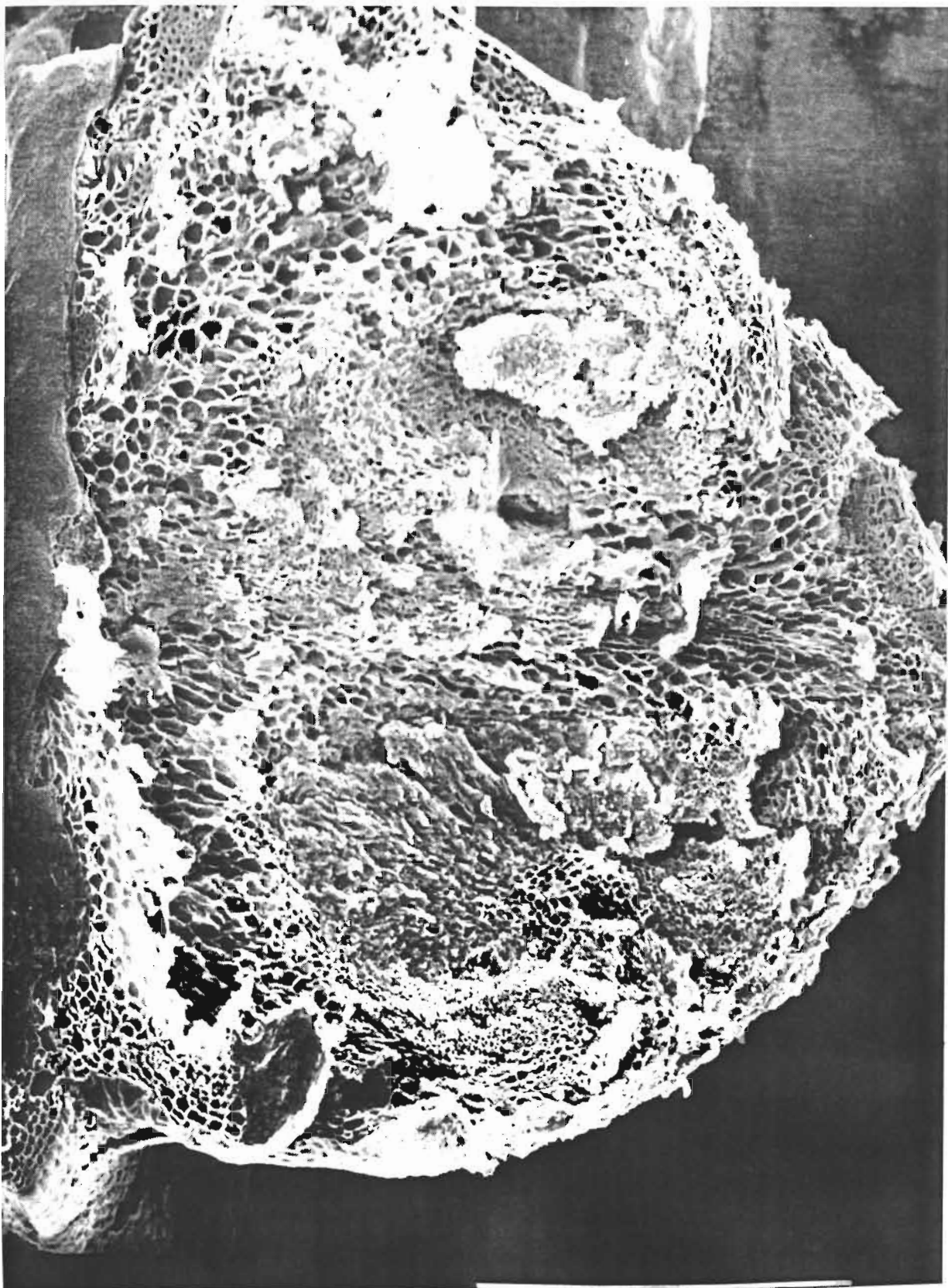


FIGURE 21 : Coupe d'un nodule de six jours.

La barre représente 500 μm

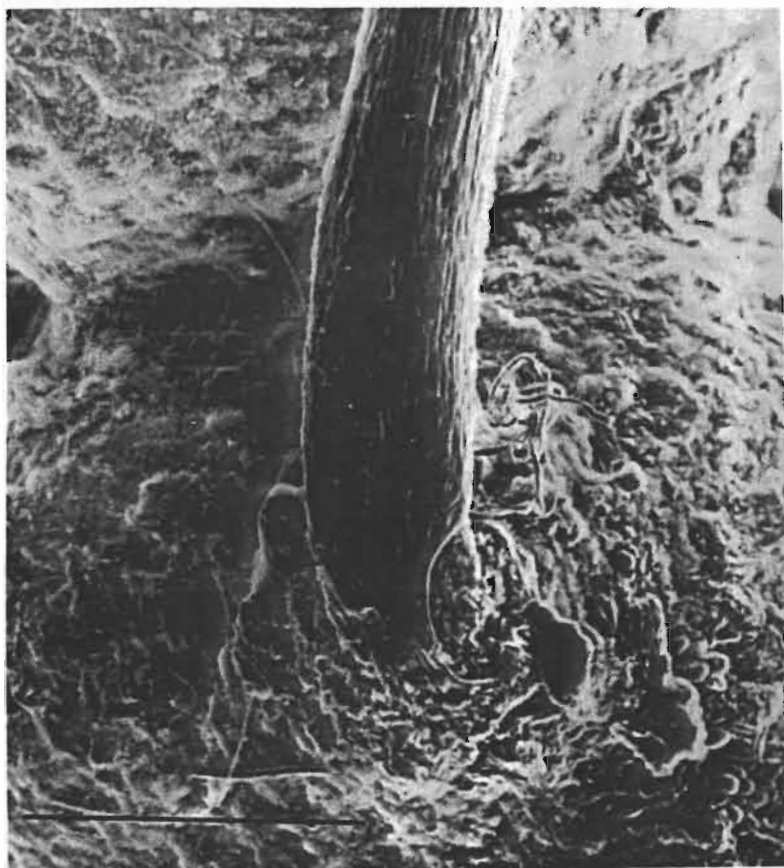


FIGURE 22 : L'apex d'un jeune nodule immergé dans l'eau se transforme en racine.

La barre représente 1 mm.

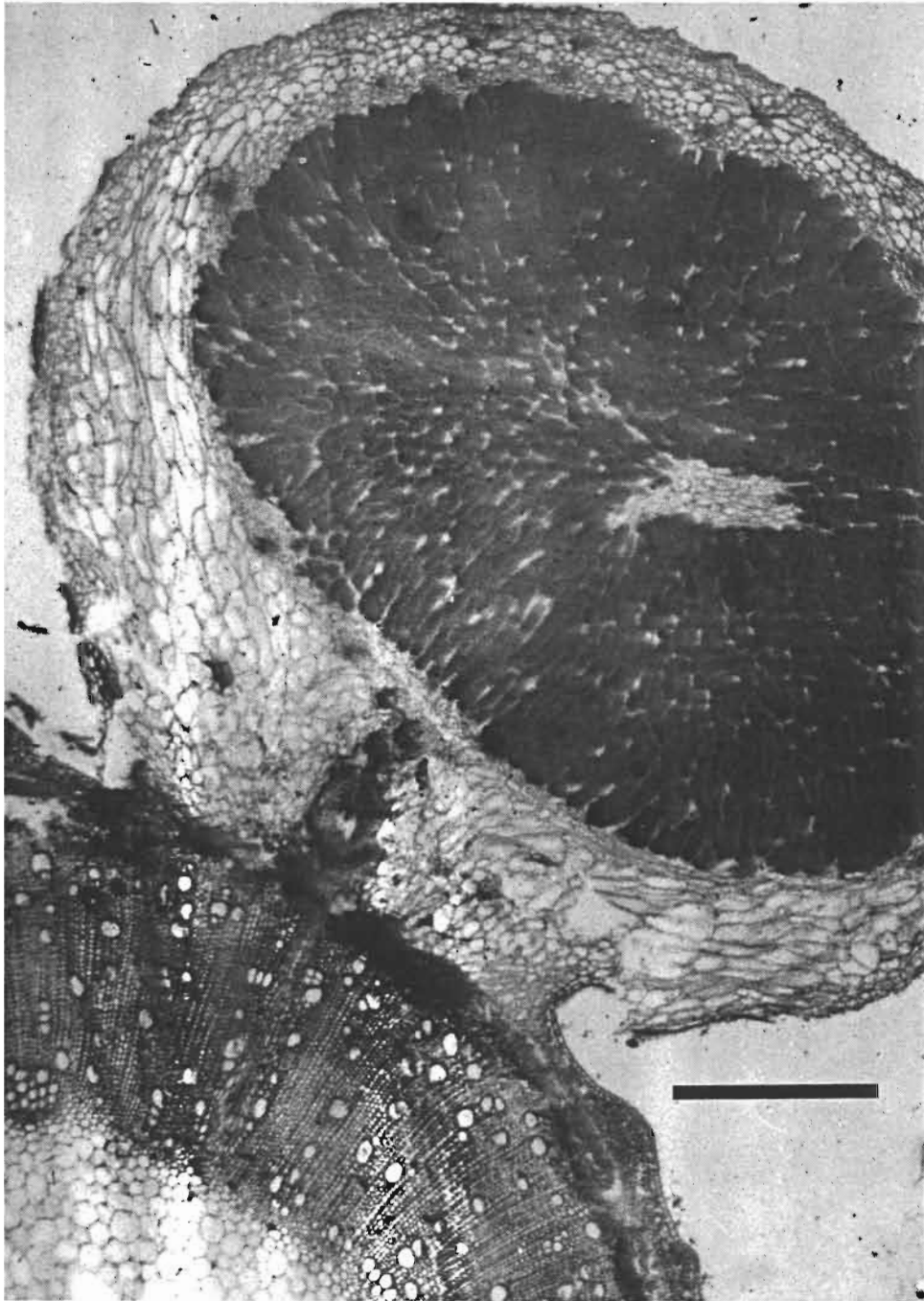


FIGURE 23 : Section d'un nodule mature.

La barre représente 0,5 mm.

vaisseaux conducteurs répartis sur tout son pourtour. L'apex original de l'ébauche racinaire a disparu. Observé au microscope électronique, le cytoplasme des cellules de la zone infectée apparaît envahi par les bactéroïdes renfermés en grand nombre dans la membrane enveloppe (figure 24), alors qu'aux premiers stades de l'infection, il n'y avait qu'un seul bactéroïde par membrane enveloppe. Cette observation suggère que les bactéroïdes se sont multipliés à l'intérieur même de la membrane enveloppe. Le même phénomène a déjà été rapporté par Bergersen (1978) dans le cas des cellules infectées des nodules du soja, avec toutefois un nombre beaucoup plus faible (3 à 5) de bactéroïdes par membrane enveloppe. Les cellules du cortex contiennent de nombreux chloroplastes, ce qui explique sans doute la couleur verte de ce cortex entourant la zone à bactéroïdes colorée en rouge par la légghémoglobine. Les cellules situées au contact du cortex et de la zone centrale renferment souvent dans leur cytoplasme à la fois des *Rhizobium* et des chloroplastes (figure 25).

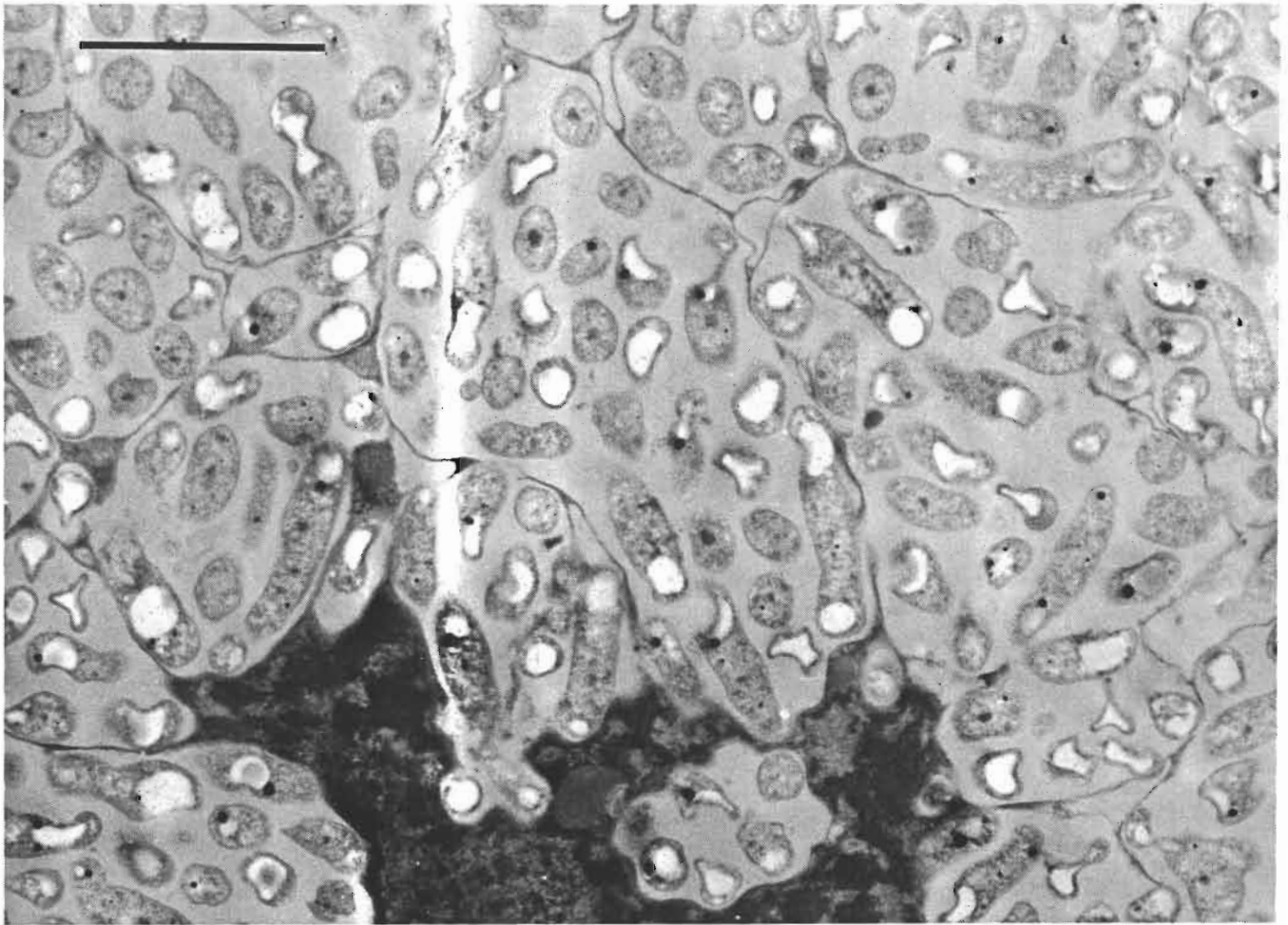


FIGURE 24 : Dans le nodule mature, les bactéroïdes sont inclus en grand nombre dans chaque membrane enveloppe.

La barre représente 2,5 μm .



FIGURE 25 : Les cellules du cortex interne du nodule renferment à la fois des *Rhizobium* et des chloroplastes.

La barre représente 5 μm .

4.- DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1.- Les sites de nodulation de la tige :

Un certain nombre de plantes appartenant à différentes familles botaniques dont *Citrus*, *Cotoneaster*, *Hydrangea*, *Jasminum*, *Populus*, *Ribes*, *Salix* (Favre, 1977) possèdent dans la tige des structures latentes constituées par de simples zones méristématiques incluses dans la tige et qui sont susceptibles de donner ultérieurement des racines adventives. Chez *Sesbania rostrata* au contraire, nous avons montré qu'il s'agit d'une véritable ébauche racinaire qui a déjà percé l'épiderme de la tige. L'ébauche racinaire demeure latente sur la tige, sans doute par des mécanismes de dormance hormonale, jusqu'à ce que deux événements extérieurs surviennent : l'infection par le *Rhizobium* spécifique ou bien l'immersion de la tige. Dans le premier cas, l'ébauche racinaire se transforme en nodule, dans le second en racine. On pourrait donc s'attendre à ce que les nodules de tige, qui sont initiés au voisinage d'une ébauche racinaire, se comportent comme les nodules racinaires proprement dits : il n'en est rien; ils diffèrent de ces derniers par le fait que seules des souches de *Rhizobium* spécifiques sont capables d'induire leur formation (voir Chapitre I). Le terme nodule de tige est donc amplement justifié. Par rapport aux racines des autres légumineuses, la tige de *S. rostrata* présente donc deux propriétés remarquables : la première est que les sites de nodulation sont préformés et que l'on connaît à l'avance l'emplacement précis où les nodules

vont se développer après l'inoculation par les *Rhizobium*; la seconde porte sur la propriété qu'ont les ébauches racinaires, qui sont continuellement formées lors de la croissance de la tige, de rester sensibles à l'infection par les *Rhizobium* pendant toute la vie de la plante. La formation de nodules peut donc avoir lieu à n'importe quel moment de la vie de la plante, même sur les sites de nodulation apparus les premiers, ce qui représente sans doute un avantage écologique important pour *S. rostrata*.

4.2.- Les trois stades d'infection de la tige de *Sesbania rostrata* et le développement du nodule :

Dans ce chapitre, nous avons montré que le processus d'infection par le *Rhizobium* spécifique de la tige de *S. rostrata* comprenait trois stades principaux :

- un stade d'infection intercellulaire : après attachement des *Rhizobium* à la surface des cellules situées à la base de l'ébauche racinaire, dans la cavité annulaire, ceux-ci pénètrent dans l'espace intercellulaire où ils se multiplient en grand nombre, formant de véritables poches. Au même moment, on observe, sous l'effet d'un mécanisme d'activation qui reste inconnu, une différenciation des cellules du cortex qui s'organisent alors en méristème, avant même d'être infectées par les *Rhizobium*;
- un stade de formation des cordons d'infection : à partir de ces poches, des cordons d'infection se forment. Ils se divisent en de nombreuses branches qui pénètrent à l'intérieur des cellules en division du cortex;

- un stade d'infection intracellulaire : les *Rhizobium* sont libérés du cordon d'infection dans le cytoplasme des cellules où, inclus dans la membrane enveloppe, ils se trouvent sous la forme symbiotique fixatrice d'azote, les bactéroïdes. C'est à ce stade, dès le 5ème ou 6ème jour après l'inoculation, qu'apparaît la coloration rouge de la légghémoglobine et que les nodules présentent une activité nitrogénasique (voir Chapitre III).

Le mode d'infection de la tige de *Sesbania rostrata* est donc unique parmi les légumineuses car on y trouve à la fois une invasion intercellulaire des *Rhizobium*, comme chez l'arachide, et la formation de cordons d'infection, comme chez les légumineuses tempérées. En outre, chez *S. rostrata*, la formation des cordons d'infection ne se fait pas par l'intermédiaire d'un poil absorbant mais à partir d'une multiplication intercellulaire des *Rhizobium*.

Comme dans le cas de l'arachide, les *Rhizobium* de *S. rostrata* se multiplient à l'intérieur d'une substance intercellulaire dense aux électrons. Cette substance est sans doute composée en grande partie de mucopolysaccharides (Dart, 1977). Le stade de l'infection intercellulaire de la tige de *Sesbania rostrata*, comme d'ailleurs celui de type *Arachis*, présente par ailleurs de nombreuses similitudes avec les premiers stades de développement du "crown gall" où *Agrobacterium tumefaciens* pénètre les tissus par l'intermédiaire d'une blessure et se développe essentiellement dans l'espace intercellulaire. Dans le cas d'*Agrobacterium*, la tumeur est induite par transformation de la cellule végétale par insertion d'un fragment d'ADN du plasmide Ti (e.g. Schell et van Montagu, 1977). La multiplication intercellulaire très importante des *Rhizobium* peut en tout cas suggérer l'excrétion par les cellules adjacentes

de composés énergétiques de type opines, substances produites par les cellules végétales du "crown gall" après insertion du fragment d'ADN du plasmide Ti. Par son aptitude à produire une grande quantité de nodules de tige, *Sesbania rostrata* est donc un modèle de choix pour rechercher de tels composés.

4.3.- Le nodule mature :

Il existe deux grands types de nodules : les nodules cylindriques à méristème apical (comme chez la luzerne, le pois, le trèfle), et les nodules sphériques (comme chez le soja, le haricot et les espèces de *vigna*) (Dart, 1977). En général, les nodules qui ont pour origine une invasion intercellulaire directe, comme chez *Atachis*, sont de type sphérique (Corby, 1981) : chez *S. rostrata*, à la différence des nodules du collet qui sont à méristème apical (voir Chapitre I), les nodules de tige matures ressemblent aux nodules sphériques typiques. La croissance ultérieure du nodule se fait par un tissu méristématique circulaire situé dans le cortex interne du nodule. On ignore si le développement de la zone à bactéroïdes se fait par l'infection de nouvelles cellules de ce méristème (figure 23) ou par division de cellules déjà envahies par les *Rhizobium*.

D'autre part, le nodule de tige est unique par la présence dans les cellules du cortex de nombreux chloroplastes. Un cortex photosynthétique entoure donc directement la zone à bactéroïdes et à légghémoglobine qui est le siège de la fixation d'azote.

CHAPITRE III

LA FIXATION D'AZOTE PAR LA SYMBIOSE
RHIZOBIUM - SESBANIA ROSTRATA

✕✕✕

1.- INTRODUCTION

Bien que la symbiose *Rhizobium*-légumineuse soit le résultat d'interactions complexes entre la plante-hôte et la bactérie, elle n'en constitue pas moins une entité particulière dont l'étude est nécessaire pour évaluer et améliorer la fixation d'azote, au même titre que l'étude du *Rhizobium* ou de la plante seule.

Les données globales sur la fixation d'azote par les légumineuses sont très variables et dépendent à la fois de l'espèce de légumineuses et des nombreux facteurs édaphiques et climatiques (Nutman, 1981). On admet cependant que dans un environnement favorable, certaines légumineuses tropicales peuvent fixer plus de 300 kg d'azote/ha/an (Quispel, 1974). Chez les légumineuses tempérées, ces chiffres varient énormément et, bien que la fixation d'azote par le trèfle en Nouvelle-Zélande ait été estimée à 600 kg d'azote/ha/an, de nombreuses données rapportent une fixation d'azote variant en général de 20 à 150 kg d'azote/ha/an (Gibson, 1977). Chez les légumineuses cultivées, cet azote fixé par la symbiose est en grande partie exporté dans les graines (42% de protéines dans les graines de soja) ou dans les fourrages (20% de protéines chez la luzerne), à moins que la légumineuse toute entière ne soit utilisée comme engrais vert, c'est-à-dire enfouie dans le sol pour en accroître la teneur en azote.

Parmi tous les facteurs limitants de la fixation d'azote par les légumineuses, l'un des plus importants est l'inhibition des deux phases principales de la symbiose, la nodulation et la fixation d'azote, par l'azote combiné du sol, la légumineuse perdant ainsi tout l'apport biologique de la symbiose (Pate, 1977). L'intensité de cette inhibition varie en outre suivant la forme de l'azote combiné; l'azote ammoniacal ou l'urée ont un effet beaucoup moins marqué que le nitrate. Deux hypothèses, d'ailleurs imprécises, ont été avancées pour expliquer cette inhibition (Munns, 1977). La première suppose que le nitrate supprime la nodulation en améliorant la nutrition azotée de la plante ou en augmentant le rapport carbone sur azote (C/N) de la plante. La seconde hypothèse qui concerne uniquement la nodulation, est fondée sur l'action locale des nitrates sur le système racinaire : les nitrites provenant de la réduction des nitrates inhiberaient le processus d'infection et de nodulation par interférence avec l'indole-3-acétate (IAA). Les nitrites seraient d'autre part à l'origine de l'inhibition de la nitrogénase des bactéroïdes (Rigaud, 1976; Trinchant et Rigaud, 1980).

Dans ce chapitre, nous avons donc étudié les propriétés de la symbiose particulière que constituent les nodules de tige de *Sesbania rostrata*. L'étude a d'abord porté sur la capacité des nodules de tige à apporter à la plante la quantité d'azote dont elle a besoin. Nous avons ensuite évalué la quantité d'azote fixé par les nodules de tige de *S. rostrata* et en avons envisagé les conséquences agronomiques.

2.- MATERIEL ET METHODES

2.1.- Souches bactériennes :

Les souches utilisées dans cette étude sont les souches de tige ORS571 et ORS551.

2.2.- Milieux de culture pour la plante :

Les milieux de culture utilisés sont les milieux J0 et JN (voir Chapitre I, paragraphe 2.4.2.)

2.3.- Méthodes de culture des plantes :

2.3.1.- Culture en tubes :

Cette méthode est décrite au Chapitre I.

Alors que dans le cas de l'inoculation des racines, la formation des nodules est immédiate, il est nécessaire, afin d'obtenir une nodulation caulinaire importante, que les plantes soient assez développées pour porter des sites de nodulation sur la tige. C'est pourquoi, en vue d'étudier l'effet de l'azote combiné sur la nodulation, les plantes sont maintenues pendant 10 jours sur le milieu azoté JN (voir Chapitre I, paragraphe 2.4.2.). Au moment de l'inoculation des racines ou des tiges, le milieu JN est vidé à l'aide d'une seringue reliée à une pompe aspirante et remplacé soit par du milieu J0, soit par du milieu JN. Les milieux J0 et JN sont entièrement renouvelés dans les tubes, tous les deux jours, jusqu'à la fin de l'expérience. Les tiges sont inoculées par pulvérisation d'une

suspension de la souche ORS571 sur les sites de nodulation mais, de nouveaux sites apparaissant au cours de la croissance de la plante, une nouvelle inoculation de la tige est effectuée 1 semaine après la première inoculation. Les nodules caulinaires et racinaires sont visibles 3 à 4 jours après l'inoculation.

2.3.2. - Culture en cylindres (Legg et Sloger, 1975) :

Les plantes sont cultivées dans des cylindres de 30x60 cm, hermétiquement fermés dans leur partie inférieure, enfoncés dans le sol en place jusqu'à 10 cm du bord supérieur et remplis de sol soigneusement homogénéisé. Ce dispositif simule de façon satisfaisante l'expérimentation au champ classique. On sème 10 graines par cylindre. Lorsque les plantes atteignent 20 cm de hauteur, 10 jours après les semis, on procède à un démariage de façon à ne laisser qu'une plante par cylindre. On arrose alors abondamment de façon à maintenir une lame d'eau de 5 à 10 cm environ à la surface du sol dans chaque cylindre. L'inoculation des tiges par pulvérisation est en général effectuée 30 jours après le semis des plantes.

2.3.3. - Culture en microparcelles et au champ en vue de l'utilisation de *Sesbania rostrata* comme engrais vert :

Les plantes sont cultivées dans des microparcelles de 1 m² et 50 cm de profondeur contenant environ 600 kg de sol sableux, appelé sol dior ou "psamment" dans la classification américaine et contenant 0,4% de carbone et 0,025% d'azote à pH 7,0. Dix jours après le semis, le sol est inondé et les plantes cultivées à raison de 40 plantes par m². L'inoculation des tiges est effectuée 30 jours après le semis. Cinquante jours après le semis, la partie aérienne des plantes (tige, feuilles et nodules) est coupée et enfouie dans l'horizon 0-30 cm du sol. Dix neuf jours

plus tard, des plants de riz âgés de 2 semaines sont repiqués dans les microparcelles qui reçoivent un apport d'engrais phosphaté ($17,5 \text{ g K}_2\text{HPO}_4/\text{m}^2$). Le riz est récolté à maturité. Chaque traitement comporte 12 répétitions.

Le même calendrier est adopté pour la culture au champ en parcelles élémentaires de 20 m^2 où les plantes sont semées en ligne. Chaque traitement comporte 8 répétitions. Afin de comparer en microparcelles et au champ l'effet de *Sesbania rostrata* engrais vert à l'apport d'engrais azoté, des parcelles sont laissées en jachère pendant la croissance de *S. rostrata* et reçoivent, au moment du repiquage du riz, un apport d'azote combiné $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ équivalent à 60 kg d'azote/ha . Des parcelles témoins ne reçoivent aucun apport d'azote.

2.4.- Mesure de l'activité fixatrice d'azote sur les plantes :

L'activité nitrogénase des nodules est mesurée par la méthode de réduction de l'acétylène en éthylène (Hardy et coll., 1968).

Les racines ou les tiges des plantes adultes sont coupées et introduites dans des flacons sérum de 250 ou 500 ml hermétiquement bouchés. Les mesures de fixation d'azote sur les racines ou les tiges de plantes cultivées en tubes sont effectuées dans des fioles de 50 ml. On injecte alors l'acétylène à la concentration finale de 10%. Après 30 mn et 1 h d'incubation à 30°C , des échantillons gazeux de 0,5 ml sont prélevés et la quantité d'éthylène présente dans l'échantillon est mesurée par chromatographie en phase gazeuse. On utilise un chromatographe Varian Aerograph, série 1400, à ionisation de flamme, muni d'une colonne de 120 cm remplie de sphérosil. Les températures sont

les suivantes : injecteur, 120°C; colonne, 75°C; et détecteur à ionisation de flamme, 150°C. Le débit du gaz vecteur N₂ est de 40 ml/mn. La quantité d'éthylène présente dans l'échantillon est déterminée par rapport à un standard.

L'activité réductrice d'acétylène (ARA) est exprimée en μ moles C₂H₂ produites par heure et par gramme de nodule (poids frais).

2.5.- Méthodes d'évaluation de la fixation d'azote par la plante entière :

Afin d'estimer l'azote fixé par la nodulation de *Sesbania rostrata*, nous avons employé deux méthodes différentes :

- La méthode des différences (Weber, 1966) consiste à estimer la quantité d'azote réellement fixé, par la différence de rendement azoté (mesuré par dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl) entre une plante inoculée utilisant à la fois l'azote de l'air et du sol et une plante non inoculée utilisant uniquement l'azote du sol. Dans le cas du dispositif de culture en cylindres où le volume du sol exploré par les racines des plantes inoculées ou non inoculées est le même, cette méthode permet d'estimer la fixation d'azote de façon précise. Par contre, une des difficultés de cette méthode, pour l'étude de la nodulation de tige, est d'obtenir, au champ, des plantes témoins non nodulées sur la tige.

- La méthode des bilans a été employée dans le cas de l'utilisation de *S. rostrata* comme engrais vert pour la culture du riz. Au moment de la récolte du riz, la quantité d'azote fixé est déterminée par la différence entre l'azote total (riz plus sol) d'une parcelle ayant reçu de l'engrais vert, et l'azote total (riz plus sol) d'une parcelle témoin n'ayant pas reçu d'engrais vert.

2.6.- Analyse d'azote dans les sols :

Chaque échantillon de sol est tamisé afin de séparer la partie minérale (fraction inférieure à 2 mm) des débris végétaux (fraction supérieure à 2 mm comprenant en outre les débris des tiges et des feuilles de *Sesbania rostrata* incorporés au sol). La partie minérale est séchée et homogénéisée. Les débris végétaux, après avoir été lavés à l'eau courante, sont séchés à 60°C et réduits en fine poudre. Des échantillons de 1 g de sol et de 100 mg de débris végétaux sont utilisés pour les analyses d'azote effectuées suivant la méthode de microkjeldahl au peroxyde d'hydrogène (Rinaudo, 1970).

3.- RESULTATS

3.1.- La fixation d'azote par *Sesbania rostrata* :

3.1.1.- Mesure de l'activité fixatrice d'azote sur la plante entière :

La mesure de l'activité fixatrice d'azote des nodules de tige et de racines de *S. rostrata* ainsi que le poids respectif des nodules sont donnés au tableau 5. Les plantes âgées de 3 mois étaient au stade de la floraison. L'inoculation des tiges a été effectuée 20 et 50 jours après le semis par pulvérisation d'une culture de la souche ORS551.

Les résultats montrent que l'activité réductrice d'acétylène de *S. rostrata* est très importante (environ 600 μ moles de C_2H_4 /h/plante) et qu'elle est plus élevée dans les nodules situés sur le haut de la tige que sur le bas, cette différence reflétant sans doute l'âge des nodules, les nodules du haut de la tige étant apparus en dernier. D'autre part, le tableau 5 montre que l'activité fixatrice des nodules de racines ne représente qu'environ 13% de l'activité totale.

3.1.2.- Mesure de la quantité d'azote fixé par les nodules de tige :

Afin de déterminer la quantité d'azote fixé par les nodules de tige de *S. rostrata*, nous avons comparé le contenu en azote total de plantes inoculées sur la tige à celui de plantes témoins non inoculées. Les plantes, âgées de 35 jours, avaient été inoculées par pulvérisation sur les tiges de la souche ORS571 20 jours après le semis. Les résultats rapportés au tableau 6 montrent que l'effet de l'inoculation des tiges

TABLEAU 5 : Activité nitrogénase des nodules de tige et de racines de *Sesbania rostrata*

		Activité nitrogénase	
		Totale	Par g de nodules
		$\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$	$\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{h/g}$
Nodules de tige	tige 1-2 m	$7,2 \pm 0,5$	377 ± 33
	tige 0-1 m	$7,8 \pm 0,7$	$53,0 \pm 3,5$
Nodules de racines		42 ± 6	$22,6 \pm 3,0$
Total par plante		$17,4 \pm 1,2$	$16,8 \pm 1,3$
			—

Les chiffres sont la moyenne de 7 répétitions.

TABLEAU 6 : Effet de l'inoculation des tiges sur le poids sec et la teneur en azote de *Sesbania rostrata*

	Tiges non inoculées			Tiges inoculées		
	Poids sec (g)	Azote (%)	Azote total (g)	Poids sec (g)	Azote (%)	Azote total (g)
Tiges	16,33	1,13	0,18	26,82	1,03	0,28
Feuilles	13,21	3,07	0,39	17,13	3,9	0,66
Total partie aérienne	29,54	1,93	0,57	43,95	2,13	0,94

Chaque chiffre est la moyenne de 10 répétitions. Les valeurs correspondantes entre tiges inoculées et tiges non inoculées sont toutes significativement différentes sauf les teneurs en azote (%) des tiges.



FIGURE 26 : Effet de l'inoculation des tiges (parcelle de droite) sur la croissance de *Sesbania rostrata*.

(figure 26) est positif sur le poids et l'azote total de la plante. Dans les conditions de culture en cylindres inondés de cette expérience, l'activité réductrice d'acétylène des nodules racinaires des plantes inoculées s'est avérée négligeable (inférieure à 10 μmoles de C_2H_4 /plante au moment où les plantes ont été récoltées) alors que celle des nodules de tige (5 g/plante) était supérieure à 170 μmoles de C_2H_4 /h/plante au moment où les plantes ont été récoltées (35 jours). Les plantes non inoculées ne portaient aucun nodule de tige mais présentaient au niveau des racines, une activité nitrogénase très faible, comparable à celle des racines des plantes inoculées.

On peut donc considérer que la totalité de l'azote fixé déterminée par la méthode des différences (voir paragraphe 2.5.), l'a été par les nodules de tige. Dans ce cas, cette quantité d'azote correspond à : $0,942 - 0,574 = 0,368$ g d'azote fixé par plante. Si l'on admet que la fixation est effectuée 5 jours après l'inoculation (voir Chapitre II), cette quantité d'azote a donc été fixée par les nodules de tige en 10 jours et correspond, par extrapolation, à 184 kg d'azote fixé par hectare en 50 jours (100 000 plantes/ha).

3.2.- Influence de l'azote combiné sur la nodulation caulinaires de *Sesbania rostrata* :

3.2.1.- Effet de l'azote combiné (NH_4NO_3 , 3 mM) sur de jeunes plantes de *Sesbania rostrata* cultivées en tubes :

L'expérience a consisté à comparer la nodulation et la fixation d'azote de jeunes plantes de *S. rostrata* comportant, soit uniquement des nodules racinaires, soit uniquement des nodules caulinaires, soit les deux types de nodules, et cultivées en tubes en présence ou en absence d'azote combiné (NH_4NO_3 , 3 mM). La méthode de culture est décrite au paragraphe 2.3.1. de ce chapitre.

Le tableau 7 donne les résultats obtenus pour la croissance, la nodulation et la fixation d'azote des plantes récoltées 3 semaines après l'inoculation : ces résultats montrent que, comme chez les autres légumineuses, la nodulation racinaire de *S. rostrata* est fortement inhibée par l'azote (milieu JN). Par contre, sur le même milieu azoté, la nodulation caulinaire n'est pas diminuée; bien plus, elle est augmentée. On observe les mêmes effets en ce qui concerne la fixation d'azote (tableau 7). Il est intéressant de constater que ce sont les plantes cultivées en milieu JN et pourvues de nodules caulinaires (avec ou sans nodules racinaires) qui ont le rendement en azote total le plus élevé, suggérant que ces plantes ont utilisé à la fois l'azote combiné et l'azote de l'air.

3.2.2.- Effet de l'azote combiné sur la nodulation des plantes adultes :

Afin de vérifier sur des plantes adultes, les résultats obtenus en tubes, nous avons comparé l'influence de deux doses d'azote, N_{20} et N_{200} , équivalentes à 20 à 200 kg d'azote/ha, sur la nodulation caulinaire et la fixation d'azote de *S. rostrata* cultivée en cylindres étanches. Dans cette expérience, l'inoculation de la tige par pulvérisation de la souche ORS571 a été effectuée 3, 5, 7 semaines après le semis. Les doses d'azote ont été apportées en une seule fois, sous forme d'urée, en même temps que la première inoculation (3ème semaine).

Une semaine après l'inoculation et l'apport d'azote combiné on observe à l'emplacement des sites de nodulation des tiges, l'apparition de nodules aussi bien sur les plantes témoins n'ayant pas reçu d'azote (traitement N_0) que sur les plantes ayant reçu l'équivalent de 20 et 200 kg d'azote/ha (traitement N_{20} et N_{200}). Aucun nodule nouveau ne se forme sur les racines. Les mesures de fixation d'azote effectuées 2 semaines

TABLEAU 7 : Nodulation et fixation d'azote par *Sesbania rostrata* cultivée en tubes en présence et en absence d'azote combiné

Milieu de croissance	Inoculation	Nodules (poids frais, mg/plante)	Activité nitrogénase (nmole C ₂ H ₄ /h/plante)	Partie aérienne		
				Poids frais (g/plante)	Azote (%)	Azote total (mg/plante)
J0	non inoculé	0	0	0,5 c	0,96 d	0,9 d
	racines seules	275 a	5 946 a	3,0 b	3,02 a	14,2 c
	racines et tiges	R T 246 b 91 d	5 403 ab 2 639 d	3,4 b	3,04 a	15,8 bc
	tiges seules	65 d	1 448 d	1,0 c	2,60 ab	4,4 d
JN (NH ₄ NO ₃ , 3mM)	non inoculé	0	0	5,8 a	1,86 c	14,5 c
	racines seules	27 e	148 e	5,9 a	2,06 bc	16,5 bc
	racines et tiges	R T 23 e 133 c	95 e 3 944 c	6,0 a	3,11 a	26,1 a
	tiges seules	160 c	4 545 bc	5,6 a	3,03 a	23,7 ab

Les résultats (moyenne de 10 répétitions) concernant le poids des nodules et l'activité nitrogénase sont donnés séparément pour les nodules racinaires (R) et caulinaires (T). Dans chaque colonne, ne sont pas significativement différentes (P = 0,05), les moyennes suivies de la même lettre (Test de Duncan, 1955)

TABLEAU 8 : Activité nitrogénase des nodules de tige de *Sesbania rostrata* en fonction de l'azote combiné du sol apporté à des doses de 0,20 et 200 kg d'azote/ha.

Traitement	Nodules (poids frais, g/plante)	Activité nitrogénase	
		par plante (μ mole C ₂ H ₄ /h)	par g de nodules (μ mole C ₂ H ₄ /h/g)
N ₀	1,13	62,3	55,0
N ₂₀	1,12	59,7	53,2
N ₂₀₀	1,34	54,9	40,9

Les mesures ont été effectuées 9 jours après l'inoculation des tiges.
 Dans chaque colonne, les chiffres ne sont pas significativement différents
 (P = 0,05) (Test de Duncan, 1955).

TABLEAU 9 : Effet de l'azote combiné sur la nodulation et le poids sec de *Sesbania rostrata* âgée de 2 mois et demi

Traitement	Poids sec (g/plante)				% Azote				Azote total (g/plante)			
	Nodules	Tige	Feuilles	Total	Nodules	Tige	Feuilles	Total	Nodules	Tige	Feuilles	Total
N ₀	4,2	108	39,2	151,4	3,77	0,79	3,72	1,64	0,16	0,85	1,46	2,47
N ₂₀	4,5	108	41,0	153,5	3,62	0,69	3,65	1,57	0,16	0,74	1,46	2,36
N ₂₀₀	4,5	129	43,5	177,0	3,85	0,75	3,42	1,46	0,17	1,0	1,48	2,65

Dans chaque colonne, les chiffres ne sont pas significativement différents (P = 0,05).

après l'inoculation montrent que la fixation d'azote par plante et le poids du nodule ne sont pas significativement différents pour les trois traitements N_0 , N_{20} et N_{200} , bien que l'activité fixatrice d'azote paraisse légèrement plus faible dans le cas du traitement N_{200} (tableau 8).

L'effet des traitements N_0 , N_{20} et N_{200} sur le poids sec et la teneur en azote des plantes récoltées 11 semaines après le semis est rapporté au tableau 9. Ces données confirment que la nodulation caulinaire n'est pas affectée par une forte dose d'azote combiné (200 kg d'azote/ha), le poids de nodules de tige étant sensiblement le même pour les trois traitements. De plus, les poids secs et l'azote total des plantes dans les trois traitements N_0 , N_{20} et N_{200} n'étant pas significativement différents, ces résultats montrent que dans cette expérience, en 50 jours, la fixation d'azote par les nodules de tige a eu le même effet sur la croissance de la plante que 200 kg d'azote/ha apportés sous forme d'engrais.

3.3. - Intérêt agronomique de *Sesbania rostrata* :

Le but de cette expérience a été de déterminer les effets en microparcelles de l'utilisation de *S. rostrata* sur le rendement en riz et sur la quantité d'azote restant dans le sol après la récolte.

Les résultats sont rapportés au tableau 10. Ils montrent que, dans le cas du traitement ayant reçu l'engrais vert de *S. rostrata*, les rendements en matière sèche du riz (grains et paille) sont plus de 2 fois supérieurs à ceux du traitement témoin. L'apport d'une fumure azotée a eu un effet moindre que celui de l'engrais vert. D'autre part, les teneurs en azote (% d'azote) des grains et paille de riz ayant reçu de l'engrais vert sont environ supérieures de 50% aux autres traitements. Si l'on considère la quantité d'azote total (grains et paille) dans

le traitement engrais vert, celle-ci est environ 4 fois supérieure à celle du traitement témoin et 2 fois supérieure à celle du traitement ayant reçu 60 kg d'azote combiné.

Nous avons pu estimer la quantité d'azote fixé par *S. rostrata* en utilisant la méthode des bilans (paragraphe 2.5.).

Les chiffres donnés au tableau 10 (moyenne de 6 répétitions) montrent que l'azote total du riz est augmenté de $18,2 - 4 = 14,2 \text{ g/m}^2$ et l'azote total du sol de $179 - 134 = 45 \text{ g/m}^2$. En extrapolant à l'hectare et en calculant l'erreur standard pour les 6 répétitions, on obtient un gain d'azote total de $142 \pm 48 \text{ kg d'azote/ha}$ exporté par le riz et $445 \pm 266 \text{ kg d'azote/ha}$ restant dans le sol.

En tenant compte des valeurs les plus basses, la quantité d'azote apportée par l'engrais vert, c'est-à-dire fixé par *S. rostrata* en 50 jours peut donc être estimée à $(142 - 48) + (445 - 266) = 273 \text{ kg d'azote/ha}$.

Les résultats obtenus en microparcelles ont été confirmés par des essais au champ réalisés dans une rizière de Casamance. Le rendement en riz (grains) est passé de 1,5 t/ha dans les parcelles témoins à 4,5 t/ha dans les parcelles ayant reçu de l'engrais vert (8 répétitions de 20 m² chacune); les parcelles ayant reçu 60 kg d'azote combiné par hectare ont eu un rendement de 2,0 t/ha.

L'utilisation de *S. rostrata* comme engrais vert a donc permis de doubler le rendement en riz dans les conditions naturelles de culture.

TABLEAU 10 : Influence de l'utilisation de *Sesbania rostrata* comme engrais vert sur le rendement en riz et sur l'azote du sol

Traitement	Rendement en riz (g/m ²)		Teneur en azote du riz (%)		Azote total du riz (g/m ²)	Azote restant dans le sol (g/m ²)		
	grains	paille	grains	paille		Fraction < 2mm	Fraction > 2mm	Total
<i>Sesbania rostrata</i> (engrais vert)	596 a	772 a	1,80 a	0,94 a	18,2 a	147 a	30,0 a	179 a
Fertilisation (60 kg d'azote/ha)	381 b	484 b	1,27 b	0,49 b	7,2 b	135,5 ab	3,1 b	138,6 b
Témoin	212 c	276 c	1,14 b	0,58 b	4,0 c	128,8 b	3,6 b	132,4 b

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

4.- DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons montré que la fixation d'azote par les nodules de tige de *Sesbania rostrata* présente deux propriétés remarquables :

- La première réside dans le fait que la capacité de *S. rostrata* à fixer l'azote est considérable. Les mesures de fixation d'azote sur une plante adulte montrent que *S. rostrata* a une activité fixatrice d'azote d'environ 600 μmoles de $\text{C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$, ce qui correspond à une activité très forte comparée à celle du soja qui varie en général entre 14 et 120 μmoles $\text{C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$ (Sloger et coll., 1975). D'autre part, en utilisant à la fois la méthode des différences et la méthode des bilans (voir paragraphe 2.5.), nous avons pu estimer que la quantité d'azote fixé par *S. rostrata* correspond, au minimum, à l'apport de 200 kg d'azote/ha en 50 jours, ce qui en fait un des plus puissants systèmes fixateurs connus.

- La seconde propriété de *S. rostrata* est son aptitude à noduler et fixer l'azote en présence de doses très élevées d'azote combiné (200 kg/ha) dans le sol. *S. rostrata*, qui est donc le seul système fixateur connu parmi les plantes supérieures qui ne soit pas inhibé par l'azote minéral du sol, peut donc simultanément assimiler l'azote du sol et l'azote moléculaire, ce qui représente un grand avantage sur le plan agronomique. Ces résultats renforcent la théorie de l'action inhibitrice locale des nitrates vis-à-vis de la nodulation racinaire. Nous avons d'ailleurs montré que l'application de 15 mM de NH_4NO_3 sur les sites de nodulation de la tige, retardait d'une semaine la nodulation.

Les capacités fixatrices d'azote élevées de *S. rostrata* et son aptitude à croître dans les terrains inondés nous ont permis d'utiliser *S. rostrata* comme engrais vert dans les rizières. Les expériences conduites au champ ont ainsi montré que *S. rostrata* peut doubler ou même tripler le rendement en riz (grains) sans aucun apport d'engrais azoté.

CHAPITRE IV

ETUDE TAXONOMIQUE DES *RHIZOBIUM* DE TIGE DE *SESBANIA ROSTRATA*

✱✱✱

1.- INTRODUCTION

Le genre *Rhizobium*, tel qu'il est défini actuellement, comprend les bactéries capables de former sur les racines des légumineuses, des nodules susceptibles de fixer l'azote atmosphérique. Bien que la spécificité de nodulation entre une souche de *Rhizobium* et un groupe de légumineuses ait permis de définir plusieurs espèces, le genre *Rhizobium* est traditionnellement subdivisé en deux groupes caractérisés par leur taux de croissance sur milieu mannitol-extrait de levure : les *Rhizobium* à croissance rapide qui nodulent essentiellement les légumineuses des pays tempérés et les *Rhizobium* à croissance lente qui nodulent les légumineuses des pays tropicaux (Jordan et Allen, 1974).

Cette subdivision est basée sur des études de taxonomie numérique (Graham, 1964; t'Mannetje, 1967; Moffett et Colwell, 1968) qui montrent que non seulement le type de flagellation diffère entre les deux groupes mais aussi, le métabolisme et l'utilisation des substrats carbonés (Martinez-De Drets et Arias, 1972; Skotnicki et Rolfe, 1978), la composition des polysaccharides et les propriétés antigéniques (Graham, 1963; Kennedy, 1976; Vincent, 1977; Dudman, 1978), et la composition en certaines protéines (Roberts et coll., 1980). D'autre part, des études portant sur la composition en guanine et cytosine (GC %) de l'ADN (De Ley et Rassel, 1965), l'hybridation d'ADN (Heberlein et coll., 1967; Gibbins et Gregory, 1972) et l'analyse de l'ARN ribosomal (De Schmedt et De Ley, 1977) ont confirmé la subdivision entre les

Rhizobium à croissance rapide et les *Rhizobium* à croissance lente et démontré les relations étroites entre les *Rhizobium* à croissance rapide et les *Agrobacterium* (De Ley et Rassel, 1965). Tous ces résultats ont conduit récemment Jordan (1982) à proposer que les *Rhizobium* à croissance lente (*Rhizobium japonicum* et *Rhizobium* du groupe "cowpea") soient placés dans un nouveau genre appelé *Bradyrhizobium*. Cette nouvelle classification n'inclut cependant pas les *Rhizobium* tropicaux à croissance rapide dont font partie les *Rhizobium* nodulant le genre *Sesbania* (Trinick, 1978).

Nous avons vu au chapitre I qu'il existait pour la nodulation de *Sesbania rostrata* une spécificité tige-racine; il était donc intéressant de savoir si les souches de tige et de racines de *S. rostrata* constituaient deux groupes différents de *Rhizobium*. Dans ce chapitre, nous avons comparé taxonomiquement souches de tige et de racines en incluant dans cette étude d'autres souches de *Rhizobium* tropicaux à croissance rapide ou à croissance lente.

2.- MATERIEL ET METHODES

2.1.- Souches de Rhizobium :

Les tableaux 11, 12, 13 donnent la liste des 66 souches de *Rhizobium* utilisées dans l'étude de taxonomie numérique. Les 20 souches de *Rhizobium* isolées de nodules de tige de *Sesbania rostrata* proviennent toutes de lieux géographiques différents du nord SÉNÉGAL, souvent distants de plus de 100 km. Les 9 souches de racines de *Sesbania* ont été isolées à partir de nodules racinaires de *Sesbania rostrata* ou de *Sesbania pachycarpa*.

Afin de comparer les propriétés taxonomiques des souches de *Sesbania* à d'autres souches de *Rhizobium*, nous avons inclus dans cette étude 20 souches de *Rhizobium* à croissance rapide (14 souches tropicales isolées d'*Acacia* et de *Leucaena* et 6 souches de *Rhizobium* tempérés) et 17 souches de *Rhizobium* à croissance lente (*Rhizobium* "cowpea" et *Rhizobium japonicum*) appartenant au nouveau genre *Bradyrhizobium*.

2.2.- Milieux de culture et inoculation :

De nombreux tests de taxonomie ont été réalisés sur le milieu classique YM de Vincent (voir Chapitre I).

L'assimilation de différents substrats carbonés a été réalisée selon Stanier et coll. (1966) sur le milieu de base suivant :

Na₂HPO₄, 12H₂O : 3,77 g; KH₂PO₄ : 0,98 g; NH₄Cl : 0,5 g; Na-glutamate : 0,5 g; MgSO₄, 7H₂O : 30 mg; Tampon Tris-HCl 1 M, pH 7,5 : 10 ml; agar Noble (Difco) : 15 g; eau distillée Q.S.P. 1 l.

1 ml d'une solution d'oligoéléments et de vitamines (Bergersen et coll., 1976) a été ajouté au milieu.

TABLEAU 11: Souches de *Rhizobium* de tige et de racines de *Sesbania*
utilisées dans l'étude de taxonomie numérique

Groupe de <i>Rhizobium</i>	N° de souche	Plante-hôte d'isolement	Source
<i>Rhizobium</i> de tige de <i>Sesbania rostrata</i>	ORS551	<i>Sesbania rostrata</i>	l'auteur
	ORS553		
	ORS555		
	ORS556		
	ORS557		
	ORS559		
	ORS560		
	ORS561		
	ORS562		
	ORS563		
	ORS564		
	ORS565		
	ORS567		
	ORS569		
	ORS570		
	ORS571		
	ORS574		
	ORS576		
	ORS577		
	ORS579		
<i>Rhizobium</i> de racines de <i>Sesbania</i>	ORS51	<i>Sesbania rostrata</i>	l'auteur
	ORS52	" " " "	
	ORS53	" " " "	
	ORS56	" " " "	
	ORS507	<i>Sesbania pachycarpa</i>	
	ORS508	" " " "	
	ORS509	" " " "	
	ORS510	" " " "	
	ORS511	" " " "	

TABLEAU 12 : Souches de *Rhizobium* à croissance lente utilisées
dans l'étude de taxonomie numérique

Groupe de <i>Rhizobium</i>	N° de souche	Plante-hôte d'isolement	Source
<i>Rhizobium</i> "cowpea" (<i>Vigna</i>)	ORS801	<i>Acacia holosericea</i>	l'auteur
	ORS802	<i>Acacia sieberiana</i>	"
	ORS803	<i>Acacia bivenosa</i>	"
	ORS806	<i>Leucaena leucocephala</i>	"
	ORS809	<i>Acacia albida</i>	"
	ORS401	<i>Glycine max</i> (cv. Malayan)	P. Jara
	ORS403	" " "	l'auteur
	ORS407	" " "	"
	NIG 2	" " "	IITA
	GJ	<i>Glycine javanica</i>	l'auteur
	ORS3P1	<i>Aeschynomene afraspera</i>	"
	CB756	<i>Macrotyloma africanum</i>	CSIRO
<i>Rhizobium japonicum</i>	USDA135	<i>Glycine max</i>	USDA
	USDA138	" "	USDA
	IITA114	" "	IITA
	IITA101	" "	"
	IITA35	" "	"

TABLEAU 13 : Autres souches de *Rhizobium* à croissance rapide (tropicaux et tempérés) utilisées dans l'étude de taxonomie numérique

Groupe de <i>Rhizobium</i>	N° de souche	Plante-hôte d'isolement	Source
<i>Rhizobium</i> d' <i>Acacia</i> et de <i>Leucaena</i>	ORS901	<i>Acacia senegal</i>	l'auteur
	ORS902	" "	
	ORS903	" "	
	ORS904	<i>Leucaena leucocephala</i>	
	ORS905	" "	
	ORS906	<i>Acacia senegal</i>	
	ORS907	<i>Acacia raddiana</i>	
	ORS908	<i>Acacia bivenosa</i>	
	ORS909	<i>Acacia senegal</i>	
	ORS910	<i>Acacia binevosa</i>	
	ORS911	<i>Acacia farnesiana</i>	
	ORS912	" "	
	ORS915	<i>Leucaena leucocephala</i>	
	ORS916	" "	
<i>Rhizobium meliloti</i>	B56	<i>Medicago sativa</i>	E.L. Schmidt
" "	B57	" "	" "
" "	R29	" "	" "
" "	R30	" "	CIAT
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	B62	<i>Pisum sativum</i>	E.L. Schmidt
" "	B63	" "	" "

Les substrats organiques constituant l'unique source de carbone ont été testés à raison de 2 g /l pour les glucides et 1 g/l pour les autres composés. La liste en est donnée au tableau 14.

L'inoculation sur boîtes de Pétri a été réalisée avec un appareil multipointes (Lovelace et Colwell, 1968) à partir d'une culture liquide. Après 8 à 10 jours d'incubation à 30°C, la présence ou l'absence de croissance ont été déterminées par rapport à une boîte de Pétri témoin ne contenant pas la source de carbone. Les croissances dues à des mutants ont été notées négatives.

2.3.- Etude morphologique :

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

2.4.- Etude de la croissance :

La croissance des souches sur milieu YM liquide à 30°C a été étudiée à l'aide d'un biophotomètre enregistreur de Bonnet-Maury et Jouan.

La croissance a été testée à diverses températures (12°C, 25°C, 37°C, 41°C, 44°C), à divers pH (5, 6, 8, 9) et en présence de hautes concentrations de substrats toniques : NaCl, 0,5%; KNO₃, 8%; KNO₂, 0,5%; azoture de sodium 0,03%.

2.5.- Tests physiologiques et nutritionnels :

Nous avons complété les tests classiques couramment utilisés en taxonomie des *Rhizobium* (t'Mannetje, 1967; Graham, 1964; Jordan et Allen, 1974) par de nombreux tests dont la liste et les méthodes sont décrites par Garcia (1982). Une liste des caractères testés positifs est donnée au tableau 14.

2.6.- Analyse numérique :

Pour l'analyse numérique par ordinateur, les 225 caractères testés sur les 66 souches de *Rhizobium* ont été codés 1 pour positif ou présent, et 0 pour négatif ou absent. Les données ont été traitées suivant la méthode de liaison complète par groupes et la séparation en sous-groupes ou phénons a été déterminée d'après le test statistique de χ^2 sur un ordinateur PDPII avec un programme disponible au Laboratoire de Microbiologie du Milieu Marin de l'Université de Provence à Marseille.

2.7.- Composition en bases de l'ADN (GC %) :

L'ADN de 10 souches représentatives (tableau 15) a été purifié par la méthode de Marmur (1961) complétée par des traitements au phénol à partir de cellules cultivées pendant 2 à 4 jours sur 5 l de milieu YM liquide. Les teneurs en guanine et cytosine ont été déterminées par le Professeur Mandel (University of Texas) suivant la méthode d'ultra-centrifugation en gradient de chlorure de césium, décrite par Schildkraut et coll. (1962) et Mandel et coll. (1968).

2.8.- Comparaison des souches de tige par immunofluorescence :

L'anticorps fluorescent de la souche de *Rhizobium* de tige ORS571 préparé suivant la méthode décrite par Bohlool et Schmidt (1976) nous a été fourni par le Professeur Schmidt.

Les préparations ont été faites à partir de cultures jeunes dont une goutte, prélevée à l'anse de platine, est déposée sur une lame de verre et étalée. Le frottis est séché à l'air et fixé à la chaleur. Une goutte de l'anticorps fluorescent est alors déposée sur le frottis. La lame est incubée sous atmosphère humide et à température ambiante pendant 30 mn environ. Pour éliminer l'excès d'anticorps fluorescent, les lames sont alors rincées avec précaution à l'eau distillée, puis séchées. L'observation au microscope est faite avec un modèle Zeiss à épifluorescence, 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.

3.- RESULTATS

3.1.- Analyse numérique :

Dans cette étude, 225 caractères morphologiques, physiologiques et nutritionnels ont été examinés. Parmi ceux-ci, 113 se sont révélés positifs (tableau 14). L'analyse numérique de ces résultats, par la méthode de liaison complète par groupes et le test de Khi_2 , a permis de distribuer les 66 souches de *Rhizobium* testées en trois groupes principaux : (1) *Rhizobium* à croissance rapide dont les souches de racines de *Sesbania*, (2) *Rhizobium* de tige, et (3) *Rhizobium* à croissance lente (*Bradyrhizobium*), comme le montre le dendogramme de la figure 27.

De plus, à l'intérieur de chacun des trois grands groupes, les souches ont été distribuées en phénons, au degré 0,016 de l'index de Khi_2 (figure 27). Les souches de *Rhizobium* à croissance rapide ont été distribuées en 4 phénons : les *Rhizobium* tempérés (3 souches), les *Rhizobium* d'*Acacia* (12 souches), les *Rhizobium* de racines de *Sesbania* (12 souches) et 2 souches de *Leucaena* et *Acacia*.

Les *Rhizobium* de tige de *Sesbania rostrata* (20 souches) forment un seul phénon très homogène défini au degré 0,005 de l'index de Khi_2 . Ce dernier groupe est plus proche des *Rhizobium* à croissance lente que des *Rhizobium* à croissance rapide.

Les souches de *Rhizobium* à croissance lente ont été distribuées en 2 phénons, les *Rhizobium* "cowpea" (10 souches) et les *Rhizobium japonicum* (17 souches).

La fréquence des caractères positifs des 7 phénons de *Rhizobium* est donnée par le tableau 14.

TABLEAU 14: Fréquence des caractères positifs (%) des sept phénotypes de *Rhizobium* déterminés par l'analyse de taxonomie numérique

Caractères	RHIZOBIUM à croissance rapide				RHIZOBIUM de tige de <i>SESBANIA ROSTRATA</i>	RHIZOBIUM à croissance lente (<i>BRADYRHIZOBIUM</i>)	
	<i>Rhizobium</i> tempérés	<i>Rhizobium</i> d'Acacia	<i>Rhizobium</i> de racines de <i>Sesbania</i>	<i>Rhizobium</i> de <i>Leucaena</i> et <i>Acacia</i>	<i>Rhizobium</i> isolés de nodules de tige	<i>Rhizobium</i> "cowpea"	<i>Rhizobium japonicum</i>
Nombre de souches :	3	12	12	2	20	10	7
1 flagelle latéral (milieu liquide)	0	0	0	0	100	0	0
1 flagelle subpolaire (milieu solide)	0	0	0	0	0	100	100
Flagellation péritriche (milieu solide)	100	100	100	100	100	0	0
Croissance à 12°C	100	100	0	0	100	0	0
Croissance à 44°C	0	0	0	0	100	0	0
Arginine déshydrolase	0	0	16	50	100	0	0
Lysine décarboxylase	0	0	0	0	100	0	0
Dénitrification	33	92	100	0	0	20	71
NO ₃ ⁻ → NO ₂ ⁻	33	92	100	100	100	100	100
Acidification sur glucose	100	100	50	0	0	0	0
Alcalinisation sur glucose	0	0	50	0	100	100	100
Croissance sur NaCl 0,5%	33	92	75	100	0	0	0
Croissance sur KNO ₃ 8%	100	75	58	100	100	0	0
Croissance à pH 8	100	100	100	100	100	0	0
Sucres							
D-Ribose	100	100	100	100	0	100	100
D-Xylose	100	100	100	100	0	100	100
L(-)Xylose	0	75	75	100	0	80	14
D(-)Arabinose	100	100	92	100	0	100	100
L(+)Arabinose	100	100	92	100	0	100	100
Raffinose	100	100	92	100	0	0	0
L-Rhamnose	100	100	100	100	0	40	100
D(+)Glucose	66	100	100	100	100	100	86
D(+)Mannose	100	100	100	100	0	100	86
D(+)Galactose	100	100	100	100	0	100	100
α-D(-)Fructose	33	100	100	100	0	70	100
Saccharose	33	100	100	100	0	70	100
Tréhalose	33	100	100	100	0	70	100
Maltose	66	100	100	100	0	0	14
D(+)Cellobiose	0	100	100	100	0	0	0
Lactose	33	100	100	100	0	0	0
Inuline	0	0	0	0	0	20	100
Gluconate	33	0	56	0	100	100	100
Mucate	33	0	0	0	100	90	71
α-méthyl-D-Glucoside	0	16	16	100	0	0	0
2-céto-Gluconate	33	100	92	0	100	100	28
Acides gras							
Acétate	33	92	100	100	100	100	100
Propionate	33	100	8	50	100	100	14
Butyrate	33	8	0	0	100	90	28
Isobutyrate	33	0	66	50	95	90	57
Valérate	33	0	25	50	100	90	43
Valérianate	33	0	75	50	100	90	28
Isovalérianate	0	0	0	0	100	100	28
Caproate	33	8	0	0	100	90	57
Laurate	0	0	0	0	100	66	57
Pelargonate	0	0	16	0	0	66	43
Caprate	0	0	0	0	0	0	57
Azelaïdate	33	0	0	0	100	100	100
Acides décarboxyliques							
Oxalate	0	0	0	0	0	0	71
Malonate	0	75	16	0	100	40	28
Succinate	66	100	83	100	100	100	100
Maleate	0	0	0	0	95	100	100
Fumarate	33	100	83	100	100	70	43
Glutarate	33	66	0	0	90	80	86
Adipate	0	0	0	0	90	100	100
Pimelate	33	0	0	0	95	100	100
Subérate	33	0	0	0	100	100	100
Crotonate	0	0	0	0	100	100	57
Sebacate	33	0	0	0	100	100	71
Hydroxyacides							
2-Oxoglutarate	0	75	0	100	100	100	100
DL-Malate	0	100	83	50	100	100	71
L(+)Tartrate	33	0	0	0	0	100	100
Mésotartrate	0	0	0	0	0	100	100
DL-Lactate	66	100	58	100	100	50	28
Glycolate	0	0	0	100	0	0	0
DL-Glycérate	33	100	100	100	100	100	100

Acides organiques

Citrate	33	58	50	100	100	90	100
Pyruvate	33	83	100	100	100	100	100
Aconitate	66	0	66	0	100	40	28
Levulinate	0	0	0	0	0	100	43
Citraconate	0	0	0	0	95	20	43
Itaconate	33	0	0	0	100	10	0
Formiate	0	0	25	0	0	30	0
Formate	0	0	16	0	40	30	14
Tartronate	0	0	0	0	0	10	28
D-Glucuronate	33	0	83	0	95	70	71
α -D-Galacturonate	33	8	75	0	100	70	100
Cis-aconitate	33	0	75	50	100	50	43
Trans-aconitate	33	0	66	0	100	50	43

Alcools

Erythritol	33	92	0	50	0	10	28
Mannitol	0	100	100	100	0	80	100
Sorbitol	0	100	100	100	0	10	71
Inositol	0	100	100	100	0	0	0
Adonitol	66	100	100	100	100	100	100
Profane-1,2-diol	0	0	0	0	100	0	0
Butane-2,3-diol	0	0	0	0	100	0	0
Ribitol	66	100	100	100	0	90	57

Composés aromatiques

Benzoate	0	0	83	0	0	0	0
n-hydroxybenzoate	33	0	92	50	100	100	100
p-hydroxybenzoate	0	0	0	0	0	70	86
Quinate	33	58	100	0	90	60	71

Amino-acides

L- α -Alanine	33	83	92	100	100	90	57
β -Alanine	0	92	75	50	0	0	0
L-Leucine	33	92	92	100	100	100	100
L-Aspartate	33	66	16	50	100	100	100
L-Glutamate	33	100	100	100	100	100	100
L-Lysine	33	66	100	50	100	0	0
L-Arginine	0	58	100	100	0	0	0
DL-Ornithine	0	0	0	100	0	0	0
γ -Aminobutyrate	33	75	92	100	0	0	0
L-Histidine	0	75	92	100	0	0	0
DL-Proline	33	75	92	100	95	20	28
L-Phenylalanine	0	0	8	0	0	50	14
L-Asparagine	33	50	83	100	95	100	85

Amines et divers

Methylamine	0	58	0	0	0	0	0
Ethanolamine	33	66	92	50	0	0	0
D-Glucosamine	0	75	100	100	0	70	0
Betaine	33	75	92	100	95	0	0
Sarcosine	33	0	25	0	95	0	0
Hippurate	0	0	92	0	0	0	0
Panthothenate	0	0	8	0	0	60	71
Acetamide	0	0	0	0	25	80	100
Nicotinate	33	0	0	0	100	70	100

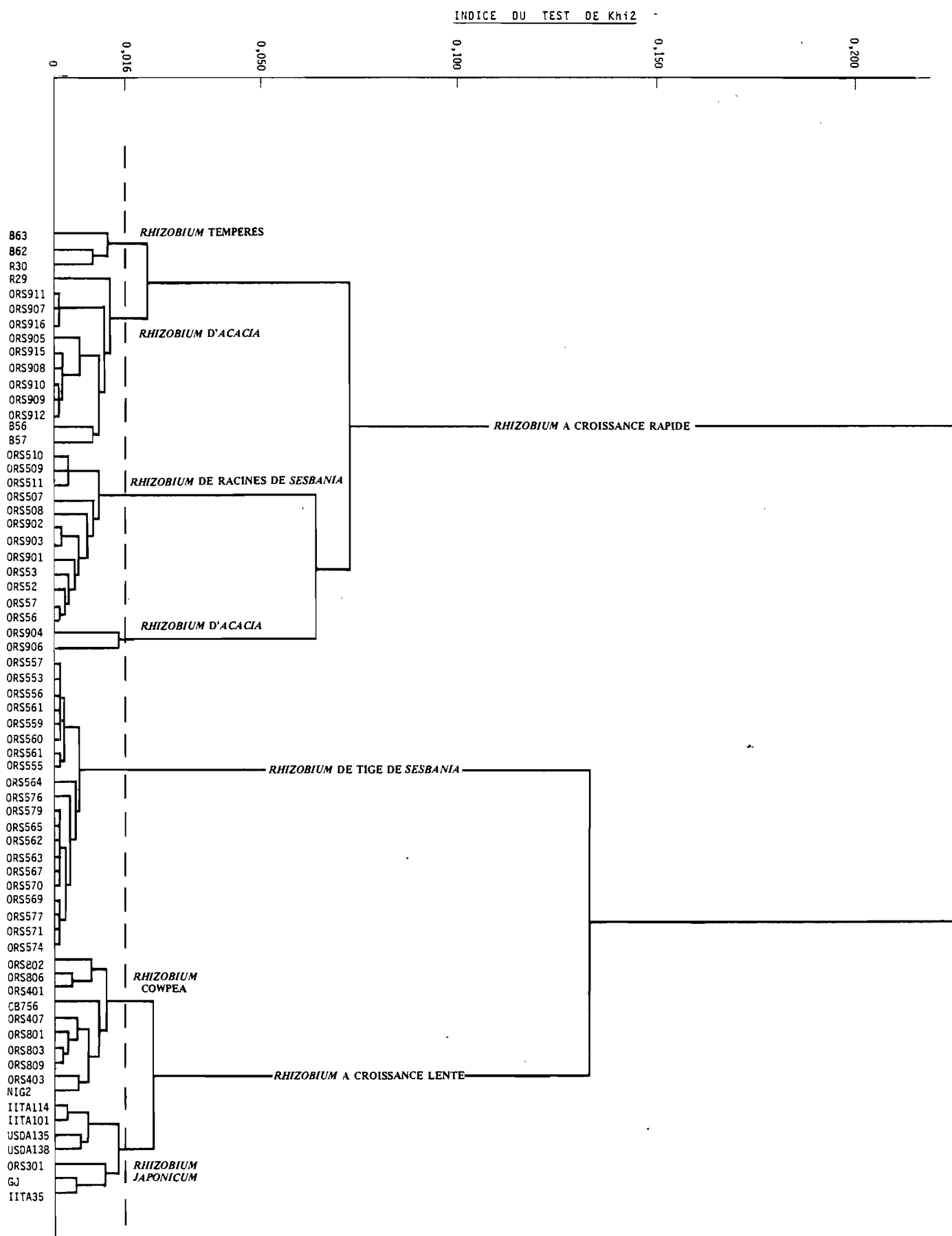


FIGURE 27 : Dendrogramme de taxonomie numérique. Les souches analysées sont distribuées en trois groupes principaux :
 (1) *Rhizobium* à croissance rapide, (2) *Rhizobium* de tige de *Sesbania rostrata* et (3) *Rhizobium* à croissance lente.

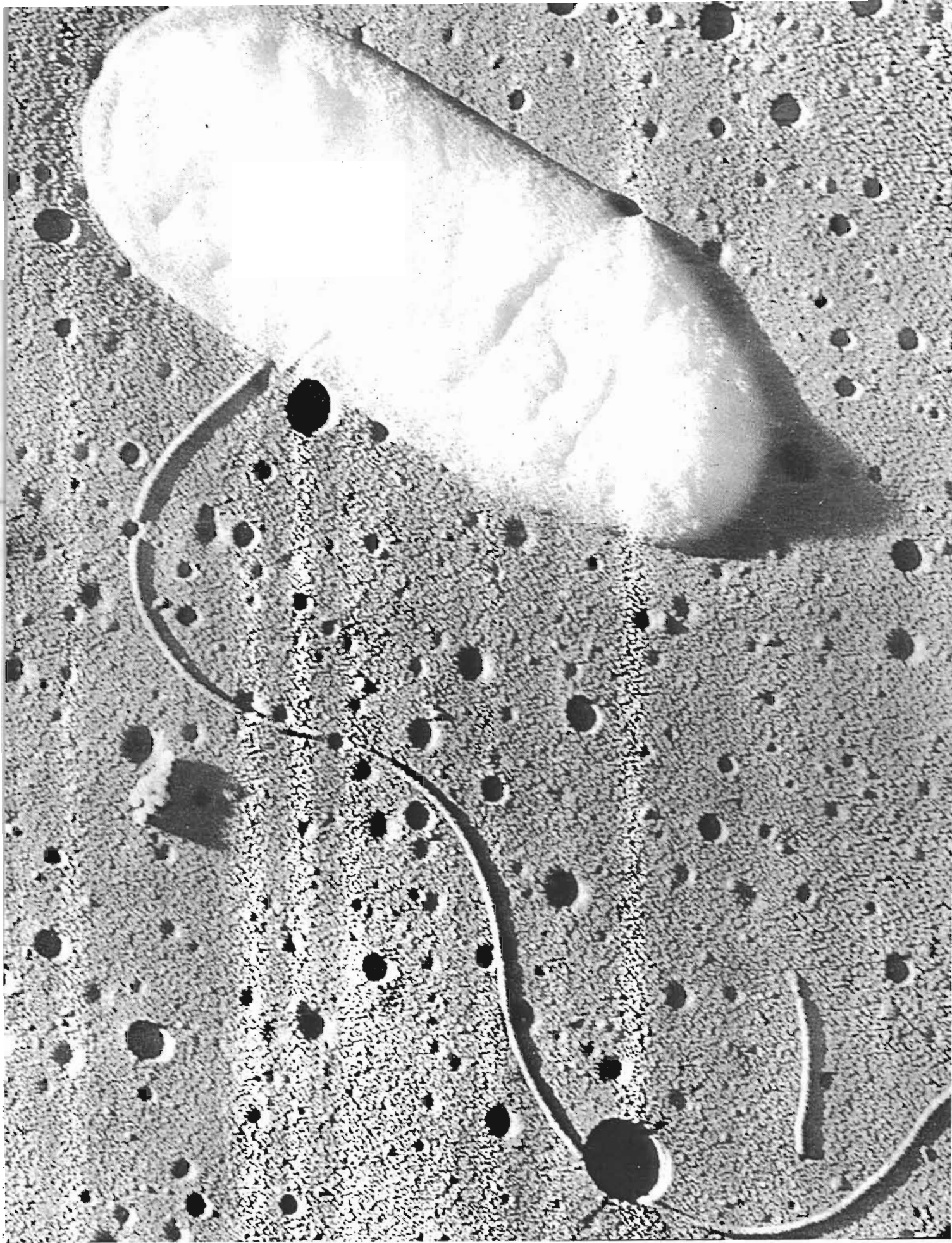


FIGURE 28 : Sur milieu liquide, la souche ORS571 porte un seul flagelle latéral.
Grossissement X100 000.

3.2.- Principaux caractères discriminants des *Rhizobium* de tige par rapport aux autres *Rhizobium* :

3.2.1.- Modulation des plantes-hôtes :

Les tests d'inoculation croisée ont montré que les souches de *Rhizobium* de tige nodulent uniquement tiges et racines de *Sesbania rostrata*. Par contre, les souches de *Rhizobium* de racines de *S. rostrata* forment des nodules ineffectifs sur certaines espèces d'*Acacia* (*Acacia senegal* et *Acacia raddiana*). De même, quelques souches d'*Acacia* et de *Leucaena* forment des nodules ineffectifs sur les racines de *S. rostrata*. On peut donc considérer que notre étude confirme les observations de Trinick (1980) selon lesquelles les *Rhizobium* d'*Acacia*, *Leucaena* et *Sesbania* (racines) sont très proches. Inversement, le spectre d'hôte des *Rhizobium* de tige de *S. rostrata* diffère de celui des *Rhizobium* de racines de *S. rostrata*.

3.2.2.- Caractères morphologiques :

Toutes les souches examinées sont des bâtonnets Gram-négatif mobiles de 0,5 à 0,6 μm de large et 1,5 à 3,0 μm de long contenant des granules de poly- β -hydroxybutyrate.

Sur milieu solide, la flagellation péritriche des *Rhizobium* de tige est identique à celle des *Rhizobium* à croissance rapide. Sur milieu liquide, on n'observe plus qu'un seul flagelle latéral (figure 28) chez les *Rhizobium* de tige, alors qu'un seul flagelle subpolaire caractérise, sur milieu solide ou liquide, les *Rhizobium* à croissance lente.

Sur milieu YM, la forme des jeunes colonies est circulaire, blanche et opaque avec une production plus ou moins importante de polysaccharides suivant les groupes de *Rhizobium*. Ainsi, les colonies de

Rhizobium de tige ne dépassent pas 1 à 2 mm de diamètre sur milieu YM comme la plupart des *Rhizobium* à croissance lente. Par contre, les colonies des *Rhizobium* de racines de *Sesbania* ou d'*Acacia* produisent de très importantes quantités de polysaccharides et peuvent recouvrir toute la surface de la boîte en 4 jours de croissance à 30°C; ces polysaccharides, très liquides, peuvent même couler sur le couvercle lorsque la boîte de Pétri est renversée.

3.2.3.- Caractères physiologiques et biochimiques :

Le temps de génération des souches testées varie suivant le groupe de *Rhizobium* auquel elles appartiennent et le milieu de croissance utilisé : les *Rhizobium* de tige de *Sesbania rostrata* ont un temps de génération de 5 h sur milieu YM et de 3 h lorsqu'on remplace le mannitol par du lactate ou du succinate. Le groupe des *Rhizobium* à croissance rapide a un temps de génération qui varie de 3 h à 5 h sur milieu YM et celui des *Rhizobium* à croissance lente (*Bradyrhizobium*) est de 10 h à 12 h sur milieu YM. Par leur vitesse de croissance, les *Rhizobium* de tige peuvent donc être considérés comme des *Rhizobium* à croissance rapide.

Contrairement à la plupart des autres souches testées, les *Rhizobium* de tige ont besoin d'un apport en vitamines (voir Chapitre V) pour leur croissance en milieu synthétique.

Alors que toutes les souches de *Rhizobium* tropicaux peuvent croître de 24°C à 41°C, seuls les *Rhizobium* de tige sont capables de pousser à la fois à 44°C et à 12°C. Comme les *Rhizobium* à croissance lente, les *Rhizobium* de tige alcalinisent le milieu à partir du glucose alors que les *Rhizobium* à croissance rapide l'acidifient.

Seules, les souches de *Rhizobium* de tige présentent à la fois une activité lysine décarboxylase et arginine déshydrolase et croissent sur KNO_3 (8% w/v). Aucune ne dénitrifie (tableau 14).

3.2.4.- Caractères nutritionnels :

Alors que les souches à croissance rapide et à croissance lente utilisent la plupart des sucres classiques (tableau 14), les souches de tige n'utilisent que le glucose.

Par leur utilisation de nombreux acides gras et acides organiques, les *Rhizobium* de tige se rapprochent beaucoup des *Rhizobium* à croissance lente. Ils diffèrent à la fois des *Rhizobium* à croissance lente et rapide pour l'utilisation des alcools et contrairement à la plupart des *Rhizobium*, ils n'assimilent pas le mannitol pourtant employé de façon classique dans de nombreux milieux pour *Rhizobium*; cependant, les *Rhizobium* de tige sont les seuls parmi les souches testées à utiliser le butane-2,3-diol et le propane-1,2-diol, ces composés pouvant sans doute être utilisés dans des milieux sélectifs.

3.3.- Composition en guanine plus cytosine de l'ADN (GC %) :

Le GC % de 10 souches représentatives des trois groupes de *Rhizobium* est donné par le tableau 15. Le GC % des 6 souches de *Rhizobium* à croissance rapide varie de 61 à 63%, celui des 2 souches de racines de *Sesbania* étant respectivement 62 et 61%. Le GC % des 2 souches de *Rhizobium* à croissance lente est de 64% et celui des 2 souches de *Rhizobium* de tige est de 66%. Le pourcentage guanine plus cytosine des *Rhizobium* de tige est donc légèrement supérieur aux GC % indiqués dans la littérature pour les *Rhizobium* : 59,5 à 65,5 % (De Ley, 1968), bien que des GC % de 68 à 69% aient été trouvés chez des *Rhizobium* nodulant *Lotononis* (Godfrey, 1972).

TABLEAU 15 : Composition en Guanine + Cytosine (GC %) de l'ADN
de dix souches représentatives des trois groupes
de *Rhizobium*

Groupe de <i>Rhizobium</i>	N° de souche	Origine	GC %
<i>Rhizobium</i> à croissance rapide	R29	<i>Rhizobium meliloti</i>	62
	R30	<i>Rhizobium meliloti</i>	61
	ORS901	<i>Acacia senegal</i>	62
	ORS903	<i>Acacia senegal</i>	63
	ORS56	<i>Sesbania rostrata</i> (racines)	62
	ORS509	<i>Sesbania pachycarpa</i>	61
<i>Rhizobium</i> de tige de	ORS551	Nodules de tige	66
<i>Sesbania rostrata</i>	ORS571	Nodules de tige	66
<i>Rhizobium</i> à croissance lente	ORS802	<i>Acacia sieberiana</i>	64
(<i>Bradyrhizobium</i>)	ORS407	<i>Glycine max</i> (cv. Malayan)	64

3.4.- Comparaison des souches de "Rhizobium" de tige par immunofluorescence :

Nous avons vu au paragraphe 3.1. que les 20 souches de *Rhizobium* de tige forment un seul phénotype très homogène défini au degré 0,005 de l'index K_{hi2} . En effet, seuls 14 caractères positifs n'atteignent pas une fréquence de 100% (tableau 14). Nous avons donc comparé les propriétés antigéniques de ces 20 souches en utilisant l'anticorps fluorescent de la souche de *Rhizobium* de tige ORS571. Sur les 20 souches testées (dont ORS571), toutes donnent une réaction sérologique croisée avec l'anticorps de la souche ORS571; 13 souches (dont ORS571) donnent une fluorescence maximale, 7 souches une fluorescence moyenne. Ces résultats immunologiques montrent la grande similitude entre des souches de *Rhizobium* de tige isolées dans des lieux différents. Par contre, aucune des souches de *Rhizobium* de racines de *S. rostrata* n'a donné de réaction sérologique croisée avec l'anticorps de la souche ORS571.

4.- DISCUSSION ET CONCLUSION

L'analyse de taxonomie numérique a permis de séparer les 66 souches étudiées en trois grands groupes : les *Rhizobium* isolés de nodules de tige de *Sesbania rostrata*, les *Rhizobium* tempérés et tropicaux à croissance rapide, et les *Rhizobium* à croissance lente. Notre étude a donc montré que les *Rhizobium* de tige sont taxonomiquement différents des *Rhizobium* isolés des nodules racinaires de *Sesbania rostrata*. Ces derniers sont très proches des *Rhizobium* tempérés à croissance rapide : *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum*, alors que les *Rhizobium* de tige, malgré une vitesse de croissance comparable aux *Rhizobium* à croissance rapide, sont taxonomiquement plus proches des *Rhizobium* à croissance lente. La différence de spécificité tige-racines chez *Sesbania rostrata* (voir Chapitre I) pourrait donc s'expliquer en partie par le fait que *Rhizobium* de racines et *Rhizobium* de tige sont taxonomiquement éloignés. En rapport avec la propriété de la souche de tige ORS571 de fixer l'azote en culture libre, rappelons que, jusqu'à présent, seuls certains *Rhizobium* à croissance lente, donc assez proches taxonomiquement des *Rhizobium* de tige, sont capables de présenter une activité nitrogénasique en culture libre.

Les vingt souches isolées des nodules de tige dans des lieux géographiques différents du nord Sénégal forment un groupe très homogène et l'étude taxonomique et immunologique montre que ces souches sont très proches les unes des autres. Une telle similitude entre souches est très surprenante en Rhizobiologie où il est commun d'isoler de nombreuses

souches différentes à partir des nodules d'une même légumineuse sauvage, et pourrait s'expliquer par une sélection très étroite des *Rhizobium* de tige par la plante-hôte *Sesbania rostrata*. L'isolement de nouvelles souches de *Rhizobium* de tige dans d'autres sites d'Afrique est donc nécessaire, mais d'ores et déjà, les différences taxonomiques importantes entre *Rhizobium* de tige et *Rhizobium* de racines montrent que les *Rhizobium* isolés des nodules de tige de *S. rostrata* qui présentent un GC % supérieur à celui généralement trouvé chez les *Rhizobium* (De Ley et Rassel, 1965), pourraient constituer une nouvelle espèce de *Rhizobium*.

CHAPITRE V

PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES ET ANALYSE GÉNÉTIQUE
DE LA SOUCHE DE *RHIZOBIUM* DE TIGE : ORS571



1.- INTRODUCTION

Parmi les procaryotes fixateurs d'azote connus, les *Rhizobium* sont les seuls à ne pas utiliser l'azote moléculaire (N_2) comme seule source d'azote. La fixation d'azote par les *Rhizobium* ne s'exprime en général que dans les nodules des légumineuses, lorsque les bactéries sont sous leur forme symbiotique, les bactéroïdes. Au cours de la fixation symbiotique de l'azote, les bactéroïdes qui réduisent N_2 en NH_3 sont incapables d'assimiler l'ammonium ainsi produit. Celui-ci est alors exporté dans le cytosol des cellules de la plante-hôte, où il est assimilé par des enzymes produites par la plante (Brown et Dilworth, 1975).

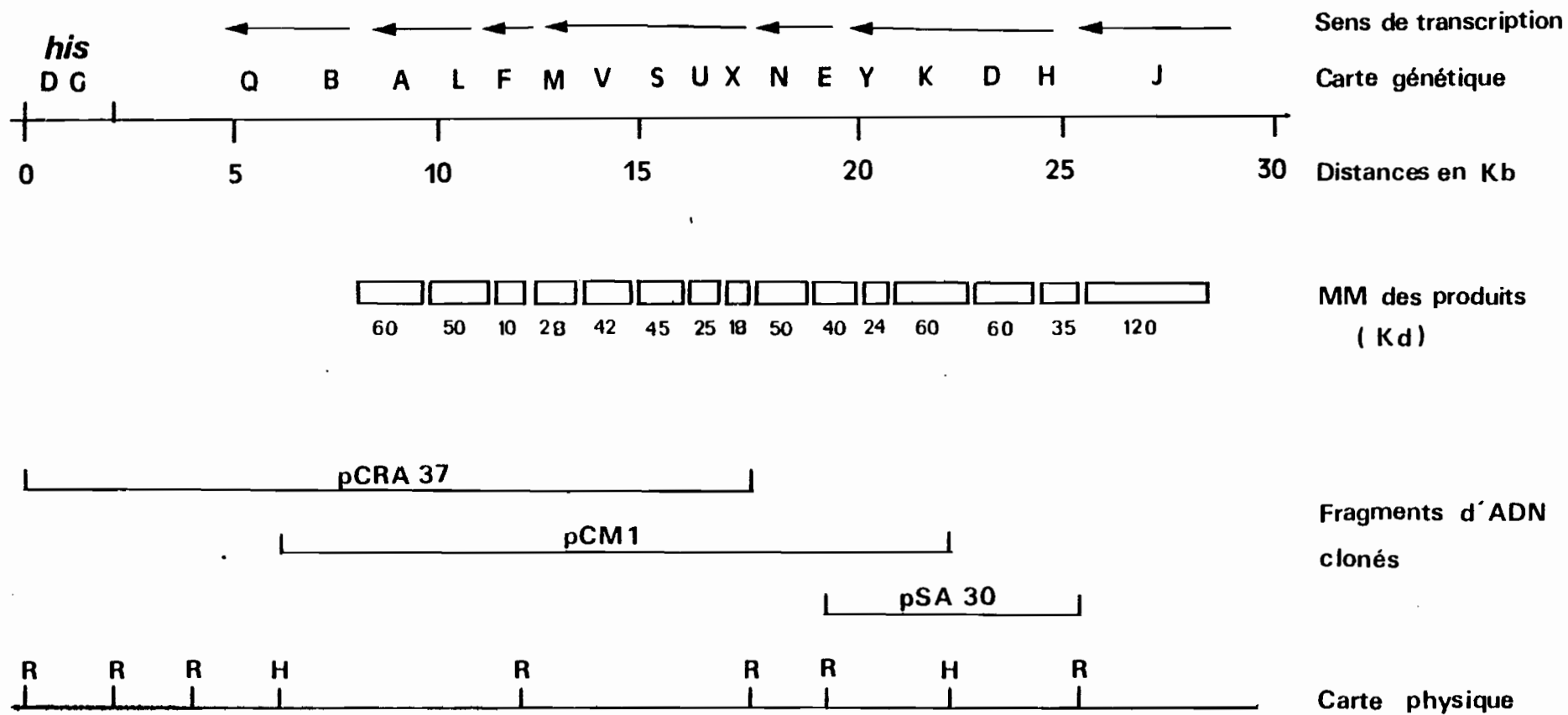
Il existe cependant (voir Introduction Générale) certaines souches de *Rhizobium* à croissance lente (*Rhizobium japonicum* et *Rhizobium* "cowpea") qui présentent une activité nitrogénase en culture pure (Keister, 1975; Kurz et La Rue, 1975; McComb et coll., 1975; Pagan et coll., 1975; Tjepkema et Evans, 1975), mais celle-ci n'est possible que dans certaines conditions microaérobies. En effet, les *Rhizobium* étant des bactéries aérobies obligatoires, les besoins importants en ATP nécessaires à la réaction de fixation de l'azote moléculaire ne peuvent être produits que par la phosphorylation oxydative dont l'accepteur terminal d'électrons est l'oxygène. La nitrogénase étant dénaturée par l'oxygène intracellulaire, des conditions de culture microaérobie sont donc nécessaires à la fixation d'azote en culture pure. Ainsi, chez

certaines souches de *Rhizobium* à croissance lente, la nitrogénase est dérégulée à des concentrations d'oxygène dissous inférieures à $1 \mu\text{M}$ (Bergersen et Turner, 1975). Ces souches possèdent, en culture libre, un système d'oxydases terminales, semblables à celui des bactéroïdes, ayant des affinités très fortes pour l'oxygène, ce qui permet une phosphorylation oxydative très efficace à des tensions d'oxygène dissous extrêmement basses (Bergersen et Turner, 1980). D'autre part, Ludwig (1978) a montré que la souche de *Rhizobium* "cowpea", 32HI qui possède une activité nitrogénase en culture pure, se comporte aussi comme les bactéroïdes, c'est-à-dire que l'ammonium produit est excrété dans le milieu et n'est pas assimilé. Dans ce cas, toute croissance en conditions de fixation libre de l'azote ne peut avoir lieu qu'en présence d'une autre source d'azote utilisable, par exemple le glutamate. Par ailleurs, en étudiant des mutants de la souche 32HI, Ludwig (1982) a récemment émis l'hypothèse selon laquelle les *Rhizobium* qui produisent leur nitrogénase en culture pure, ne pourraient simultanément fixer l'azote de l'air et pousser sur l'ammonium produit.

Ainsi, aussi bien chez les *Rhizobium* à croissance rapide qui ne fixent l'azote que dans les nodules, que chez celles des souches de *Rhizobium* à croissance lente qui expriment leur nitrogénase à l'état libre, il a été impossible jusqu'à présent d'isoler des mutants Nif^- directement sur boîte de Pétri en utilisant les méthodes classiques de la génétique bactérienne. Ceci a conduit les généticiens à identifier et cloner directement les gènes de structure de la nitrogénase des *Rhizobium* en utilisant les gènes *nifHDK* de *Klebsiella pneumoniae* comme sonde (voir Introduction Générale : Nuti et coll., 1979; Ruvkun et Ausubel, 1980; Hennecke, 1981; Hombrecher et coll., 1981; Prakash

et coll., 1981). De nouvelles techniques génétiques utilisant le clonage et la mutation par transposons ont donc dû être développées pour l'étude des mutants Nif, Nod et Fix de *Rhizobium* (Ruvkun et Ausubel, 1981; Corbin et coll., 1982; Long et coll., 1982).

Les caractéristiques particulières de la nodulation caulinaire de *Sesbania rostrata*, ainsi que les différences entre les souches de tige et de racine, nous ont conduits à étudier plus particulièrement les propriétés physiologiques en culture pure, d'une souche de *Rhizobium* de tige, la souche ORS571. Les résultats obtenus lors de l'étude de taxonomie numérique (voir Chapitre IV) nous ont montré que, seul parmi les sucres classiques, le glucose est assimilé, et que le lactate et le succinate sont d'excellentes sources de carbone, alors que le mannitol utilisé dans les milieux classiques pour *Rhizobium* (YM) n'est pas assimilé. D'autre part, les *Rhizobium* de tige ont besoin de vitamines pour leur croissance. Dans ce chapitre, nous avons donc tout d'abord défini un milieu minimal de croissance à partir des sources de carbone et d'azote les mieux assimilées. Nous avons ensuite étudié la propriété, unique parmi tous les *Rhizobium* connus, de la souche ORS571 à croître aux dépens de l'azote moléculaire utilisé comme seule source d'azote. Cette propriété nous a permis de rechercher des mutants (Nif^-) par les méthodes classiques de la génétique bactérienne. Parallèlement, nous avons recherché à identifier certains gènes *nif* de la souche ORS571 par hybridation avec les plasmides pSA30 et pCMI qui portent respectivement les gènes *nifHDK* et *nifB-K* de *Klebsiella pneumoniae* (figure 29), ceci afin de développer une analyse génétique de la fixation d'azote symbiotique de la souche ORS571.



R: *Eco*RI ; H: *Hind* III

FIGURE 29 : Organisation fonctionnelle des gènes *nif* de *Klebsiella pneumoniae*.

2.- MATERIEL ET METHODES

2.1.- Souches bactériennes et plasmides :

La souche de *Rhizobium* de tige de *Sesbania rostrata* utilisée au cours de cette étude est la souche ORS571. La liste des autres souches de *Rhizobium* est donnée dans les tableaux 1 et 2.

Les plasmides pSA30, pCMI et pCRA37 (Cannon et coll., 1977; 1979) portent respectivement les gènes *nifHDK*, *nifB-K* et *nifQ-U* de *Klebsiella pneumoniae* (figure 29).

Pour la détermination des poids moléculaires des plasmides, la souche de *Rhizobium meliloti* L5-30 (Casse et coll., 1979) a été utilisée ainsi que les plasmides RP4 (Faellen et coll., 1977) et pJB4J1 (Beringer et coll., 1978).

Pour le clonage (Elmerich et coll., 1982), le plasmide pRK290 (Ditta et coll., 1980) a été utilisé.

2.2.- Milieux de culture :

La base de tous les milieux utilisés pour la croissance et la fixation d'azote de la souche ORS571, appelée base L, contient en g/l: D,L-sodium lactate, 10 g; K_2HPO_4 , 1,67 g; KH_2PO_4 , 0,87 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g; NaCl, 0,05g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 40 mg; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 10 mg; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 5 mg; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2,5 mg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,7 mg; $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,14 mg; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,12 mg; H_3BO_3 , 0,03 mg; pH 6,8.

2.2.1.- Milieu complet YL :

Le milieu complet appelé YL correspond à la base L supplémentée par 1 g/l de $(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$ et 1 g/l d'extrait de levure (Difco).

2.2.2.- Milieu synthétique LN :

Le milieu synthétique minimal LN correspond à la base L supplémentée par 1 g/l de $(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$ (soit 15 mM NH^+) ainsi que par trois vitamines indispensables à la croissance de la souche ORS571 : biotine, 2 mg/l; acide panthothénique, 4 mg/l; acide nicotinique, 4 mg/l.

2.2.3.- Milieu pour la fixation d'azote LO :

Le milieu sans azote LO utilisé pour l'étude de la fixation d'azote en culture de la souche ORS571 correspond à la base L supplémentée par les trois vitamines : biotine, 2 mg/l; acide panthothénique, 4 mg/l; acide nicotinique, 20 mg/l.

Les milieux gélosés YL, LN et LO contiennent 15 g/l d'agar.

2.2.4.- Milieu YM :

Le milieu YM (voir Chapitre I) a été utilisé pour la croissance des souches de *Rhizobium* autres que la souche ORS571.

2.3.- Méthodes de culture de la souche ORS571 :

Les cultures en milieu liquide sontensemencées à partir de précultures en phase exponentielle de croissance en milieu YL. Pour l'inoculation du milieu LO, les précultures en YL sont préalablement centrifugées et lavées deux fois. Les cultures sont agitées à 30°C, 37°C ou 42°C dans l'air dans le cas des milieux YL et LN ou agitées sous

atmosphère N_2-O_2 (97%-3%) ou $Ar-O_2$ (97%-3%) dans le cas du milieu L0. On utilise des fioles d'Erlenmeyer de 60 ml ou des flacons-bijou de 10 ml qui peuvent, dans le cas de cultures sous faible tension d'oxygène, être hermétiquement fermés par des bouchons en caoutchouc. Pour l'étude des cinétiques de croissance et de fixation d'azote, les cultures sont faites en fermenteur Bfölafitte de 1,5 l contenant 1 l de milieu. L'air ou le mélange gazeux sont insufflés dans le milieu à un débit de 1 l/mn et l'agitation interne est de 400 rpm. Le pH est régulé à 6,8 avec HCl 1N.

Les boîtes de milieu solide L0 sont incubées à 37°C dans une enceinte fermée où le mélange gazeux N_2-O_2 (97%-3%) est constamment renouvelé.

2.4.- Dosage de l'activité nitrogénase :

L'activité nitrogénase de cellules entières ou d'extraits bruts est mesurée par la méthode de réduction de l'acétylène en éthylène (Hardy et coll., 1968). Des échantillons gazeux de 0,25 ml sont prélevés et la quantité d'éthylène présente dans l'échantillon est mesurée par chromatographie en phase gazeuse. On utilise soit un chromatographe Varian Aerograph (voir Chapitre III), soit un chromatographe Intersmat à ionisation de flamme, modèle IGCFI, muni d'une colonne de 40 x 0,2 cm remplie de Pordpak T. Dans le second cas, la température de la colonne est de 50°C et le gaz vecteur, qui est l'azote, a un débit de 20 ml/mn, la quantité d'éthylène présente dans l'échantillon est déterminée par rapport à un standard.

2.4.1.- Mesure de l'activité nitrogénase en conditions de dérépression :

Cette méthode permet de déterminer l'activité spécifique de la nitrogénase. Les bactéries provenant d'une préculture préalablement centrifugée et lavée, sont inoculées en fioles d'Erlenmeyer contenant 10 ml de milieu L0 à raison de $2,5 \times 10^8$ bactéries/ml ($DO_{570nm} \simeq 0,5$). L'air présent dans la fiole est chassé en faisant passer à travers une seringue piquée dans le bouchon un courant d'argon stérile. La tension d'oxygène est alors ajustée à 3% et l'acétylène injecté à la concentration finale de 10%. Les bactéries sont incubées à 37°C et la quantité d'éthylène formée est mesurée toutes les 15 ou 30 mn, 2 h après l'inoculation. Dans ces conditions, la production d'éthylène est linéaire pendant au moins 5 h.

2.4.2.- Mesure de l'activité nitrogénase en conditions de croissance :

Les mesures quantitatives et qualitatives de l'activité nitrogénase en conditions de croissance ont été faites en fermenteur : 2 h après inoculation ($DO_{570nm} \simeq 0,1$) en milieu L0 sous atmosphère N_2-O_2 (97%-3%), des échantillons de 2 ml de culture sont prélevés aseptiquement toutes les heures et injectés dans des flacons-bijou de 10 ml contenant un mélange gazeux N_2-O_2 (97%-3%) ou $Ar-O_2$ (97%-3%). L'acétylène est injecté à la concentration finale de 10%, et l'éthylène produit est mesuré toutes les 15 minutes. L'absence de contaminants dans les cultures et l'aptitude à noduler ont été contrôlées.

L'activité spécifique de la nitrogénase est exprimée en nmoles C_2H_4 /mn/mg de protéine. La quantité de protéine est estimée selon la méthode de Löwry et coll. (1951).

Les dosages sont effectués en flacons-bijou de 10 ml hermétiquement bouchés, selon la technique de Eady et coll. (1972). Chaque flacon reçoit : 0,75 ml d'eau; 0,25 ml du mélange réactionnel (Tampon Hépès, 100 mM, pH 7,5; $MgCl_2$, 50 mM; ATP, 20 mM; créatine phosphate, 41 mM) et 0,1 mg de créatine kinase (Sigma Type I, extrait du muscle de lapin) dans du tampon Hépès 200 mM, pH 7,5. Après avoir mis le flacon hermétiquement bouché sous argon, on injecte 0,1 ml de dithionite (solution de 25 mg/ml dans du tampon Hépès 200 mM, pH 7,5). Après avoir injecté 10% d'acétylène, la réaction est démarrée par l'addition de 0,1 ml de l'échantillon d'extrait brut à doser. Au bout de 5 mn, la réaction peut être arrêtée par addition d'acide trichloracétique (3%).

Pour la complémentation biochimique des mutants, la quantité de Kp1 ou de Kp2 pures (préparées par J. Houmard) ajoutée à 0,1 ml d'extrait brut a été respectivement de 48 μ g et de 20 μ g.

2.5.- Préparation des extraits bruts :

Une culture de la souche ORS571 en fin de croissance exponentielle en milieu YL a été centrifugée et inoculée à $DO = 1$ dans un fermenteur Biolafitte de 1,5 l contenant du milieu L0 avec 40 mg/l d'acide nicotinique et mise en conditions de dérégulation de la nitrogénase ($Ar-O_2$) (97%-3%). Après 7.5 h, les cellules sont centrifugées sous argon et conservées en azote liquide jusqu'à leur utilisation. 3,4 g de culot sont remis en suspension dans 10 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, contenant 1 mM de dithionite et 0,1 g/l de dithiothreitol. Les cellules sont alors cassées à la presse de French puis centrifugées sous atmosphère d'argon pendant 20 mn à 1,900 rpm. L'activité du surnageant peut être dosée immédiatement suivant la méthode décrite au paragraphe 2.4. Les extraits sont conservés dans l'azote liquide.

2.6.- Isolement de mutants Nif^- de la souche ORS571 :

Les mutants ont été obtenus après mutagénèse de la souche ORS571 à l'éthylméthane sulfonate (EMS) suivant la méthode décrite par Miller (1974). Après mutagénèse, les bactéries sont ensemencées en milieu YL et cultivées à 37°C pendant 15 h, puis centrifugées et lavées avec du milieu L0 et étalées sur milieu solide L0 à raison de 200 colonies par boîte. Après 4 à 5 jours d'incubation sous atmosphère N_2-O_2 (97%-3%), les petites colonies ou les colonies translucides présumées non fixatrices sont repiquées sur milieu YL et L0 et testées pour leur activité nitrogénase.

2.7.- Extraction de l'ADN total :

L'ADN total de la souche ORS571 a été préparé suivant la méthode de Marmur (1961) modifiée par un traitement supplémentaire à la protéinase K (Quiviger et coll., 1982).

Un gramme de bactéries (souche ORS571) est repris dans 15 ml de tampon Tris-HCl 50 mM, saccharose 25%, pH 8, et traité pendant 10 mn à 37°C par 20 mg de lysozyme et 1,8 ml d'EDTA 40 mM, pH 8. On ajoute alors en homogénéisant doucement 1,5 ml de SDS 10% et 10 mg de protéinase K dissoute dans 1,5 ml de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Le lysat est incubé pendant 2 h à 37°C en agitant plusieurs fois et avec précaution jusqu'à clarification. Il est alors déprotéinisé deux fois avec le mélange (v/v) de chloroforme et de phénol saturé par du Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. Après une dialyse de 24 h contre du tampon TE, le lysat est traité par 50 µg de ribonucléase, à nouveau déprotéinisé et dialysé. La quantité d'ADN extraite est estimée par mesure de la D₀ à 260 nm.

2.8.- Electrophorèse en gel d'agarose :

Pour séparer les fragments de restriction, les électrophorèses sont réalisées en tampon Tris-borate (Tris-base 89 mM, EDTA 2,5 mM, acide borique 89 mM, pH 8) sur des gels horizontaux d'agarose (0,7%), 2,5 v/cm pendant 16 h.

Pour la séparation des plasmides par la méthode Eckhardt (1978), on utilise des gels verticaux à 0,7% d'agarose et la migration se fait pendant 1 h à 8 mA pendant 3 h à 40 mA.

Les échantillons déposés sur les gels sont additionnés pour 1/5 de leur volume par un mélange glycérol 50%, TES 50%, bleu de bromophénol 0,07%. Après migration, le gel est coloré par du bromure d'éthidium (BET à 0,5 µg/ml) et photographié en lumière U.V. La masse moléculaire des fragments est estimée par rapport à la migration des fragments du bactériophage λ hydrolysé par *HindIII*.

2.9.- Mise en évidence de plasmides :

Pour la mise en évidence de plasmides par électrophorèse en gel d'agarose, nous avons utilisé les techniques décrites par Eckhardt (1978) et Meyers et coll. (1976).

2.10.- Hydrolyse par les enzymes de restriction :

L'ADN total de la souche ORS571 a été hydrolysé par plusieurs enzymes de restriction (Biolabs): *BamHI*, *BglII*, *EcoRI*, *HindIII*, *SalI*, *XhoI*, et *SmaI* dans les conditions recommandées par le fournisseur. En général, une unité d'enzyme est utilisée pour l'hydrolyse de 1 µg d'ADN. La digestion est arrêtée par dénaturation des enzymes de restriction à 65°C pendant 10 mn.

2.11.- Technique d'hybridation :

2.11.1.- Transfert de l'ADN sur filtre de nitrocellulose :

L'ADN total dont les fragments de restriction ont été séparés par électrophorèse, est dénaturé par deux immersions successives de 15 mn du gel, dans une solution de NaOH 0,5 N, NaCl 0,6 M. Le gel est neutralisé par deux traitements de 30 mn dans une solution de Tris-HCl 1 M, NaCl 0,6 M, pH 7,4. L'ADN simple brin est transféré sur filtre de nitrocellulose (Millipore Hawp) suivant la technique de Southern (1975) avec du 6 x SSC (SSC = 0,15 M; NaCl, 0,015 M; citrate trisodique) Après 15 h environ, le filtre est lavé pendant 45 mn dans du 2 x SSC et mis à sécher à 65°C.

2.11.2.- Marquage des sondes d'ADN au ^{32}P par déplacement de coupure selon la technique de Rigby et coll. (1977) :

10 µg de l'ADN des plasmides pSA30 et pCMI sont dissous dans 50 µl de tampon KH_2PO_4 20 mM, K_2HPO_4 80 mM, MgCl_2 10 mM, mercaptoéthanol 20 mM, pH 7,4, et incubés avec 1,6 unités d'ADN polymérase I, 2 ng de désoxyribonucléase I, 80 µCi de (α - ^{32}P) dATP et 50 µM de chacun des trois autres désoxynucléotides froids. La réaction poursuivie durant 50 mn à 23°C est arrêtée par incubation du mélange réactionnel pendant 10 mn à 65°C.

L'ADN marqué est séparé des nucléotides non incorporés par passage sur une colonne de Séphadex G-50 équilibrée avec du tampon Tris-HCl 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5. La radioactivité spécifique des sondes obtenues varie entre 15×10^6 dpm/µ d'ADN et 5×10^6 dpm/µg d'ADN ce qui correspond à un rendement de 90% à 50%. La sonde est dénaturée par un chauffage de 10 mn à 95°C en présence de 15 µg/ml d'ADN de thymus de veau ajouté comme entraîneur.

2.11.3.- Hybridation :

Le filtre de nitrocellulose (10 x 17,5 cm) est humidifié dans du 2 x SSC et mis à préhybrider à 65°C pendant 1 à 2 h dans 30 ml de tampon 6 x SSC, 1 denhardt (0,02% Ficoll, 0,02% pyrrolidone, 0,02% SAB), 0,5% SDS et 15 µg/ml d'ADN de sperme de hareng dénaturé à la chaleur. Les filtres sont ensuite transférés dans le même tampon mais additionné de la sonde radioactive dénaturée. On ajoute en moyenne 2×10^6 dpm par ml de tampon d'hybridation, soit 50×10^6 dpm pour un filtre contenant 8 échantillons. Pendant l'hybridation qui dure 24 h à 65°C, les filtres sont légèrement agités.

Ils sont ensuite lavés trois fois 1 h à 65°C dans 600 ml de tampon 6 x SSC, 0,5% SDS et deux fois 30 mn dans 800 ml de 2 x SSC à température ambiante. Après séchage, on procède à une autoradiographie avec des films Kodak (X-Omat ARI) dans des cassettes munies d'écran amplificateur pendant environ 5 jours à -80°C.

2.12.- Isolement de phages :

Un échantillon de nodules secs broyés a été ajouté à une culture de la souche ORS571 en milieu complet et en phase exponentielle de croissance. Après 24 h, la culture est centrifugée et le surnageant stérilisé au millipore ou chloroformé. 0,1 ml d'une dilution du surnageant et 0,1 ml de la souche ORS571 sont alors étalés sur une boîte de milieu gélosé YL pour la recherche de plages de lyse. Chaque plage de morphologie différente est alors reprise plusieurs fois après dilution en milieu YL à 37°C jusqu'à homogénéisation de la suspension de phages. Afin de constituer un stock de phages, cette suspension est alors inoculée à 1 l de culture en phase exponentielle de la souche ORS571 en milieu YL et contenant environ 8×10^8 bactéries/ml. La culture est agitée pendant 48 h à 37°C jusqu'à la lyse totale et le lysat obtenu est titré par comptage des plages de lyse sur la souche ORS571.

3.- RESULTATS

3.1.- Définition d'un milieu de croissance minimum :

Les résultats de l'étude taxonomique ont montré que la souche ORS571, comme les vingt autres souches de tige, utilise préférentiellement le lactate et le succinate comme source de carbone et n'utilise pas le mannitol. Nous avons donc tout d'abord remplacé le mannitol par du lactate de sodium dans le milieu YM. Dans ces conditions, l'étude des sources d'azote nous a montré que, contrairement aux *Rhizobium* de racines étudiés dans le chapitre IV, la souche ORS571 assimile l'ammoniaque et que sa croissance est meilleure sur ammoniaque que sur glutamate ou glutamine.

En conservant la base saline du milieu YM et en utilisant le lactate de sodium et l'ammoniaque, nous avons ensuite déterminé les trois vitamines indispensables à la croissance de la souche ORS571 en milieu minimum : il s'agit de la biotine, de l'acide panthothénique et de l'acide nicotinique.

Nous avons ainsi défini pour la croissance optimum de cette souche, un milieu complet appelé YL, un milieu synthétique minimum appelé LN et un milieu sans azote appelé L0. Le milieu L0 ne diffère de LN que par l'absence de sulfate d'ammonium. La composition de ces trois milieux est définie au paragraphe 2.2. de ce chapitre.

3.1.1.- Vitesse de croissance de la souche ORS571 :

Les résultats rapportés au tableau 16 montrent les différents taux de croissance ainsi que la densité optique maximale (DO_{max}) de la souche ORS571 en fonction du milieu, de la source d'azote (sulfate d'ammonium ou glutamate) et de la température de croissance. Le taux de croissance sur l'azote moléculaire dont nous parlerons au paragraphe 3.3. de ce chapitre est donné à titre comparatif. Le taux de croissance et la DO_{max} de la souche ORS571 ne varient pas à 30°C ou 37°C sur les milieux YL et LN, quelle que soit la composition de la phase gazeuse (air ou 3% d'oxygène). La croissance de la souche ORS571 sur YL ou LN est peu affectée par une température élevée (42°C).

Lorsque le glutamate remplace le sulfate d'ammonium comme source d'azote, le taux de croissance diminue sensiblement de 0,38 div.xh⁻¹ à 0,28 div.xh⁻¹. Sur milieu YM, la souche ORS571 a une croissance plus faible que sur milieu YL ou LN. La courbe de croissance de la souche ORS571 en fermenteur sur milieu LN est présentée dans la figure 31.

3.1.2.- Etude de la résistance aux antibiotiques :

Le tableau 17 donne la sensibilité aux antibiotiques de la souche ORS571. Les trois concentrations différentes de chaque antibiotique ont été testées sur boîte de Pétri en couche de gélose molle contenant 10⁸ bactéries/ml.

Les résultats montrent que la souche ORS571 est résistante à l'ampicilline et à la carbénicilline et sensible aux autres antibiotiques testés sauf au chloramphénicol et à la néomycine qui donnent une réponse intermédiaire.

TABEAU 16 : Croissance de la souche ORS571 sur milieu complet, ammoniacal, glutamate, et azote moléculaire sous différentes températures (30°C, 37°C et 42°C)

Milieu de croissance	Phase gazeuse	Croissance de ORS571					
		30°C		37°C		42°C	
		μ	DO _{max.}	μ	DO _{max.}	μ	DO _{max.}
YM	air	0,19	2,5	0,20	2,5	0,18	2,1
YL	air	0,38	3,6	0,39	3,7	0,33	3,3
YL	$\left\{ \begin{array}{l} \text{N}_2\text{-O}_2 \text{ (97\%-3\%)} \\ \text{ou} \\ \text{Ar-O}_2 \text{ (97\%-3\%)} \end{array} \right\}$	0,38	3,5	0,39	3,7	0,33	3,1
LN (LO + NH ₄ ⁺)	air	0,38	3,5	0,38	3,6	0,25	3,3
LO + 1g/l glutamate	air	0,28	3,0	0,29	3,1	0,25	2,8
LO	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Air} \\ \text{ou} \\ \text{Ar-O}_2 \text{ (97\%-3\%)} \end{array} \right\}$	—	0,3	—	0,3	ND	
LO (croissance sur N ₂)	N ₂ -O ₂ (97%-3%)	0,15	2,4	0,16	2,3	ND	

—, croissance nulle ; ND, croissance non déterminée

TABLEAU 17 : Résistance aux antibiotiques de la souche ORS571

Antibiotiques	Concentrations d'antibiotiques testées (γ)	Sensibilité de la souche ORS571
Ampicilline :	100 200 500	R R R
Carbénicilline :	100 200 500	R R R
Chloramphénicol :	10 20 50	R R S
Néomycine :	10 20 50	R R S
Gentamycine :	2 5 10	R S S
Kanamycine :	2 5 10	R R S
Rifampicine :	2 5 10	R S S
Spectinomycine :	5 10 20	R R S
Streptomycine :	2 5 10	R S S
Tetracycline :	2 5 10	R S S

S = la souche est sensible, aucune croissance sur boîte ;

R = la souche est résistante.

3.2.- Etude de la fixation d'azote en culture libre :

3.2.1.- Etude de l'activité nitrogénase en fonction de la tension d'oxygène :

La courbe de la figure 30 montre que sous faible tension d'oxygène dans le milieu sans azote L0, la souche ORS571 présente une activité nitrogénase en culture libre. Cette activité est maximale (environ 20 nmoles d'éthylène/mn/mg de protéine) quand la tension d'oxygène dans la phase gazeuse (Ar-O_2) est de 31%. Dans ces conditions, l'activité nitrogénase de la souche ORS571 est détectée 2 h après l'inoculation à $\text{DO}_{570\text{nm}} = 0,5$ en milieu L0 d'une préculture préalablement centrifugée et lavée. Aucune activité nitrogénase n'est détectée pour des tensions d'oxygène supérieures à 10%.

3.2.2.- Croissance de la souche ORS571 aux dépens de l'azote moléculaire :

→ Milieu liquide :

Comme le montrent les courbes de la figure 31, la souche ORS571 est capable de croître sur l'azote moléculaire (N_2) lorsqu'elle est cultivée sur milieu L0 sous atmosphère $\text{N}_2\text{-O}_2$ (97%-3%) en fermenteur. Le taux de croissance sur l'azote moléculaire est de $0,16 \text{ div.xh}^{-1}$ à 37°C et la DO de la culture augmente de 0,15 à 2,30 (figure 31 et tableau 16). Le temps de génération sur azote moléculaire est donc de 6 h comparé à 3 h sur NH_4 (milieu LN). L'activité nitrogénase est détectée au chromatographe 2 h après l'inoculation. L'activité spécifique de la nitrogénase (non rapportée sur la figure 31) est maximale (29 nmoles C_2H_4 /mn/mg de protéine) pour une $\text{DO}_{570\text{nm}} = 0,6$. Aucune accumulation d'ammoniaque n'a été détectée dans le milieu de culture au cours de la croissance. L'azote total de la culture, mesuré suivant la méthode de Kjeldahl, a augmenté au cours de la croissance de 4 mg/l à 50 mg/l. Par contre, on n'observe, sous atmosphère $\text{N}_2\text{-O}_2$ (80%-20%)

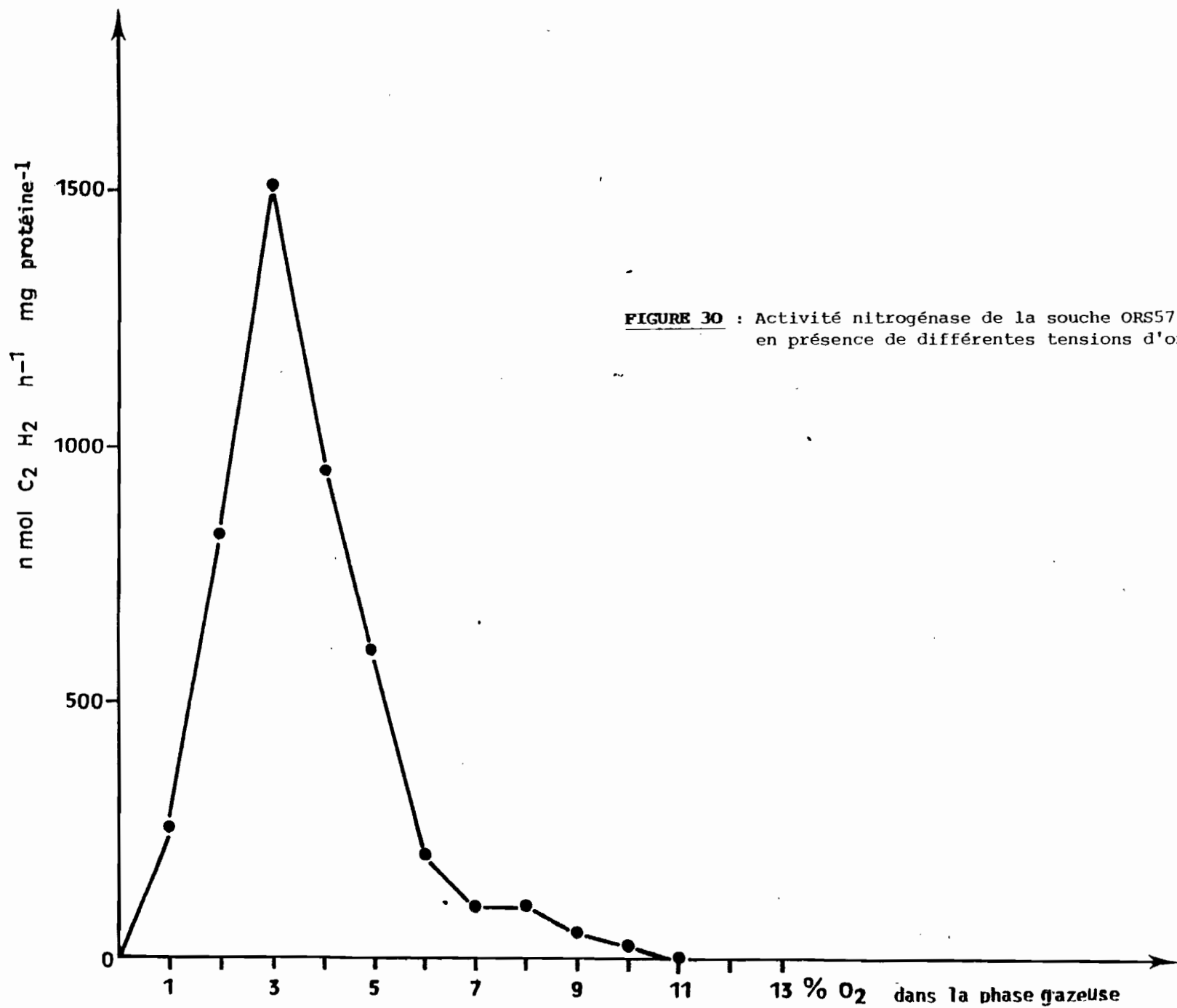


FIGURE 30 : Activité nitrogénase de la souche ORS571 en présence de différentes tensions d'oxygène.

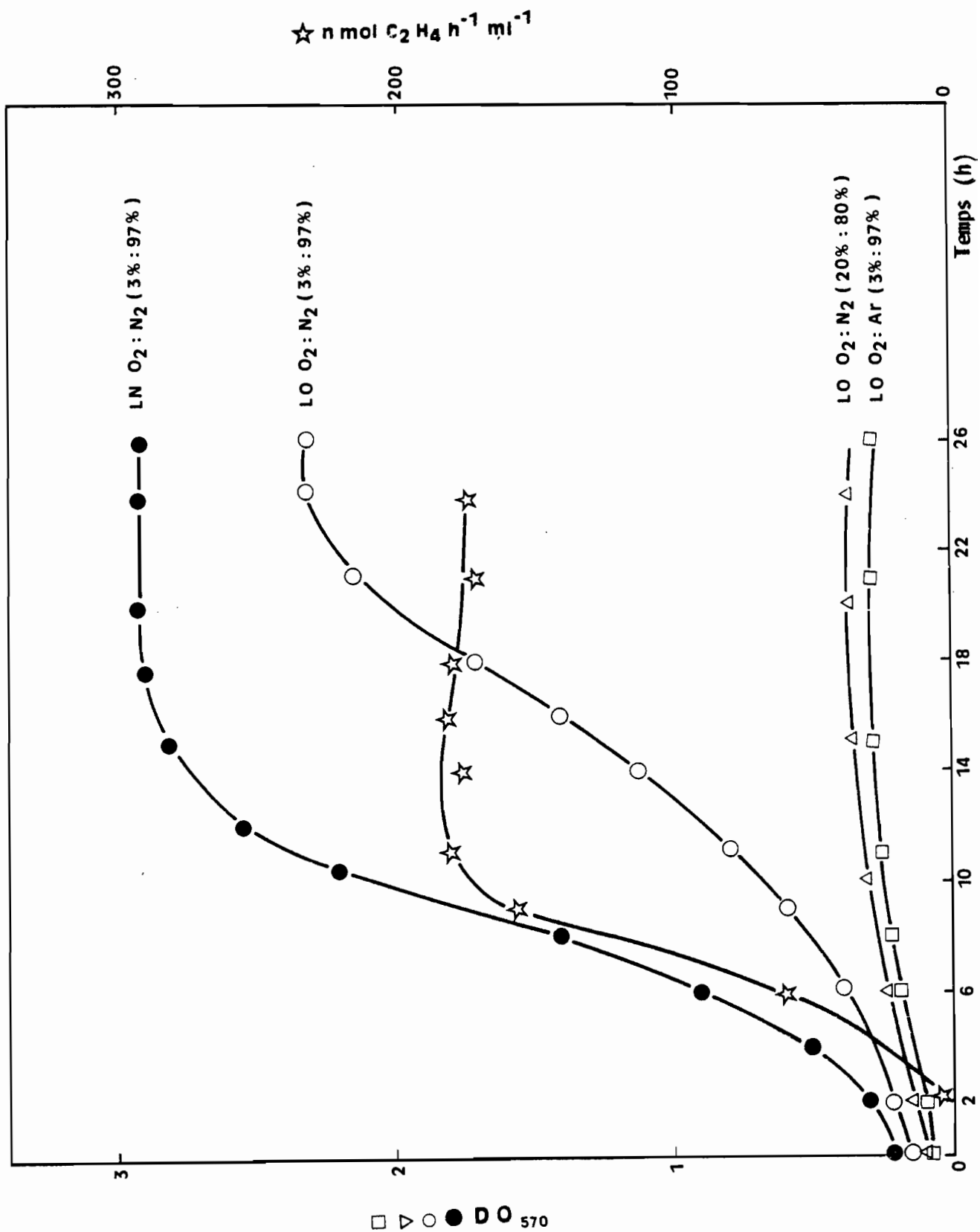


FIGURE 31 : Croissance (○) et activité nitrogénase (☆) de la souche ORS571 cultivée sur milieu LO sous atmosphère $\text{N}_2 - \text{O}_2$ (97%-3%). Les courbes de croissance sur LO ($\text{N}_2 - \text{O}_2$, 80%-20% (△) ou $\text{Ar} - \text{O}_2$, 97%-3% (□) et sur LN (■) sont données comme courbes témoins

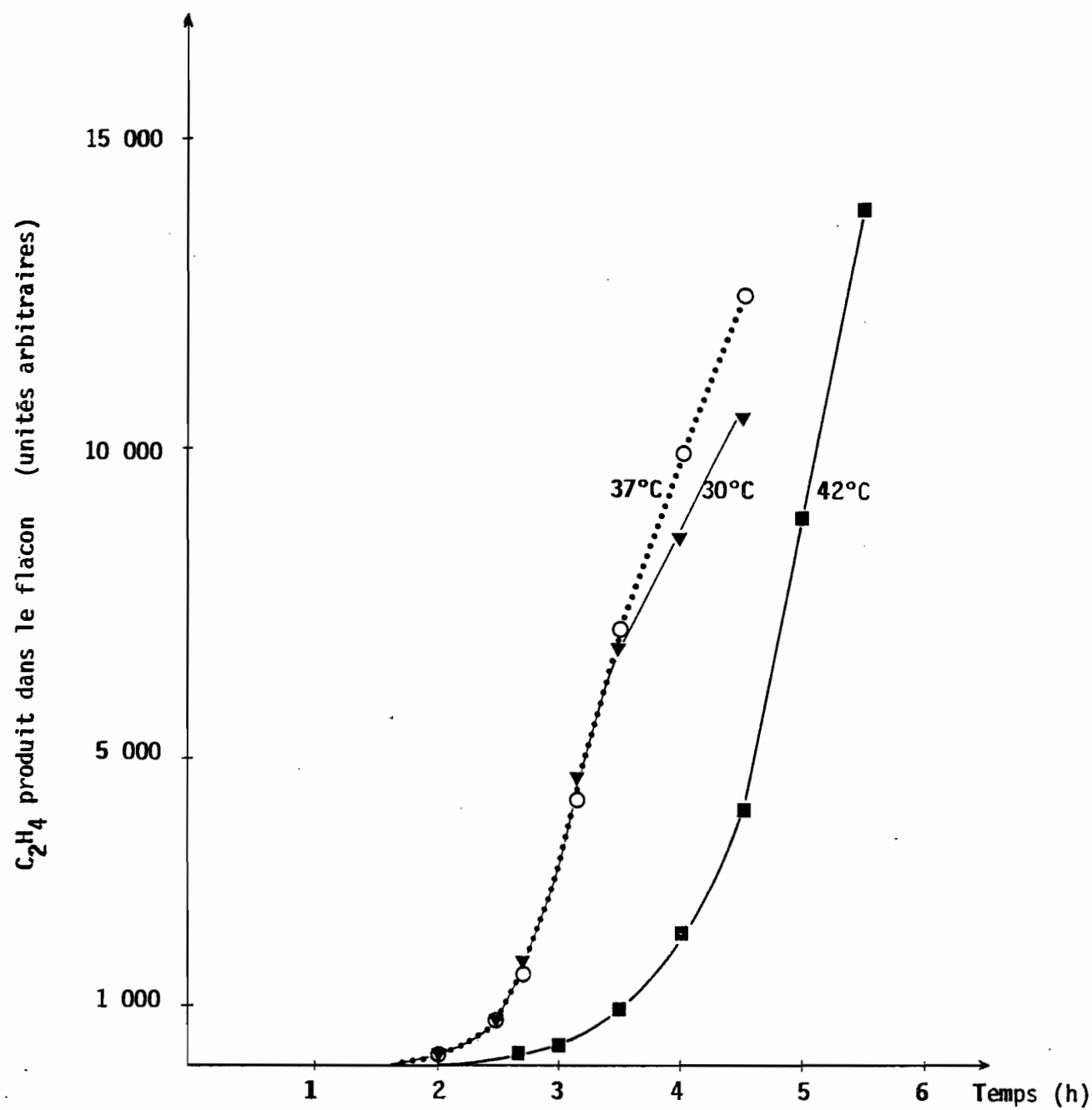


FIGURE 32 : Cinétique de la dérèpression de l'activité nitrogénase de la souche ORS571, à 30°C (▼), 37°C (○) et 42°C (■).

ou Ar-O₂ (97%-3%) qu'une faible croissance résiduelle avec une DO_{max} = 0,3 (figure 31). Dans les mêmes conditions permettant la croissance de la souche ORS571 sur azote moléculaire, aucune activité nitrogénase, ni croissance n'ont été décelées chez la souche de *Rhizobium* "cowpea" CB756 connue pour son aptitude à posséder une activité nitrogénase en culture (Bergersen et Turner, 1980).

A partir de cultures en croissance ou en dérèpression, on a réussi à obtenir des extraits bruts dont l'activité nitrogénase est de l'ordre de 50 à 60 nmoles C₂H₄/mn/mg de protéine (tableau 18).

→ *Milieu solide* :

Sur milieu solide L0 et sous atmosphère N₂-O₂ (97%-3%), les colonies fixatrices d'azote apparaissent au bout de 3 jours et atteignent 1 à 2 mm de diamètre en 5 jours. Par contre, incubées sous atmosphère Ar-O₂ (97%-3%) ou dans l'air, les colonies restent très petites et translucides.

3.2.3.- Effet de la température sur l'activité nitrogénase :

Nous avons mesuré l'activité nitrogénase à trois températures différentes : 30°C, 37°C et 42°C. Dans les conditions de dérèpression sous atmosphère Ar-O₂ (97%-3%), l'activité nitrogénase a été détectée 2 h après inoculation à 30°C et 37°C et 3 h après inoculation à 42°C (figure 32). L'activité spécifique de la nitrogénase est la même (20 nmoles C₂H₄ /mn/mg de protéine) à 30°C et 42°C (figure 32). La souche ORS571 montre donc une adaptation à la température pour la dérèpression de sa nitrogénase.

3.2.4.- Répression de la nitrogénase par les sources azotées :

En présence d'ions NH_4^+ , la biosynthèse de la nitrogénase est totalement réprimée lorsque la concentration en NH_4^+ atteint 0,3 mM. Il en est de même, en présence de 0,4 mM de glutamine ou de glutamate, ou de 0,5 mM KNO_3 . Ainsi, la biosynthèse de la nitrogénase de la souche ORS571 apparaît beaucoup plus sensible aux sources d'azote combiné que celle des autres *Rhizobium* fixateurs libres connus qui peuvent dérégprimer leur nitrogénase en présence de 10 mM NH_4^+ (Bergersen et coll., 1976).

D'autre part, nous avons montré que la méthionine sulfoximine (MSX), un analogue de la glutamine qui inhibe la glutamine synthétase, réprime la biosynthèse de la nitrogénase de la souche ORS571 à des concentrations très faibles (5 μM), alors que la MSX est connue pour dérégprimer, en présence de NH_4^+ , la synthèse de la nitrogénase de nombreux fixateurs d'azote libres (Gordon et Brill, 1974).

Notons, par ailleurs, que le Professeur Aubert a récemment montré que l'addition d'ions NH_4^+ à des cultures de ORS572 fixant l'azote, inhibe l'activité nitrogénase comme dans le cas des bactéries photosynthétiques (Zumft et coll., 1981).

3.2.5.- Comparaison des propriétés de croissance et de fixation d'azote entre la souche ORS571 et les autres souches de *Rhizobium* étudiées :

Toutes les souches isolées des nodules de tiges de *Sesbania rostrata* (tableau 11) présentent une activité nitrogénase en culture libre variant entre 10 et 30 nmoles $\text{C}_2\text{H}_4/\text{mn}/\text{mg}$ de protéine.

Chez aucune des souches isolées de nodules racinaires de différentes espèces de *Sesbania* y compris *S. rostrata* (tableau 1), nous n'avons réussi à obtenir d'activité nitrogénase en culture pure.

La croissance de ces souches sur milieu YL est faible alors que leur taux de croissance en milieu YM varie entre 0,3 et 0,4 div.xh⁻¹. Contrairement aux *Rhizobium* de tige, les *Rhizobium* de racines n'assimilent pas l'ammoniaque mais le glutamate, et utilisent mal le lactate comme source de carbone.

3.3.- Recherche de mutants Nif⁻ de la souche ORS571 :

Par convention le terme Nif se rapporte au phénotype observé en culture libre ou sur boîte de Pétri, le terme Fix au phénotype observé après nodulation (Nod) de la plante.

3.3.1.- Isolement de mutants Nif⁻ sur boîte de Pétri :

Grâce à la propriété de la souche ORS571 de croître aux dépens de l'azote moléculaire, nous avons recherché des mutants de fixation d'azote en utilisant les techniques bactériologiques classiques. Deux mutagénèses à l'éthylméthane sulfonate (EMS) ont été réalisées en utilisant 200 g/ml⁻¹ EMS. Après mutagénèse (le taux de survie a été de 5% et la fréquence des mutants résistants à la streptomycine dans la population a été augmentée d'un facteur 5 à 10 par rapport à celle de mutations spontanées), environ 40 000 colonies incubées 5 jours sur milieu L0 solide et sous atmosphère N₂-O₂ (97%-3%) ont été examinées et les petites colonies ou les colonies translucides (figure 33A) ont été testées pour leur aptitude à fixer l'azote et leur auxotrophie. Parmi les 50 petites colonies testées, cinq mutants possèdent des activités nitrogénase en culture, nulles ou très faibles aussi bien dans les cellules entières que dans l'extrait brut (tableau 18). Ces cinq mutants Nif⁻ (5701, 5702, 5721, 5731 et 5740) ont un taux de croissance en

TABLEAU 18 : Activité nitrogénase de la souche ORS571 et des cinq mutants Fix⁻

Activité nitrogénase (nmole C ₂ H ₄ /mn/mg de protéine)				
Souche	Cellules entières	Extrait brut		
		Seul	+ Kp1	+ Kp2
<u>Souche sauvage :</u>				
571	22	56	—	—
<u>Mutants :</u>				
5701	2,9	1	1,2	0,5
5702	0	0	0	0
5721	0	0	0	0
5783	0,5	0	0	0
5740	0	0	3,6	0

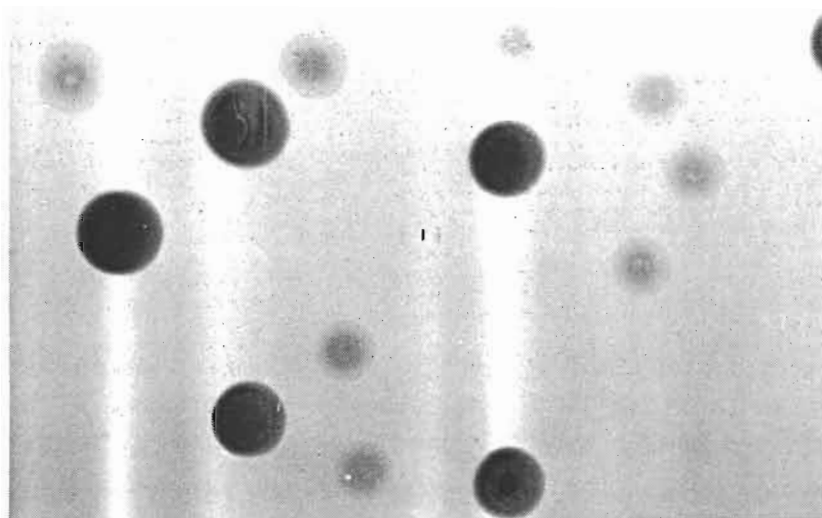
milieu YL ou LN identique à celui de la souche sauvage ORS571. Lorsqu'ils sont cultivés en fermenteur en milieu LO sous atmosphère N_2-O_2 (97%-3%), aucune croissance significative est observée et la DO_{570nm} est 0,3 comme dans le cas de la croissance de la souche ORS571 sous atmosphère $Ar-O_2$ (97%-3%) ou N_2-O_2 (80%-20%) (figure 31).

Les essais de complémentation biochimique des extraits bruts par Kp1 ou Kp2 de *Klebsiella pneumoniae* ont été négatifs sauf dans le cas du mutant 5740 où on observe une complémentation significative par Kp1 (tableau 18).

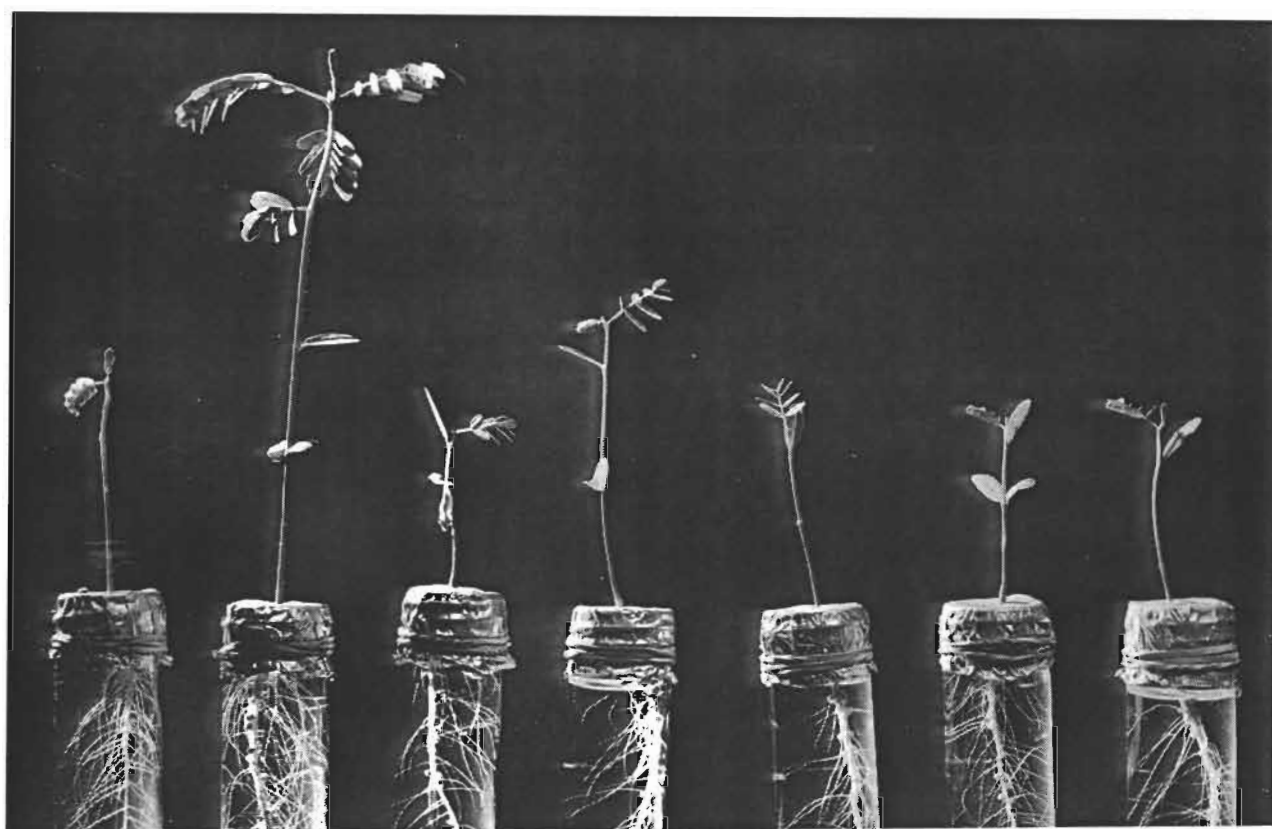
3.3.2.- Analyse phénotypique des mutants Nif^- sur la plante :

Chacun des cinq mutants Nif^- a été inoculé sur les racines ou sur les tiges de *Sesbania rostrata* pour vérifier leur aptitude à noduler et à fixer l'azote en symbiose. Tous les mutants Nif^- induisent la formation de nodules racinaires ou des nodules de tige en même temps que la souche sauvage (4 à 5 jours après l'inoculation), mais contrairement aux nodules formés par la souche ORS571, les nodules formés sur les tiges et les racines par les cinq mutants sont ineffectifs (figures 33B et 34). Aucune activité nitrogénase n'est détectable dans les nodules formés par les mutants et les plantes correspondantes (de couleur jaune) ont une croissance très faible, comparable à celle de la plante témoin non inoculée, alors que la plante inoculée avec la souche sauvage, aux feuilles vertes, s'est développée normalement. La figure 34 donne un exemple de la nodulation de *S. rostrata* par le mutant 5740. Dans ce cas, la croissance de la plante inoculée avec le mutant 5740 est comparable à celle du témoin non inoculé. Le mutant 5740, comme les quatre autres mutants Nif^- capables de donner des nodules non fixateurs d'azote sur les racines ou sur les tiges de *S. rostrata*, est donc un mutant Nif^- Fix^- .

A



B



Témoin
inoculé

ORS571

Mutant
5740

Mutant
5701

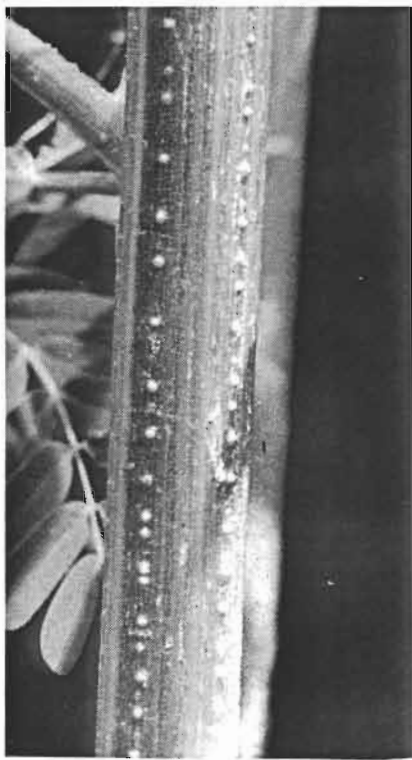
Mutant
5702

Mutant
5721

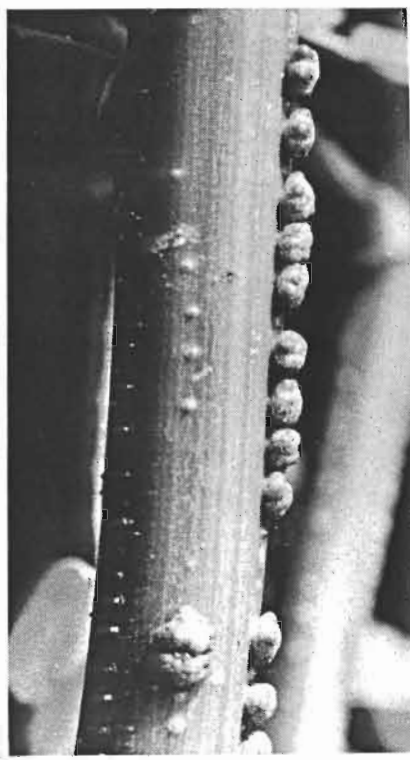
Mutant
5731

FIGURE 33 : A - Aspect des colonies de la souche ORS571 (colonies foncées) et du mutant Nif^- 5740 (petites colonies translucides) après cinq jours de croissance sur le milieu solide LO sous atmosphère $\text{N}_2\text{-O}_2$ (97%-3%).

B - Aspect des plantules de *Sesbania rostrata* inoculées en tubes par la souche ORS571 et les cinq mutants Nif^- .



Tige non inoculée



Tige inoculée par ORS571



Tige inoculée par le
mutant 5740

FIGURE 34 : Effet de l'inoculation de la tige de *Sesbania rostrata* par la souche ORS571 et le mutant Nif⁻ 5740 sur la croissance et la nodulation de plantes âgées de trente jours.

3.4.- Homologie de l'ADN total de la souche ORS571 avec l'ADN *nif* de *Klebsiella pneumoniae* :

L'ADN total de la souche ORS571 a été hydrolysé par différentes enzymes de restriction et mis à hybrider avec deux sondes *nif*, pSA30 (*nifHDK*) et pCMI (*nifQ-κ*). Des résultats semblables ont été obtenus avec le plasmide pSA30 entier ou le fragment purifié *EcoRI* de 6,2 kb du plasmide pSA30, qui porte les gènes de structure de la nitrogénase de *Klebsiella pneumoniae* : *nifHDK*. Des bandes d'hybridation entre les sondes *nif* pSA30 et pCMI, et l'ADN total hydrolysé par les enzymes *Bam*HI, *Bgl*II, *Hind*III, *Sal*I, *Xho*I et *Sma*I ont été détectées (figure 35). La masse moléculaire des fragments d'ADN de la souche ORS571 hybridant avec les deux sondes est donnée au tableau 19. Les mêmes fragments, sauf le fragment *Sma*I de 2 kb, ont été retrouvés avec les deux sondes. Dans le cas de la sonde pCMI, il apparaît plusieurs bandes d'hybridation supplémentaires, en particulier pour les fragments *Sal*I. Actuellement, il est impossible de dire si les bandes supplémentaires observées avec la sonde pCMI correspondent à la présence d'autres gènes *nif* ou s'il s'agit d'hybridation non spécifique ou d'hydrolyse partielle, d'autant plus qu'aucune hybridation n'a été observée avec une sonde correspondant au fragment de restriction *EcoRI* de 8,1 kb et qui contient les gènes *nifQBALF*.

De nouvelles hybridations devront être faites, mais d'ores et déjà, nous pouvons dire que les mêmes fragments hybridant avec pCMI et pSA30 qui n'ont en commun que le gène κ , il y a homologie avec κ .

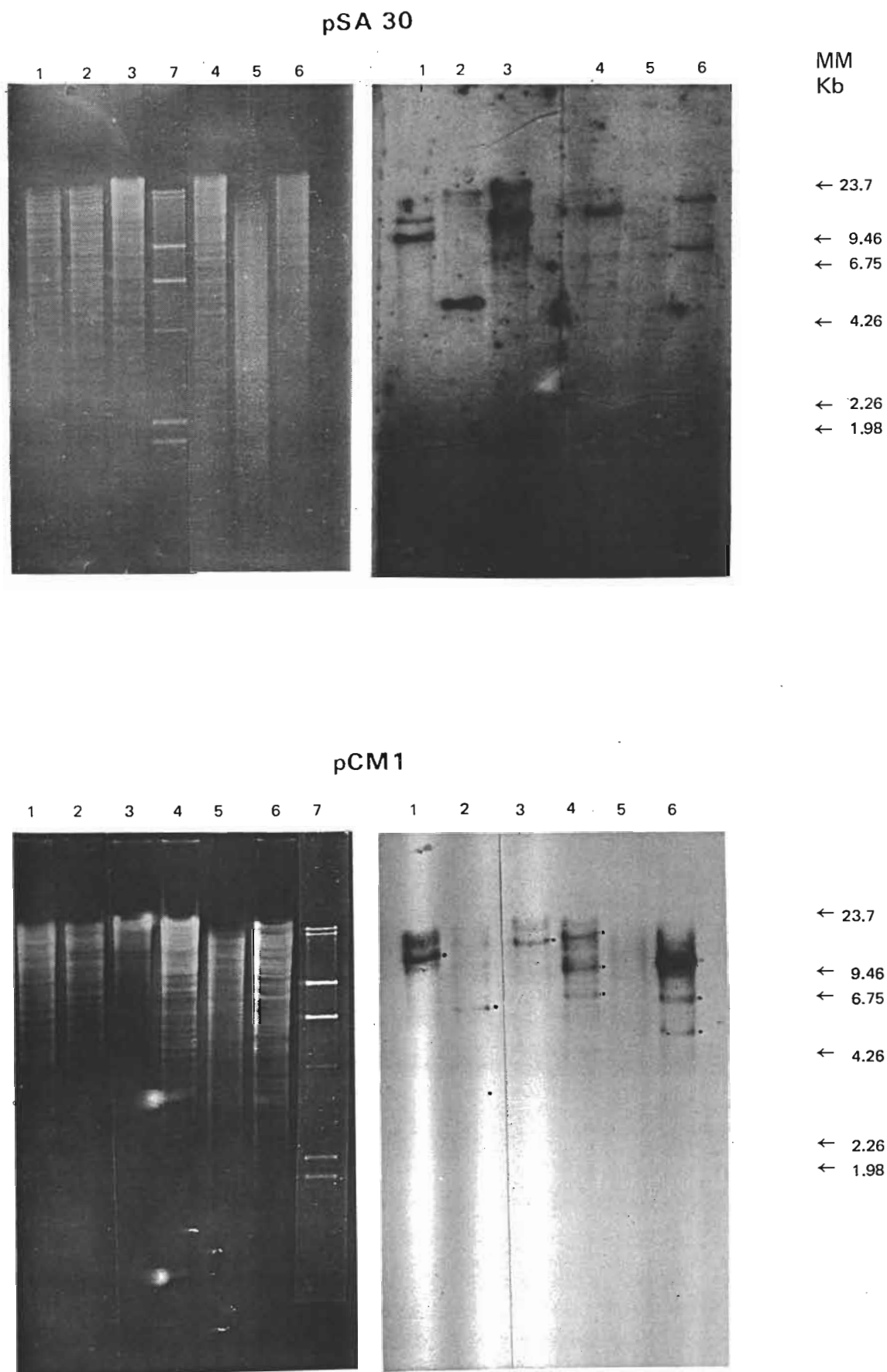


FIGURE 35 : Hybridation entre les sondes *nif* pSA30 et pCM1, et l'ADN total de la souche ORS571.
 1: *Bam*HI; 2: *Bgl*III; 3: *Hind*III; 4: *Sal*I; 5: *Sma*I; 6: *Xho*I;
 7: λ *Hind*III.

TABLEAU 19 : Masse moléculaire des fragments d'ADN total de la souche ORS571 hybridant avec les sondes *nif*, pSA30 et pCMI

Enzymes de restriction	Masse moléculaire en kb des fragments d'hybridation	
	pSA30	pCMI
<i>Bam</i> HI	13	13
<i>Bgl</i> II	7	7
<i>Hind</i> III	15,5	15,5
<i>Sal</i> I	16	[16 10 7
<i>Xho</i> I	[11 7	[11 7 5
<i>Sma</i> I	2	—

3.5.- Analyse génétique des mutants *Nif*⁻ :

Ce travail a été en grande partie réalisé à l'Institut Pasteur et a fait l'objet d'une publication commune (Elmerich et coll., 1982). L'analyse génétique des mutants *Nif*⁻ a été réalisée par constructions de diploïdes partiels. Le fragment *Bam*HI de 13 kb présentant de l'homologie avec les gènes *nifHDK* de *Klebsiella pneumoniae* a été cloné dans le vecteur λ L47.1 et sous-cloné dans les plasmides pBR322 et pRK290 (Elmerich et coll., 1982). Le plasmide pRK290 a été choisi car c'est un plasmide qui peut être introduit par conjugaison dans de nombreuses bactéries Gram négatif (Ditta et coll., 1980). La carte physique du fragment *Bam*HI de 13 kb est représentée à la figure 36 et la région d'homologie qui a pu être détectée correspond à un fragment de 4 kb. La carte de restriction du fragment (figure 36) confirme les résultats d'hybridation obtenus avec la sonde pSA30 (voir paragraphe 3.4.), à savoir l'homologie détectée avec un seul fragment *Bgl*II, *Sal*I, *Hind*II, mais n'explique pas la mise en évidence d'un deuxième fragment *Xho*I, ni l'existence d'un fragment *Sma*I.

Le plasmide obtenu par clonage, appelé pRS1, a été introduit par conjugaison dans les cinq mutants *Nif*⁻ (voir paragraphe 3.3.) à l'aide du plasmide mobilisateur pRK2013. La restauration du phénotype *Nif*⁺ et *Fix*⁺ a été obtenue à la fois en culture libre et dans les nodules avec un des cinq mutants, le mutant 5740. Comme l'addition de la protéine I de *Klebsiella pneumoniae* à l'extrait brut du mutant 5740 restaure l'activité nitrogénase, il est vraisemblable que le mutant 5740 possède une mutation dans un des gènes de structure qui code la protéine I, c'est-à-dire l'équivalent de *nifK* ou *nifD*.

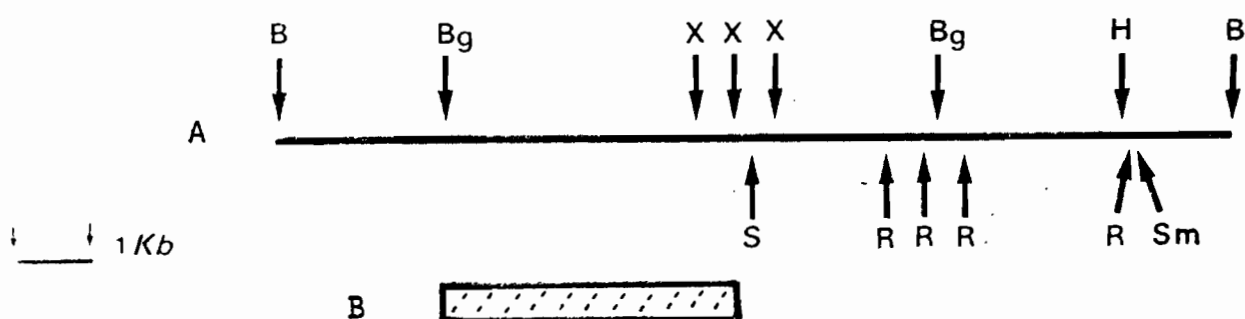


FIGURE 36 : A - Carte physique du fragment *Bam*HI de 13 kb.

B - Région d'homologie (4 kb) qui a pu être détectée avec le fragment *Eco*RI *nif*HDK de 6,2 kb de *Klebsiella pneumoniae*.

Sites de restriction : B: *Bam*HI; Bg: *Bgl*III; H: *Hind*III; R: *Eco*RI; S: *Sal*I; Sm: *Sma*I; X: *Xho*I (Elmerich et coll., 1982).

3.6.- Recherche d'autres moyens d'analyse génétique de la souche ORS571 :

3.6.1.- Etudes préliminaires sur un phage de la souche ORS571 :

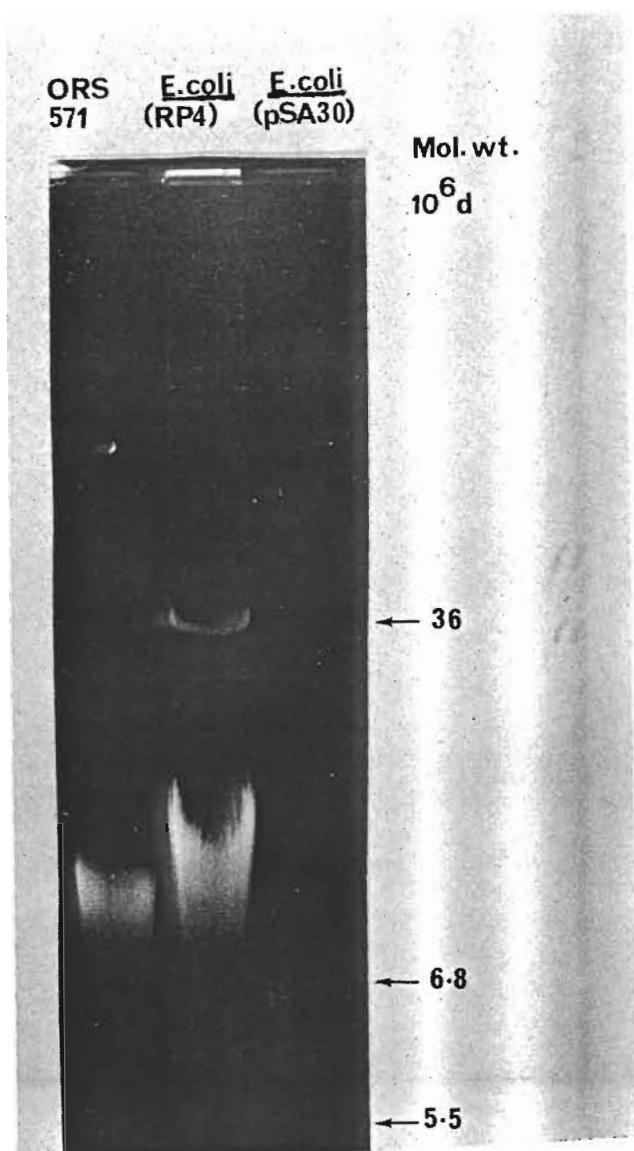
Nous avons isolé un phage appelé RSI à partir d'un broyat de nodules de tige séchés. Les plages de lyse sont claires et l'observation au microscope électronique d'un stock de phages (10^{11} particules/ml) a montré qu'il s'agissait d'un phage à tête icosaédrique possédant une queue longue (figure 37). La coloration à l'acétate d'uranyle met en évidence que les têtes phagiques sont pleines. Ce phage RSI est très spécifique de la souche de tige ORS571 et aucune des neuf souches testées de *Rhizobium* de racines de *Sesbania* (tableau 14) n'y est sensible. La masse moléculaire de son ADN a été estimée à 20×10^6 d (C. Franche, communication personnelle). Aucune bactérie lysogène n'a été trouvée et les essais de transduction de marqueurs de résistance aux antibiotiques ont été négatifs.

3.6.2.- Mise en évidence de plasmides :

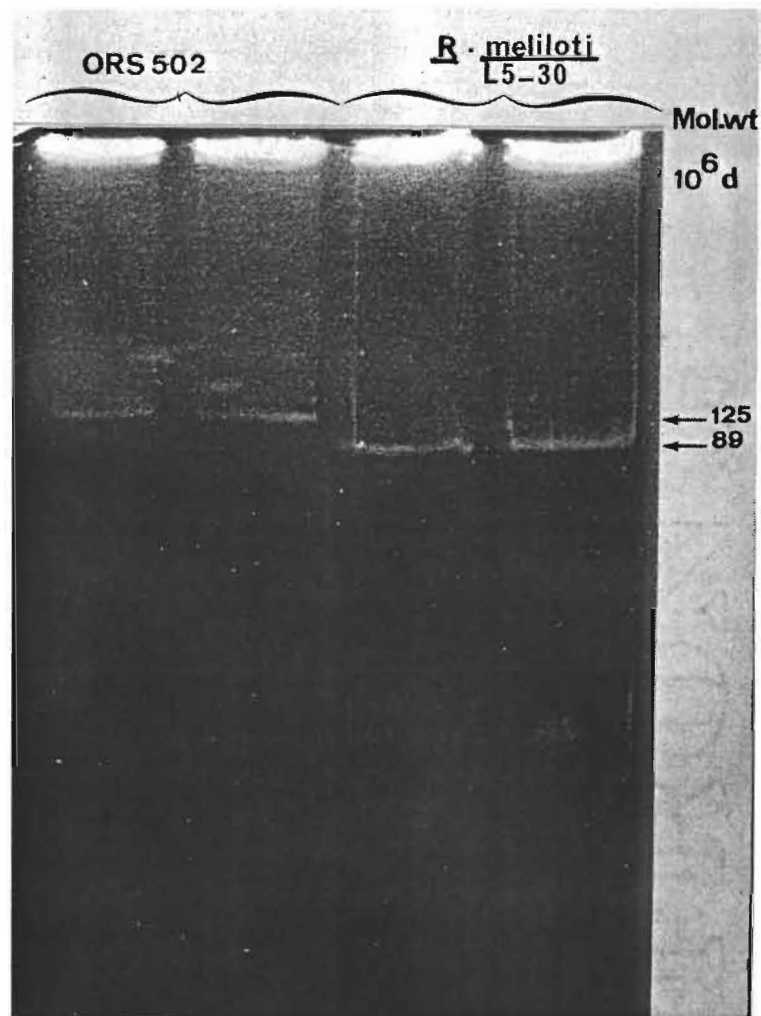
Nous avons examiné le contenu plasmidique de la souche ORS571 ainsi que celui de la souche de racines ORS502 capable de former des nodules ineffectifs sur la tige de *Sesbania rostrata* (voir Chapitre I). Chez la souche ORS571, un petit plasmide de masse moléculaire de $5,5 \times 10^6$ d a été mis en évidence par la technique de Meyers (1976) (figure 38). Chez la souche de racines ORS502, un plasmide de masse moléculaire égale à 100×10^6 d a été mis en évidence par la technique d'Eckhardt (1978) (figure 38). Aucun gros ou mégaplasme n'a pu être mis en évidence chez la souche ORS571.



FIGURE 37 : Photomicrographie de phage RSI, isole de nodules de tige secs et spécifiques de la souche ORS571.
Grossissement X420 000.



A



B

FIGURE 38 : Mise en évidence par électrophorèse en gel d'agarose (Technique de Meyers, 1976) d'un petit plasmide de masse moléculaire $5,5 \times 10^6$ d chez la souche ORS571 (A), et d'un plasmide de masse moléculaire 100×10^6 d chez la souche de racines de *Sesbania rostrata* ORS502 (Technique d'Eckhardt, 1978) (B).

Le mégaplasme de la souche de *Rhizobium meliloti* L5-30 n'est pas visible sur la photographie.

4.- DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats rapportés dans ce chapitre montrent que la souche de *Rhizobium* de tige de *Sesbania rostrata*, ORS571 qui a un temps de génération de 3 h sur milieu complet, non seulement possède une activité nitrogénase élevée en culture pure (20 nmoles C_2H_4 /mn/mg de protéine) sous atmosphère N_2-O_2 (97%-3%), mais a la propriété de pousser aux dépens de l'azote moléculaire comme seule source d'azote avec un temps de génération de 6 h. La souche ORS571 qui fixe l'azote en culture pure se comporte donc comme un fixateur libre ce qui n'a, jusqu'à présent, été observé chez aucun autre *Rhizobium*.

Nous avons d'autre part montré que les conditions de fixation d'azote en culture libre de la souche ORS571 étaient originales tant au niveau de l'adaptation à la température que de la sensibilité aux sources azotées ou de la tension d'oxygène. En ce qui concerne la tension d'oxygène dans la culture en fixation d'azote, les données de la littérature (Bergersen et Turner, 1980) montrent qu'il est nécessaire que la tension d'oxygène dans la phase gazeuse soit inférieure à 0,1% pour qu'il y ait dérégulation de la nitrogénase chez les *Rhizobium* à croissance lente. La tension d'oxygène optimum (3%) pour la fixation d'azote de la souche ORS571 est donc 30 fois supérieure et dénote une adaptation à l'oxygène de la souche ORS571 et l'existence d'un mécanisme de protection de la nitrogénase contre l'oxygène. De même, le fait que la nitrogénase soit tout autant fonctionnelle à 42°C qu'à 30°C montre une adaptation de la souche aux conditions de

fixation d'azote dans les nodules de tige, plus exposés aux températures élevées que les nodules de racines. D'autre part, à l'inverse des autres *Rhizobium* fixateurs libres, (Bergersen et coll., 1976), la biosynthèse de la nitrogénase de la souche ORS571 est réprimée par de faibles concentrations d'ammonium (0,3 mM) ou de glutamine (0,4 mM). Comme la fixation d'azote par les nodules de tige n'est pas inhibée par l'azote combiné du sol (voir Chapitre III), il est donc intéressant de noter qu'on ne peut déduire de la sensibilité à l'ammoniaque de la nitrogénase d'un *Rhizobium* en culture pure, la sensibilité à l'azote combiné de la fixation d'azote des nodules.

La propriété remarquable qu'a la souche ORS571 de se comporter comme un fixateur libre, nous a permis d'isoler directement sur boîte de Pétri des mutants Nif^- en utilisant les techniques classiques de génétique bactérienne. Ces mutants testés sur *Sesbania rostrata* ont nodulé les racines et les tiges mais sont incapables de fixer l'azote. Les essais de complémentation biochimique des extraits bruts des mutants par Kp1 et Kp2 ont été positifs dans le cas du mutant 5740 qui est complémenté par Kp1 et non par Kp2. Ce résultat suggère fortement que la mutation *nif*-5740 est dans les gènes de structure de la nitrogénase, bien qu'il ne soit pas possible, en l'état actuel, de connaître quel gène de la nitrogénase est muté. Seuls, jusqu'à présent, Maier et Brill (1976) avaient réussi une complémentation biochimique interspécifique chez *Rhizobium* par complémentation d'extraits bruts d'un mutant Fix^- des bactéroïdes de *Rhizobium japonicum* par la nitrogénase réductase (protéine II) d'*Azotobacter vinelandii*.

D'autre part, des bandes d'hybridation ont été obtenues entre les sondes *nif* de *Klebsiella pneumoniae* et l'ADN total de la souche ORS571. Ces résultats ont permis de cloner un fragment *Bam*HI de 13 kb dans le plasmide pRK290 et d'obtenir ainsi le plasmide pRSI (Elmerich et coll., 1982). Par conjugaison avec le mutant *Nif*⁻ 5740 une complémentation *ex planta* et *in planta* a été obtenue.

Il apparaît donc que, grâce à son aptitude à croître aux dépens de l'azote moléculaire, la souche ORS571 est un matériel de choix pour l'analyse biochimique et génétique de la fixation d'azote chez les *Rhizobium*.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES



L'étude de la symbiose entre les *Rhizobium* et la légumineuse tropicale à nodules caulinaires, *Sesbania rostrata*, a permis de mettre en évidence un nouveau système fixateur d'azote. En effet, les *Rhizobium* de tige diffèrent, par maints caractères et en particulier par leur aptitude à croître en culture libre aux dépens de l'azote moléculaire, de tous les autres *Rhizobium* actuellement connus. De même, les différentes propriétés de la nodulation de tige et en particulier, le mode d'infection, la non-inhibition par l'azote combiné, et le potentiel fixateur d'azote élevé, font que la symbiose *Sesbania* - *Rhizobium* diffère sur de nombreux points des autres symbioses *Rhizobium* - légumineuses à nodules racinaires.

Ces propriétés nouvelles, qui font de la symbiose *Rhizobium* - *Sesbania* un modèle unique parmi les légumineuses, permettent d'envisager le développement à la fois de recherches fondamentales et de recherches appliquées.

1.- RECHERCHES APPLIQUEES

Les résultats des expériences sur l'utilisation de *Sesbania rostrata* comme engrais vert en riziculture ont montré qu'il était possible de faire passer, en rizière, les rendements en riz de 1,5 à 4,5 tonnes de grains par hectare. La symbiose *Rhizobium* - *Sesbania* est donc, par son potentiel fixateur d'azote élevé, directement applicable à la riziculture et permettrait de supprimer tout apport coûteux d'engrais azotés. Les essais concernant aussi bien les problèmes de sélection de souches de *Rhizobium* et d'inoculation, que les études agronomiques et la sélection des plantes, devront être poursuivis non seulement en Afrique mais aussi en Asie. En effet, en Asie du Sud-Est, différentes espèces appartenant au genre *Sesbania* mais ne possédant pas de nodules de tige sont déjà traditionnellement utilisées comme engrais vert dans les rizières; l'introduction d'un système fixateur d'azote plus efficace comme *S. rostrata* en sera donc grandement facilitée.

2.- RECHERCHES FONDAMENTALES

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

- En ce qui concerne l'étude des gènes *nif*, la possibilité d'isoler directement sur boîte de Pétri des mutants Nif^- de la souche ORS571, devrait permettre de déterminer des groupes de complémentation, en particulier par la construction de diploïdes à partir d'une banque de gènes (Ditta et coll., 1980). Les propriétés mobilisatrices des plasmides du groupe P, de type R68-45 (Haas et Holloway, 1978) devraient aussi permettre, surtout si la localisation chromosomique des gènes *nif* de la souche ORS571 se confirme, de réaliser des échanges génétiques entre mutants de la souche ORS571 ou entre ces mutants et d'autres *Rhizobium*. Une complémentation interspécifique des mutants Nif^- de la souche ORS571 devrait aussi permettre, directement sur milieu de culture, l'analyse génétique et biochimique de gènes qui normalement ne s'expriment qu'en association avec la plante, comme c'est le cas chez tous les *Rhizobium* tempérés à croissance rapide.

Les résultats rapportés chez d'autres espèces de *Rhizobium* (voir Introduction Générale) montrent que les gènes *nif* sont groupés avec certains gènes *nod*. Il serait donc intéressant de cloner les régions adjacentes au morceau *Bam*HI de 13 kb, afin de voir si d'autres mutants Fix^- ou Nif^- , isolés directement sur boîte de Pétri, peuvent être complémentés.

D'autre part, une hybridation avec *nifA* ayant été obtenue avec *Rhizobium leguminosarum* (Johnston et coll., 1982), des études d'hybridation avec des sondes *nifLA* devront être menées. Si de tels gènes pouvaient être clonés, il serait alors intéressant de les transférer à d'autres *Rhizobium* afin de vérifier si ces derniers sont devenus capables de fixer l'azote en culture pure.

La souche de racines ORS502 qui possède la propriété remarquable de former des nodules ineffectifs sur la tige de *Sesbania rostrata*, contient en outre un plasmide de masse moléculaire 100×10^6 d. S'il était montré que ce plasmide porte des gènes *nif* ou *nod* son transfert à des mutants *Nif*⁻ ou *Nod*⁻ de la souche ORS571 devrait permettre d'obtenir une complémentation de ces mutants et de mieux comprendre la spécificité racines-tige.

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

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

Par les perspectives qu'elle ouvre aussi bien aux recherches appliquées qu'aux recherches fondamentales, l'étude de la symbiose *Rhizobium - Sesbania rostrata* et de ses *Rhizobium* de tige devrait donc donner une impulsion nouvelle aux recherches sur la fixation d'azote par les *Rhizobium*.

BIBLIOGRAPHIE

- Allen ON & Allen EK (1940) Response of the peanut plant to inoculation with *rhizobia* with special reference to morphological development of the nodules. Bot. Gaz. Chicago 102, 121-142.
- Appleby CA (1974) Leghaemoglobin. In: "The Biology of Nitrogen Fixation" Quispel A (ed) North-Holland Publ., Amsterdam, pp. 521-554.
- Arora N (1954) Morphological development of the root and stem nodules of *Aeschynomene indica* L. Phytomorphology 4, 211-216.
- Ausubel F, Buikema W, Earl C, Gibbons S, Long S, Ruvkun G & Zuckerman R (1982) Genetic analysis of symbiotic nitrogen fixation genes. In: "1st International Symposium on Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction". University of Bielefeld.
- Avissar YJ & Nadler KD (1978) Stimulation of tetrapyrrole formation in *Rhizobium japonicum* by restricted aeration. J. Bacteriol. 135, 782-789.
- Bánfalvi Z, Sakanyan V, Koncz C, Kiss A, Dusha I & Kondorosi A (1981) Location of modulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*. Molec. Gen. Genet. 184, 318-325.
- Beneman JR & Valentine RC (1972) The pathways of nitrogen fixation. Advances in Microbiol. Physiology. Rose AH & Tempest DW (eds), Academic Press, vol. 8, pp. 59-104.
- Bergersen FJ & Turner GL (1975) Leghaemoglobin and the supply of O_2 to nitrogen fixing root nodule bacteroids presence of the oxidase systems and ATP production of low free O_2 concentration. J. Gen. Microbiol. 91, 345-354.
- Bergersen FJ, Turner GL, Gibson AH & Dudman W (1976) Nitrogenase activity and respiration of cultures of *Rhizobium* spp. with special reference to concentration of dissolved oxygen. Biochim. Biophys. Acta 444, 164-174.
- Bergersen FJ (1978) Leghaemoglobin, oxygen supply and nitrogen fixation : studies with soybean nodules. In: "Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics". Dobereiner J, Burris RH & Hollaender A (eds), New York & London : Plenum Press, pp. 247-261.
- Bergersen FJ & Turner GL (1980) Properties of terminal oxidase systems of bacteroids from root nodules of soybean and cowpea and of N_2 -fixing bacteria grown in continuous culture. J. Gen. Microbiol. 118, 235-252.
- Berhaut J (1976) Flore illustrée du Sénégal. Clairafrique, Dakar, p. 56.
- Beringer JE, Beynon JL, Buchanan-Wollaston AV & Johnston AWB (1978) Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to *Rhizobium*. Nature 276, 633-634.
- Bisseling T, van den Bos RC, van Kammen A, van der Ploeg, van Duijn P & Houwers A (1977) Cytofluorometrical determination of the DNA contents of bacteroids and corresponding broth-cultured *Rhizobium* bacteria. J. Gen. Microbiol. 101, 79-84.

- Bohlool BB & Schmidt EL (1974) Lectins : a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume root nodule symbiosis. *Science* 185, 269-271.
- Bohlool BB & Schmidt EL (1976) Immunofluorescent polar tips of *Rhizobium japonicum* : possible site of attachment or lectin binding. *J. Bacteriol.* 125, 1188-1194.
- Brown CM & Dilworth MJ (1975) Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 86, 39-48.
- Burns RC & Hardy RWF (1975) Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springer-Verlag, New York.
- Cannon FC, Riedel GE & Ausubel FM (1977) Recombinant plasmid that carries part of the nitrogen fixation (*nif*) gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2963-2967.
- Cannon FC, Riedel GE & Ausubel FM (1979) Overlapping sequences of *Klebsiella pneumoniae nif* DNA cloned and characterized. *Molec. Gen. Genet.* 174, 59-66.
- Casse F, Boucher C, Julliot JS, Michel M & Dénarié J (1979) Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* 113, 229-242.
- Chandler MR (1978) Some observations on infection of *Arachis hypogea* L. by *Rhizobium*. *J. Exp. Bot.* 29, 749-755.
- Corbin D, Ditta G & Helinski DR (1982) Clustering of nitrogen fixation (*nif*) genes in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 149, 221-228.
- Corby HDL (1981) The systematic value of leguminous root-nodules. In: "Advances in Legume Systematics" Polhill RM & Raven PH (eds), Royal Botanical Gardens Press Kew, pp 107-129.
- Dalton H & Mortenson LE (1972) Dinitrogen (N_2) fixation (with a biochemical emphasis). *Bacteriol. Rev.* 36, 231-260.
- Dart PJ (1975) Legume root nodule initiation and development. In: "The Development and Function of roots". Torrey JG & Clarkson DT (eds), London Academic Press, pp. 467-506.
- Dart PJ (1977) Infection and development of leguminous nodules. In: "A treatise on Dinitrogen Fixation". Hardy RWF & Silver WS (eds), Wiley New York, Sect. III pp. 367-472.
- Dazzo FB, Hrabak EM, Urbano MR, Sherwood JE & Truchet G (1981). In : "Current Perspectives in Nitrogen Fixation." Gibson AH & Newton WE (eds), Elsevier/North-Holland Biomedical Press Amsterdam, The Netherlands, pp. 291-295.

- De Ley J & Rassel AJ (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 hybridization in the taxonomy of phytopathogenic bacteria. Ann. Rev. Phytopathology 6, 63-90.
- Dénarié J & Truchet G (1979) La symbiose *Rhizobium*-légumineuses : rôles respectifs des partenaires. Physiol. Végét. 17, 643-667.
- De Schmedt J & De Ley J (1977) Intra- and intergenic similarities of *Agrobacterium* ribosomal ribonucleic acid cistrons. Int. J. Syst. Bacteriol. 27, 222-240.
- Ditta G; Stanfield S, Corbin D & Helinski DR (1980) Broad range DNA cloning system for gram-negative bacteria : construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7347-7351.
- Dreyfus BL & Dommergues YR (1981) Nitrogen fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. FEMS Microbiol. Lett. 10, 313-317.
- Drummond M, Clements J, Merrick M & Dixon R (1982) Positive control and autogenous regulation at the *nifLA* promoter in *Klebsiella pneumoniae* Nature, sous presse.
- Dudman WI (1978) Structural studies of the extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum* strain 71A, CC708 and CB1795. Carbohydr. Res. 66, 9-23.
- Duhoux E & Dreyfus BL (1982) Nature des sites d'infection par le *Rhizobium* de la tige de la légumineuse *Sesbania rostrata*. C. R. Acad. Sci. Paris, 294, 407-411.
- Eckhardt T (1978) A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid 1, 584-588.
- Elmerich C, Dreyfus BL, Reyssset G & Aubert JP (1982) Genetic analysis of nitrogen fixation in a tropical fast-growing *Rhizobium*. EMBO J. 4, 499-503.
- Elmerich C, Houmard J, Sibold L, Manheimer I & Charpin N (1978) Genetic and biochemical analysis of mutants induced by bacteriophage Mu DNA integration into *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation genes. Molec. Gen. Genet. 165, 181-189.
- Elmerich DW & Burris RH (1978) Complementary functioning of the component proteins of nitrogenase from several bacteria. J. Bacteriol. 134, 936-943.
- Faelen M, Toussaint A, van Montagu M, van der Elsacker S, Engler G & Schell J (1977) *In vivo* genetic engineering : the Mu-mediated transposition of chromosomal DNA segments into transmissible plasmids. In: "DNA insertion elements, plasmids and episomes". Bukhari AI, Shapiro JA & Adhya L (eds), Cold Spring Harbor NY, pp. 521-530.
- Favre JM (1977) Ann. Univ. Abidjan série C, 99 p.

- Fyson A & Sprent JI (1980) A light and scanning electron microscope study of stem nodules in *Vicia faba* L. J. Experimental Botany, vol. 31 (no. 123), pp. 1101-1106.
- Garcia E, Bancroft S, Rhee SG & Kustu S (1977) The product of a newly identified gene, *glnF*, is required for the synthesis of glutamine synthetase in *Salmonella*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1662-1666.
- Garcia JL, Roussos S, Ben Soussan N, Bianqui A & Mandel M (1982) Taxonomie numérique des *Bacillus* thermophiles isolés de sols de rizières de l'Afrique de l'Ouest. Annal. Microbiol. Inst. Pasteur 133A, 471-488.
- Gerbaud C, Elmerich C, Tandeau de Marsac N, Chocat, P, Charpin N, Guérineau M & Aubert JP (1981) Construction of new yeast vectors and cloning of the *nif* (nitrogen fixation) gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* in yeast: Curr. Genet. 3, 173-180.
- Gibbins AM & Gregory KF (1972) Relatedness among *Rhizobium* and *Agrobacterium* species determined by three methods of nucleic acid hybridization. J. Bacteriol. 111, 129-141.
- Gibson AH (1977) The influence of the environment and managerial practices on the Legume-*Rhizobium* symbiosis. In: "A treatise on dinitrogen fixation", Section IV Agronomy & Ecology, Hardy RWF & Gibson AH (eds) 11, 394-438.
- Gibson AH & Pagan JD (1977) Nitrate effects on the nodulation of legumes inoculated with nitrate-reductase-deficient mutants of *Rhizobium*. Planta, 134, 17-22.
- Godfrey CA (1972) The carotinoïd pigment and deoxyribonucleic base ratio of a *Rhizobium* which nodulates *Lotononis bainesii*. J. Gen. Microbiol. 72, 399-402.
- Gordon JK & Brill JW (1974) Derepression of nitrogenase synthesis in presence of excess NH_4^+ . Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 967-971.
- Graham PH (1963) Antigenic affinities of the root-nodule bacteria of legumes. J. Microbiol. Serol. 29, 281-291.
- Graham PH (1964) The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. J. Gen. Microbiol. 35, 511-517.
- Hardy RWF & Havelka UD (1975) Nitrogen fixation research : a key to world food. Science 188, 633-643.
- Hardy RWF, Holste RD, Jackson EK & Burns RC (1968) The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. Pl. Physiol. 43, 1185-1207.

- Heberlein G, De Ley J & Tijtgat R (1967) Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of *Agrobacterium*, *Rhizobium*, and *Chromobacterium*. J. Bacteriol. 94, 116-124.
- Hennecke H (1981) Recombinant plasmids carrying nitrogen fixation genes from *Rhizobium japonicum*. Nature 291, 354-355.
- Hennecke H, Fuhrman M, Kaluza K, Hahn M & Regenburger B (1982) Genetic organization and expression of nitrogen fixation (*nif*) genes from *Rhizobium japonicum*. In: "Abstracts of the Symposium on Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction", Bielefeld, 11-14 octobre, p. 23.
- Hill S, Kennedy C, Kavanagh E, Goldberg RB & Hanau R (1981) Nitrogen fixation gene (*nifL*) involved in oxygen regulation of nitrogenase synthesis in *K. pneumoniae*. Nature 290, 424-426.
- Hombrecher G, Brewin NJ & Johnston AWB (1981) Linkage of genes for nitrogenase and nodulation ability on plasmids in *Rhizobium leguminosarum* and *R. phaseoli*. Molec. Gen. Genet. 182, 133-136.
- Hooykaas PJJ, van Brussel AAN, den Dulk-Ras H, van Slogteren GMS & Schilperoort RA (1981) Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and *Agrobacterium tumefaciens*. Nature 291, 351-353.
- Hutchinson J (1964) The genera of flowering plants. Oxford University Press, Vol. I, London & New York.
- Johnston AWB & Beringer JE (1977) Chromosomal recombination between *Rhizobium* species. Nature 267, 611-613.
- Johnston AWB, Setchell SM & Beringer JE (1978) Interspecific crosses between *Rhizobium leguminosarum* and *R. meliloti*: formation of haploid recombinants and of *R. primes*. J. Gen. Microbiol. 104, 209-218.
- Johnston AWB, Ma QS, Hombrecher G & Downir JA (1982) Genetic analysis of pRL1JI, a symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum*. In: "Fst International Symposium on Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction". University of Bielefeld.
- Jordan DC & Allen ON (1974) Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed., p. 261-264.
- Jordan DC (1980) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root-nodule bacteria from leguminous plants. Int. J. Syst. Bacteriol. 32, 136-139.
- Keister DL (1975) Acetylene reduction by pure cultures of *rhizobia*. J. Bacteriol. 123, 1265-1268.
- Kennedy C, Cannon F, Cannon M, Dixon R, Hill S, Jensen J, Kumar S, McLean P, Merrick M, Robson R & Postgate J (1981) Recent advances in the genetics and regulation of nitrogen fixation. Current Perspectives in Nitrogen Fixation. Fourth International Symposium on Nitrogen Fixation, Canberra. pp, 146-156.

- Kennedy C, Dreyfus B & Brockwell J (1981) Transfer, maintenance and expression of plasmids in strains of cowpea *Rhizobia*. J. Gen. Microbiol. 125, 233-240.
- Kennedy LD (1976) Isolation of 3-O-methyl-D-ribose from *Rhizobium* polyasaccharide. Carbohydr. Res. 52, 259-261.
- Kro1 ADM, Hontelez, JGJ, Roozendaal B & van Kammen A (1982) On the operon structure of the nitrogenase genes of *Rhizobium leguminosarum* and *Azotobacter vinelandii*. Nucleic Acids Res. 10, 4147-4156.
- Kurz WGW & La Rue TA (1975) Nitrogenase activity in *Rhizobia* in absence of plant host. Nature 256, 407-409.
- Langeron M (1949) Précis de microscopie. Collection des précis médicaux. Masson & Cie (eds).
- Legg JO & Sloger C (1975) A tracer method for determining symbiotic N₂ fixation in field studies. Proc. 2nd Int. Conf. Stable Isotopes. Klein & Klein (eds.) Oak Brook.
- Legocki RP & Verma DP (1980) Identification of "nodule specific" host proteins (nodulins) involved in the development of *Rhizobium*-legume symbiosis. Cell 20, 153-163.
- Lison L (1960) Précis de botanique. Gauthier-Villars (ed) Paris, 397 p.
- Long SR, Buikema WJ & Ausubel FM (1982) Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by direct complementation of Nod⁻ mutants. Nature 298, 485-488.
- Lovelace TE & Coldwell RR (1968) A multipoint inoculation for Petri dishes. Applied Microbiology 18, 944-945.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Ludwig RA (1978) Control of ammonium assimilation in *Rhizobium* 32H1. J. Bacteriol. 135, 114-123.
- Ludwig RA (1982) *Rhizobia* use free-living N₂ fixation to promote growth by a mechanism of crossfeeding. In: "Proceedings of 1st International Symposium on Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction". University of Bielefeld.
- MacNeil D & Brill WJ (1978) 6-cyanopurine, a color indicator useful for isolating mutations in the *nif* (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. J. Bacteriol. 136, 247-252.
- MacNeil T, MacNeil D, Roberts GP, Supiano MA & Brill WJ (1978) Fine structure mapping and complementation analysis of *nif* (nitrogen fixation) genes in *Klebsiella pneumoniae*. J. Bacteriol. 136, 253-266.
- Maier RJ & Brill WJ (1976) Ineffective and non-nodulating mutant strains of *Rhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 127, 763-769.

- Mandel M & Marmur J (1968) Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. In : "Methods in Enzymology", vol. 12B, pp. 195-206. Colowik SP & Kaplan NO (eds), Academic Press, New York & London.
- Marcker KA (1982) The organisation of the leghemoglobin genes upon the soybean chromosome. In: "Proceedings of 1st International Symposium on Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction." University of Bielefeld.
- Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J. Mol. Biol. 3, 208-218.
- Martinez de Drets G & Arids A (1972) Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* into fast and slow-growing groups. J. Bacteriol. 109, 467-470.
- McComb JA, Elliot J & Dilworth MJ (1975) Acetylene reduction by *Rhizobium* in pure culture. Nature 256, 409-410.
- Meijer EGM et Broughton WJ (1982) Biology of legume-*Rhizobium* interactions in nodule formation. In : "Molecular Biology of Plant Tumors" Academic Press, New York, pp. 107-123.
- Merrick M, Filser M, Dixon R, Elmerich C, Silbold L & Houmard J (1980) The use of translocatable genetic elements to construct a fine structure map of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation (*nif*) gene cluster. J. Gen. Microbiol. 117, 509-520.
- Merrick M, Hill S, Hennecke H, Hahn M, Dixon R & Kennedy C (1982) Repressor properties of the *nifLA* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. Molec. Gen. Genet. 185, 75-81.
- Merrick M, Filser M, Kennedy C & Dixon R (1978) Polarity of mutations induced by insertions of transposons Tn5, Tn7 and Tn10 into the *nif* gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. Molec. Gen. Genet. 165, 103-111.
- Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP & Falkows S (1976) Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 127, 1529-1537.
- Moffett M & Coldwell RR (1968) Adansonian analysis of the *Rhizobiaceae*. J. Gen. Microbiol. 51, 245-266.
- Munns DN (1977) In: "A treatise on Dinitrogen Fixation". Hardy RW & Gibson AH (eds), Wiley New York, pp. 353.
- Napoli CA, Dazzo F & Hubbell DH (1975) Ultrastructure of infection and "common antigen" relationships in *Aeschynomene*. In: "Proceedings of the Fifth Australian Legume Nodulation Conference", Vincent J (ed) 20 Suppl. 35-37, Brisbane
- Napoli C & Albersheim P (1980) *R. leguminosarum* mutants incapable of normal extracellular polysaccharide production. J. Bacteriol. 141, 1454-1456.

- Nuti MP, Ledeboer AM, Lepidi AA & Schilperoort RA (1977) Large plasmids in different *Rhizobium* species. *J. Gen. Microbiol.* 100, 241-248.
- Nuti MP, Lepidi AA, Prakash RK, Schilperoort RA & Cannon FC (1979) Evidence for nitrogen fixation on indigenous *Rhizobium* plasmids. *Nature* 282, 533-535.
- Nutman PS (1981) Hereditary host factors affecting nodulation and nitrogen fixation. In: "Proceedings of Fourth International Symposium on Nitrogen Fixation" Canberra, pp. 194-204.
- Pagan JD, Child JJ, Scowcroft WR & Gibson AH (1975) Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on a defined medium. *Nature* 255, 406-407.
- Pate JS (1977) Functional biology of dinitrogen fixation by legumes. In: "A treatise on dinitrogen fixation" Hardy RWF & Silver WF (eds), New York, pp. 473-517.
- Prakash RK, Schilperoort RA & Nuti M (1981) Large plasmids of fast-growing *Rhizobia* : homology studies and location of structural nitrogen fixation (*nif*) genes. *J. Bacteriol.* 145, 1129-1136.
- Pühler A, Burkardt HJ & Klipp W (1979) Cloning of the entire region for nitrogen fixation from *Klebsiella pneumoniae* on a multicopy plasmid vehicle in *Escherichia coli*. *Molec. Gen. Genet.* 176, 17-24.
- Quispel A (1974) The biology of nitrogen fixation. North-Holland Publishing Co, Amsterdam & New York.
- Quiviger B, Franche C, Lutfalla G, Rice D, Haselkorn R & Elmerich C (1982) Cloning of a nitrogen fixation (*nif*) gene cluster of *Azospirillum brasilense*. *Biochimie* 64, 495-503.
- Ranga Rao V (1977) Effect of root temperature on the infection processes and nodulation in *Lotus* and *Stylosanthes*. *J. Exp. Bot.* 28, 241-259.
- Rhodes ME (1958) The cytology of *Pseudomonas* spp. as revealed by a silver-plating staining method. *J. Gen. Microbiol.* 18, 639-648.
- Riedel GE, Ausubel FM & Cannon FC (1979) Physical map of chromosomal nitrogen fixation (*nif*) genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 2866-2870.
- Rigaud J (1976) Effet des nitrates sur la fixation d'azote par les nodules de haricot (*Phaseolus vulgaris* L.). *Physiol. Vég.* 14, 297-308.
- Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C & Berg P (1977) Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113, 237-251.
- Rinaudo G (1970) Fixation biologique de l'azote dans trois types de sols de rizières de Côte d'Ivoire. Thèse de Docteur Ingénieur, Université de Montpellier.

- Roberts GP, Leps WT, Silver LE & Brill WJ (1980) Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 414-422.
- Rolfe BF, Djordjevic MA, Morrison NA, Plazinski J, Bender GL, Gresshoff PM, Trinick MJ & Shine J (1982) Genetic analysis of the symbiotic regions in *Rhizobium trifolii* and *Rhizobium parasponia*. In: "Fst International Symposium on Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction". University of Bielefeld.
- Rosenberg C, Casse-Delbart F, Boistard P, Truchet G & Dénarié J (1980) Plasmid control of symbiotic properties in *Rhizobium meliloti*. In: "Fourth International Symposium on Nitrogen Fixation", Canberra, pp.137-141.
- Rosenberg C, Boistard P, Dénarié J & Casse-Delbart F (1981) Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Molec. Gen. Genet.* 184, 326-333.
- Ruvkun GB & Ausubel FM (1980) Interpecies homology of nitrogenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 191-195.
- Ruvkun GB & Ausubel FM (1981) A general method for site directed mutagenesis in procaryotes : construction of mutations in symbiotic nitrogen fixation genes of *Rhizobium meliloti*. *Nature* 289, 85-89.
- Sanders R, Raleigh E & Signer E (1981) Lack of correlation between extracellular polysaccharide and nodulation ability in *Rhizobium*. *Nature* 292, 148-149.
- Schell J & van Montagu M (1977) Transfer maintenance and expression of bacterial Ti plasmid DNA in plant cells transformed with *A. tumefaciens*. In: "Genetic Interaction and Gene Transfer." Brookhaven Symposium in Biology 29, pp. 36-38.
- Schildkraut CL, Marmur J & Doty P (1962) Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. *J. Mol. Biol.* 4, 430-433.
- Shanmugan KT, O'Gara F, Andersen K & Valentine RC (1978) Biological nitrogen fixation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29, 263-276.
- Sibold L, Melck D & Elmerich C (1981) A *nif* mutant of *Klebsiella pneumoniae* fixing nitrogen in the presence of ammonia. *FEMS Microbiol. Letters* 10, 37-41.
- Sibold L (1982) The polar effect on *nifM* of mutations in the *nifU*, *-S*, *-V* genes of *Klebsiella pneumoniae* depends on their plasmidic or chromosomal location. *Molec. Gen. Genet.* 186, 569-571.
- Skotnicki ML & Rolfe BG (1978) Transfer of nitrogen fixation genes from a bacterium with the characteristics of both *Rhizobium* and *Agrobacterium*. *J. Bacteriol.* 133, 518-526.

- Sloger C, Bezdicsek D, Milberg R & Boonferd N (1975) In: "Nitrogen fixation by free-living microorganisms". Stewart WDP (ed), University Press London, vol. 6, pp. 271-284.
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Stanier RY, Palleroni NJ & Doudoroff M (1966) The aerobic pseudomonads : a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43, 159-271.
- Stewart WDP, Haystead A & Pearson HW (1969) Nitrogenase activity in heterocysts of blue-green algae. *Nature* 224, 226-230.
- Suessenguth K & Beyerle R (1936) Über Bakterienknöllchen am Spross von *Aeschynomene paniculata*. Willd. *Hedwigia* 75, 234-237.
- Tjepkema J & Evans HJ (1975) Nitrogen fixation by free-living *Rhizobium* in a defined liquid medium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 625-628.
- 't Mannetje Z (1967) A re-examination of the taxonomy of the genus *Rhizobium* and related genera using numerical analysis. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* 33, 477-491.
- Trinchant JC & Rigaud J (1980) Nitrite inhibition of nitrogenase from soybean bacteroids. *Arch. Microbiol.* 124, 49-54.
- Trinick MJ (1980) Relationships among the fast-growing *rhizobia* of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *J. Appl. Bacteriol.* 49, 39-53.
- Truchet G (1978) Sur l'état diploïde des cellules du méristème des nodules radiculaires des Légumineuses. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Vég.* 19, 3-38.
- Tsien HC & Schmidt EL (1981) Localization and partial characterization of soybean lectin-binding polysaccharide of *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 145, 1063-1074.
- Tu JC (1975) Structural similarity of the membrane envelope of rhizobial bacteroids and host plasma membrane as revealed by freeze-fracturing. *J. Bacteriol.* 122, 691-694.
- van den Bos RC & Broughton WJ (1981) Viability of *Rhizobium leguminosarum* endosymbiontes in different stages of development. *Arch. Microbiol.* 129, 349-352.
- Verma DPS & Bal AK (1976) Intracellular site of synthesis and localization of leghemoglobin in root-nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3843-3847.

- Verma DPS & Zogbi V (1978) A cooperative action of plant and *Rhizobium* to dissolve the host cell wall during development of root-nodule. *Plant. Sci. Lett.* 13, 137-142.
- Verma DPS, Haugland R, Brisson N, Legocki RP & Lacroix L (1981) Regulation of the expression of leghaemoglobin genes in effective and ineffective root-nodules of soybean. *Biochim. Biophys. Acta* 653, 98-107.
- Vincent JM (1977) In: "A treatise on Dinitrogen Fixation. III. Biology". Hardy RWF & Sillver WS (eds) *Rhizobium* general Microbiology, pp. 277-366.
- Vincent JM (1980) Factors controlling the legume *Rhizobium* symbiosis. In: "Nitrogen Fixation". Newton WE & Orme-Johnson WH (eds), University Park Press, Baltimore (Md), vol. 2, pp. 103-129.
- Weber CR (1966) Nodulating and non-nodulating soybean isolines. I. Agronomic and chemical attributes. *Agron. J.* 58, 43-46.
- Yatazawa M & Yoshida S (1979) Stem nodules in *Aeschynomene indica* and their capacity of nitrogen fixation. *Physiol. Plant.* 45, 293-295.
- Zumft WG, Alef K & Mümmeler S (1981) Regulation of nitrogenase activity in *Rhodospirillaceae*. In: "Proceedings of Current Perspectives in Nitrogen Fixation", University of Erlangen, pp. 190-193.