

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP - DAKAR

Faculté des Sciences et Techniques



MEMOIRE D'ETUDES APPROFONDIES

(Option : *ECOLOGIE MICROBIENNE*)

présenté à la Faculté des Sciences

Département de Biologie Végétale

pour l'obtention du DEA

par

SOBERE AUGUSTIN TRAORE

Maître ès-Sciences

SUJET :

**"CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE LA NODULATION DE
TIGE PAR *Rhizobium* CHEZ UNE
LEGUMINEUSE AQUATIQUE, *Sesbania
pubescens* DC."**

Soutenu le 11 Novembre 1991

devant la Commission d'Examen composée de :

PRESIDENT: M. Antoine NONGONIERMA, Professeur Titulaire

MEMBRES : M. Bernard DREYFUS, Directeur de Recherche ORSTOM

M. Kodjo TOMEKPE, Chercheur ORSTOM

Mme Yaye Kene GASSAMA-DIA, Maître-assistant

Mme Marie-Madeleine SPENCER-BARRETO, Maître-assistant.

15 OCT. 1993



φ84
SYMBIO φ2
TRA

#200070714
1expFDI
Non Num
F 38.223

AVANT- PROPOS

Le travail présente dans ce rapport a été réalisé entièrement dans le LABORATOIRE de MICROBIOLOGIE des SOLS de l'ORSTOM Bel-Air avec la collaboration technique de la FACULTE des SCIENCES de l'UNIVERSITE Cheikh Anta DIOP de DAKAR .

Nous **tenons** à y associer tous ceux qui par leur amicale sympathie, leur **enseignement**, ont contribué à son aboutissement.

Nous exprimons en premier lieu, notre gratitude à Monsieur A. FONTANA, Directeur de l'ORSTOM au Sénégal (au moment de notre admission au sein de l'ORSTOM).

Monsieur le Professeur A. Tidiane BA, Chef du Département de Biologie Végétale à la Faculté des Sciences de l'Université Cheikh Anta DIOP de Dakar, pour à la fois toute la confiance et les encouragements qu'il nous a toujours témoignés.

Monsieur Bernard DREYFUS, responsable du Laboratoire de Microbiologie des Sols de l'ORSTOM Bel-Air, pour la confiance qu'il nous a accordée en nous accueillant dans leur établissement, pour la compréhension dont il a fait preuve à notre égard, et le soutien qu'il n'a cessé de nous dispenser, et nous tenons à l'assurer de notre respectueux attachement .

Nous remercions Madame M.M. SPENCER-LOPEZ BARRETO, Maître-Assistant à la Faculté des Sciences, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant spontanément de diriger ce travail; elle s'est toujours montrée très intéressée à nos entreprises.

Nous sommes particulièrement heureux de pouvoir témoigner notre profonde reconnaissance à Madame Catherine DETREZ, Chercheur à l'ORSTOM, à Monsieur Kodjo TOMEKPE, Chercheur à l'ORSTOM et à Monsieur I. NDOYE, Chercheur à la DAST pour toute leur expérience scientifique dont ils nous ont fait bénéficier et surtout pour leur patience dans le suivi de ce travail.

Nous remercions Monsieur le Professeur Antoine NONGONIERMA, de l'Université C.A.D. de Dakar, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider notre jury de mémoire de DEA.

Nous sommes très honorés par la présence à notre jury de mémoire, et tenons à remercier :

- Madame Marie Madeleine SPENCER-LOPES BARRETO, pour les conseils que vous nous avez prodigués au cours de la réalisation de ce travail.

- Madame Yaye Kene GASSAMA-DIA, vous avez accepté spontanément de juger ce travail, nous vous en savons gré.

- M. Kodjo TOMEKPE, pour l'intérêt qu'il a manifesté pour ce sujet de recherche.

Nous devons beaucoup à

- Monsieur Maurice Lompo PALM, pour tout le soutien qu'il nous a apporté et son intérêt à notre travail, nous tenons à lui exprimer tous nos sincères remerciements.

- Tous les amis et camarades qui nous ont soutenus pendant toute cette période.

Nous remercions toute la dynamique équipe du Laboratoire de Microbiologie des Sols de l'ORSTOM Bel-Air (chercheurs et techniciens tous confondus) pour tout le soutien très amical qu'elle nous a manifesté, plus particulièrement, Messieurs Assane NDIAYE, Tahir DIOP, Marc NEYRA, Philippe de LAJUDIE, Marc DUCOUSSO, Pierre BEAUJARD, Jean LORQUIN, Nicolas DUPUY, Didier ALAZARD, a Madame Anna Marthe KONTE pour sa bienveillante assistance dans la mise en forme de ce document et tous les techniciens du Laboratoire de Microscopie Electronique du Département de Biologie Animale de la Faculté des Sciences de l'Université C.A.D. de Dakar, en particulier Monsieur MOUNPORT et Monsieur NDAO pour toute l'assistance technique qu'ils nous ont apportée dans la réalisation de ce travail.

*Je dédie ce mémoire
à mes parents,*

à tous ceux qui ont partagé mes soucis pendant ces années,
ceci est le fruit des énormes sacrifices que vous avez consentis.

Résumé

Dans le genre *Sesbania*, la présence de sites préformés et le phénomène de nodulation caulinaire n'étaient jusque là connus que chez l'espèce *S. rostrata*. Les premières observations n'ont pas permis de déceler une nodulation caulinaire spontanée chez *S. pubescens*. Cette plante présente toutefois des sites caulinaires préformés nettement visibles surtout à l'aisselle des feuilles. Dans les conditions d'inondation (naturelles ou expérimentales), la formation de nodules caulinaires a été obtenue. De même, l'inoculation après grattage superficiel de l'épiderme des mamelons caulinaires ou l'injection sous épidermique a conduit à la formation de nodules en chambre de culture.

Nous avons isolé et étudié l'infectivité et l'effectivité de souches de *Rhizobium* issues de nodules de racines et de tiges.

Une étude cytologique par des techniques de microscopie photonique et électronique à balayage a permis de préciser la structure et la nature des sites de *S. pubescens*. Cette structure est caractérisée par la présence systématique de cellules épidermiques recouvrant l'ébauche de la racine alors que chez *S. rostrata* et chez *A. afraspera*, ces sites de nodulation présentent une racine qui fait extrusion des tissus épidermiques de la tige. Cette étude nous a permis de suggérer que les sites de nodulation observés chez *S. pubescens* ne sont pas des "sites compétents pour l'infection externe" par les *Rhizobium*.

Mots-clés : Fixation symbiotique de l'azote - *Rhizobium*, *S. pubescens* - Mamelons caulinaires - Structure cytologique - Nodulation caulinaire expérimentale.

Sommaire

| | |
|--|----|
| LISTE DES GRAPHIQUES | 7 |
| LISTE DES TABLEAUX D'ILLUSTRATION DU TEXTE | 8 |
| INDEX DES SIGLES ET ABREVIATIONS DU TEXTE | 10 |
| INTRODUCTION GENERALE | 11 |

CHAPITRE I

ETUDE DE LA NODULATION RACINAIRE
ET COMPARAISON DE LA FIXATION D'AZOTE
CHEZ *S. ROSTRATA* (SAUVAGE ET DEUX MUTANTS)
ET CHEZ *S. PUBESCENS*

| | |
|---|----|
| I- INTRODUCTION | 15 |
| II- MATERIEL & METHODES | 16 |
| 2. 1. Matériel végétal | 16 |
| 2.1.1. Germination des graines et mise en culture des plantes | 16 |
| 2.1.2. Culture en pots | 16 |
| 2.1.3. Culture hydroponique=culture en tubes | 17 |
| 2.2. Matériel bactérien | 17 |
| 2.2.1. Les milieux de culture pour les bactéries | 17 |
| 2.2.1.1. Le milieu de culture pour <i>Azorhizobium</i> | 17 |
| 2.2.1.2. Le milieu de culture pour <i>Rhizobium</i> | 18 |
| 2.2.2. Isolement et culture des souches bactériennes | 18 |
| 2.2.2.1. Isolement des souches de <i>Rhizobium</i> à partir des nodules | 18 |
| 2.2.2.2. Isolement à partir du sol | 19 |
| 2.2.2.2.1. Isolement direct | 19 |
| 2.2.2.2.2. Isolement indirect par piégeage | 19 |
| 2.2.3. Evaluation de la fixation de l'azote par la mesure de l'Activité de la nitrogénase (ARA) | 20 |
| 2.3. Comparaison de la nodulation et la fixation de l'azote chez <i>S.</i> <i>rostrata</i> , <i>S. pubescens</i> et deux mutants de <i>S. rostrata</i> | 22 |
| 2.3.1. Protocole expérimental de l'étude comparative | 22 |
| Plantes | 23 |
| Inoculation | 23 |
| Régime hydrique | 23 |
| 2.3.2. Evaluation de la fixation d'azote | 24 |

| | |
|---|----|
| III- RESULTATS | 25 |
| 3.1. Infectivité des souches sur les racines | 26 |
| 3.1.1. Nombre de nodules racinaires | 26 |
| 3.1.2. Infectivité relative des souches | 28 |
| 3.2. Effectivité des souches (fixation symbiotique de l'azote) | 28 |
| 3.3. DISCUSSION | 30 |
| 3.4. Comparaison de la nodulation et de la fixation d'azote chez <i>S. rostrata</i> , <i>S. pubescens</i> et deux mutants de <i>S. rostrata</i> | 31 |
| 3.4.1. Nombre moyen de nodules racinaires | 31 |
| 3.4.2. Poids secs moyens des nodules racinaires | 33 |
| 3.4.3. Poids secs moyens des parties aériennes (biomasse aérienne) | 34 |
| 3.4.4. Hauteurs des plantes | 35 |
| 3.5. DISCUSSION | 36 |

CHAPITRE II

ETUDE DES SITES DE NODULATION CAULINAIRE ET NODULATION EXPERIMENTALE CHEZ *S. pubescens*

| | |
|---|----|
| I- INTRODUCTION | 39 |
| II- MATERIEL & METHODES..... | 41 |
| 2.1. Etudes cytologiques : techniques de microscopie photonique | 41 |
| 2.1.1. Matériel biologique | 41 |
| 2.1.2. Fixation des échantillons | 41 |
| 2.1.3. Déshydratation | 42 |
| 2.1.4. Imprégnation progressive | 43 |
| 2.1.5. Inclusion proprement dite | 43 |
| 2.1.6. Préparation et coloration des coupes | 43 |
| 2.1.7. Montage..... | 45 |
| 2.2. Techniques de microscopie électronique à balayage..... | 45 |
| 2.2.1. Observations directes après congélation | 45 |
| 2.2.2. Préparation et observations après déshydratation | 45 |
| 2.3. Techniques d'inoculation de plantes entières en chambre de culture | 46 |
| 2.4. Méthodes de bouturage et d'inoculation des boutures | 47 |
| 2.4.1. Bouturage en serre | 47 |
| 2.4.2. Bouturage en chambre de culture | 48 |
| 2.4.3. Inoculation des boutures | 48 |
| i) - l'inoculation en immersion | 49 |
| ii)- l'inoculation en émersion | 49 |
| 2.5. Méthodes d'analyse statistique utilisées | 49 |
| 2.6. Techniques de greffage | 51 |
| III- RESULTATS | 51 |

| | |
|--|----|
| 3.1. Etude morphologique des mamelons caulinares de <i>S. pubescens</i> | 51 |
| 3.1.1. Répartition spatiale des mamelons caulinares (observations morphologiques) | 51 |
| 3.1.2. Structure anatomique de mamelon caulinaire bien développé | 51 |
| 3.2. Etude de l'ontogenèse des mamelons caulinares | 52 |
| 3.2.1. Aspects morphologiques..... | 52 |
| 3.2.2. Aspects histologiques..... | 52 |
| 3.3. Etude de l'évolution des ébauches racinaires en racines adventives : Formation de l'aérenchyme et élongation de la racine adventive | 52 |
| 3.4. Etude de l'évolution des mamelons caulinares en nodules | 54 |
| 3.4.1. Potentialités de nodulation sur les plantes entières..... | 54 |
| 3.4.2. Potentialités de nodulation sur boutures de tiges immergées | 55 |
| i - description morphologique | 55 |
| ii - cinétique de la nodulation | 55 |
| 3.4.3. Influence de la date d'inoculation sur la formation des nodules | 56 |
| 3.4.4. Influence du nombre de racines sur le nombre de nodules formés | 56 |
| 3.5. Résultats des greffes..... | 57 |
| 3.6. DISCUSSION & CONCLUSION | 57 |
| BIBLIOGRAPHIE | 62 |

Annexes

LISTE DES GRAPHIQUES

- 1** : Expression de l'infektivité relative des souches testées chez *S. pubescens*.
- 2** : Expression de l'effectivité relative des souches testées chez *S. pubescens*.
- 3a** : Croissance des plantes de *S. rostrata* "IP", "SST", et sauv. en conditions de submersion du sol.
- 3b** : Croissance des plantes de *S. rostrata* "IP", "SST" et sauv. en conditions de drainage du sol.
- 4a** : Courbe de croissance des plantes de *S. rostrata* et de *S. pubescens* inoculées (racines) en conditions de submersion du sol.
- 4b** : Courbe de croissance des plantes de *S. rostrata* et de *S. pubescens* inoculées (racines) en conditions de drainage du sol.
- 5a** : Courbe de croissance des plantes de *S. rostrata* "IP" et sauv. inoculées (racines et tiges) en conditions de submersion du sol.
- 5b** : Courbe de croissance des plantes de *S. rostrata* "IP et sauv. inoculées (racines et tiges) en conditions de drainage du sol.
- 6** : Allongement de la racine adventive d'un mamelon caulinaire de l'aisselle de la feuille.
- 7a** : Nombre de mamelons caulinaires réactivés sur 12 boutures de *S. pubescens* après 64 jours d'immersion.
- 7b** : Nombre de mamelons caulinaires réactivés sur 12 boutures de *S. pubescens* après 12 jours d'immersion.
- 8** : Nodulation caulinaire sur les racines adventives des boutures chez *S. pubescens*.
- 9** : Influence de la date d'inoculation sur la nodulation caulinaire des boutures chez *S. pubescens*.
- 10** : Relation entre le nombre de racines adventives et la nodulation caulinaire sur les boutures de *S. pubescens*.

LISTE DES TABLEAUX D'ILLUSTRATION DU TEXTE

- I** Composition et caractéristiques physico-chimiques du sol de Bel-Air.
- II** Liste des souches dont l'aptitude à la nodulation a été testée chez *S. pubescens*.
- III** Nombre de nodules racinaires.
- IV** Infectivité des souches testées chez *S. rostrata* et chez *S. pubescens*.
- V** Résultats de la mesure de l'ARA spécifique.
- VI** Nodulation et effectivité des souches d'*Azorhizobium* et de *Rhizobium* testées chez *S. pubescens* et *S. rostrata*.
- VII** Nombre de nodules racinaires (en nodules/plante) des 4 types de plantes sous les deux régimes hydriques.
- VIII** Nombre de nodules de tige chez *S. rostrata* sauvage et le type "IP".
- IX** Poids secs moyens de nodules racinaires (en g/ plante) selon le régime hydrique pour les 4 types de plantes.
- X** Poids secs moyens des parties aériennes (biomasse aérienne en g/plante).
- XI** Hauteurs moyennes des plantes (en cm/plantes).
- XII** Composition des solutions de fixation (AFA, Nawashine).
- XIII** Composition des solutions de bains d'éthanol de déshydratation.
- XIV** Composition des mélanges alcool-toluène d'imprégnation.
- XV** Composition des mélanges toluène-Paraplast.
- XVI** Passages dans les bains d'alcool, de toluène et d'eau distillée pour la réhydratation.

Tableau 1 : Caracteristiques physico-chimiques du sol de Bel-Air.

| Composants | Teneur |
|---------------|---------|
| Argile | 4,40 % |
| Limon fin | 0,90 % |
| Sable fin | 92,70 % |
| Carbone | 0,30 % |
| Azote | 0,027 % |
| P assimilable | 105 ppm |
| P total | 276 ppm |
| pH | 7,0 |

NB : - le sol de Bel-Air est un sol peu evolue issu d'une roche mere
constituee de sable quaternaire ;

- l'azote total a ete dose apres mineralisation a l'acide sulfurique concentre ;
- le P assimilable a ete dose apres extraction a NaHCO_3 0,5M selon la methode de Olsen (Jackson, 1958) ;
- le P total a ete dose apres mineralisation a NHO_3 ;
- le pH a ete mesure dans un melange sol-solution de KCl 1N (1/2,5 ; V/V).

Toutes ces analyses ont ete effectuees au laboratoire de chimie de IORSTOM de Dakar (Senegal).

XVII Composition de la solution de mordant.

XVIII Composition des principaux colorants utilisés (Paragon, Bleu de toluidine, Hématoxyline ferrique de Régaud).

XIX Opérations d'inoculation de plantes entières.

XX Résultats des opérations d'inoculation des plantes entières de culture hydroponique.

INDEX DES SIGLES ET ABREVIATIONS DU TEXTE

- A.* : *Aeschynomene*
A : alcool
ARA : Activité Réductrice d'Acétylène
Aé : aërenchyme
bact. : bactéries
C. : *Casuarina*
Cc. : cellules corticales
Cc. : cylindre central
Ca (ou C) : cavité annulaire ou cavité circulaire
Cl. : coupe longitudinale
Ct. : cortex de la tige
D : dôme (épidermique)
ED : eau distillée
Ep.(ou ép) : épiderme
ER ou(Er) : ébauche racinaire
IP : mutant insensible à la photopériode
IRRI : International Rice Research Institute
MNd (ou mn) : meristème nodulaire
Mc (ou mc) : mamelon caulinaire
MR (ou MER) : méristème de l'ébauche racinaire
N. : *Neptunia*
Ndtou Nf : nodule
ORSTOM : Institut Français de Recherche Scientifique pour le
Développement en Coopération
ORS : sigle de dénomination des souches isolées au
laboratoire de l'ORSTOM Bel-Air de Dakar
P : périderme
Pi : poche d'infection
Ph : phloème
Pl. : Planche
Rad. (ou Ra) : racine adventive
Rs : racine secondaire
S. : *Sesbania*
sauv. : type sauvage
 spp. : espèce pluriel
SST : mutant sans site sur la tige
T : tige
V : vascularisation ou système vasculaire
VT (ou Vt) : vascularisation de la tige
Vn : vascularisation du nodule
VR (ou Vr) : vascularisation de la racine
YL : Yeast extract Lactate
YM : Yeast extract Mannitol
Z I II III : zonation des tissus du nodule mûre.

| Souches | Origine d'isolement | Origines géographiques | Références |
|---------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|------------------|
| Azorhizobium caulinodans ORS571 | S. rostrata nod tige | Région du Fleuve (Nord Sénégal) | B.DREYFUS - |
| Rhizobium sp. ORS 52 | S. rostrata nod. racines | Sénégal | - |
| ORS 53 | - | - | - |
| ORS 611 | S. grandiflora rose | Philippines | I NDOYE |
| ORS 616 | S. grandiflora blanche | Inde | - |
| ORS P1 | ? | ? | B.DREYFUS et al. |
| ORS P2 | S. pubescens nod tige | Sénégal | - |
| ORS S1 | S. rostrata nod. tige | Région du Fleuve (Nord Sénégal) | - |
| ORS Pb 50 | - | - | - |
| ORS P 4 | S. pubescens nod. racines | Sénégal(Cap-Vert) | - |
| ORS P 8 | - | - | - |
| ORS P10 | - | - | - |
| ORS P6 | Rhizosphère(sol) | - | - |
| ORS P12 | - | - | - |
| ORS P14 | - | - | - |
| ORS P 3 | S. pubescens nod. racines | - | - |
| ORS P9 | - | - | - |
| ORS P 13 | - | - | - |
| ORS P7 | Rhizosphère(sol) | - | - |
| ORS P 11 | - | - | - |
| ORS P 15 | - | - | - |
| ORS P16 | S. pubescens nod. tige | Gambie (Fleuve Gambie) | - |
| ORS P17 | - | - | - |

Tableau n° 2 : Liste des souches utilisées.

INTRODUCTION GENERALE

Plus d'une cinquantaine d'espèces bactériennes, de nombreuses espèces de cyanobactéries et d'actinomycètes et quelques archæobactéries méthanogènes sont connues pour leur propriété de fixer l'azote de l'air. Aucun eucaryote ne possède cette propriété. Deux catégories de fixateurs d'azote peuvent être distinguées :

- les fixateurs libres qui ne sont associés à aucun organisme (par exemple une plante hôte). Ils appartiennent aux genres *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, aux bactéries photosynthétiques et aux cyanobactéries.

- les fixateurs symbiotiques qui sont associées à une plante. Dans cette association, la plante fournit à la bactérie les hydrates de carbone issus de la photosynthèse en échange de l'azote qui lui est nécessaire pour sa croissance. Ce sont les systèmes les plus efficaces pour la fixation de l'azote.

Parmi les associations symbiotiques les plus connues on peut citer les symbioses

- *Rhizobium*-légumineuses
- *Frankia*-plantes actinorhiziennes (*Casuarina* et *Alnus*)
- *Anabæna*-*Azolla*
- *Rhizobium*-*Parasponia* (non légumineuse).

Trois genres de bactéries (appartenant aux Rhizobiacées) sont capables de s'associer aux légumineuses:

- les *Rhizobium* qui fixent l'azote en association avec la plupart des légumineuses tempérées et certaines légumineuses tropicales telles que les *Acacia*

- les *Bradyrhizobium* qui sont généralement associés aux légumineuses tropicales

- les *Azorhizobium* associés aux nodules caulinaires de *Sesbania rostrata*.

L'établissement de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuse est un processus complexe qui comprend plusieurs étapes. Les bactéries ou microsymbiotes s'attachent d'abord à la zone pilifère de la racine puis pénètrent par l'extrémité recourbée d'un poil absorbant. Il se forme ensuite, dans chaque poil, un ou deux cordons d'infection qui contiennent les bactéries. Ces cordons s'allongent ensuite jusqu'aux cellules corticales, puis libèrent les bactéries à l'intérieur des cellules qui se différencient pour former un méristème nodulaire. A ce stade, les bactéries se multiplient, s'entourent d'une membrane, elles sont alors appelées bactéroïdes. C'est sous cette forme qu'elles ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique en le transformant en azote ammoniacal.

Un autre mode d'infection : la pénétration intercellulaire ou "crack- entry" est souvent observé chez les légumineuses tropicales et subtropicales (comme *Arachis*, *Aeschynomene*. Dreyfus *et al.*, 1980 ; Alazard, 1990). Ce mode d'infection se caractérise par une pénétration des bactéries entre les cellules corticales des racines et par l'absence de cordons d'infection.

Les nodules se forment généralement sur les racines ; mais quelques espèces forment également des nodules sur les tiges.

Observés pour la première fois sur *Aeschynomene aspera* J. Léon. (Hagerup, 1928), les nodules caulinaires ont été découverts par la suite chez de nombreuses autres espèces d'*Aeschynomene* (Arora, 1954 ; Eaglesham, 1983 ; Alazard, 1985) et chez une légumineuse herbacée rampante : *Neptunia oleracea* L. (Schaefer, 1940) ; chez cette dernière, les nodules se forment à l'aisselle des racines adventives qui se développent sur les noeuds de la tige lorsque la plante est cultivée sur des sols inondés.

Des nodules ont par ailleurs été découverts tout le long des tiges et des branches de *S. rostrata*, une légumineuse annuelle à croissance rapide que l'on rencontre sur certains sols inondés des régions sahéliennes et particulièrement au nord du Sénégal (Dreyfus et Dommergues, 1980, 1981). Comme chez la plupart des *Aeschynomene* ces nodules caulinaires sont induits à partir de sites d'infection prédéterminés situés tout le long des tiges et des branches (Tsien *et al.*, 1983 ; Alazard et Duhoux, 1987, Duhoux et Dreyfus, 1982).

Des nodules ont également été trouvés sur les racines adventives des tiges de certaines de légumineuses : c'est le cas de *Vicia faba* L. (Fyson et Sprent, 1980), d'*Arachis hypogea* L. (Niambar *et al.*, 1982), de *Pentachletra maculosa* (Walter et Bien, 1989) , de *Cassia* et de *Parkinsonia* (Yatazawa *et al.*, 1987). Enfin, la découverte la plus récente est celle de nodules aériens sur les troncs de deux espèces de *Casuarina* : *C. cunninghamiana* Forst. et *C. glauca* (Prin *et al.*, 1991). Ces nodules aériens se forment selon les auteurs, sur les racines induites sous l'écorce par les eaux de ruissellement des pluies le long du tronc.

Récemment des mamelons caulinaires ont été observés chez *S. pubescens* DC., une espèce qui pousse spontanément sur les sols inondés et dont l'aire de répartition est voisine de celle de *S. rostrata*. Cependant, ces mamelons caulinaires sont moins nombreux et moins proéminents. Ils ne s'infectent pratiquement que dans les conditions d'immersion, alors que les sites de nodulation de *S. rostrata* sont infectés par les *Rhizobium* aussi bien en conditions d'immersion qu'en conditions sèches.

Contrairement à *N. oleracea* qui ne forme des nodules uniquement que sur les noeuds caulinaires, *S. pubescens* est capable de former de nombreux nodules à la base des racines adventives induites à partir de ses mamelons caulinaires tout le long de la tige.

L'objet de ce travail est d'étudier d'une part la nodulation racinaire et la fixation d'azote, d'autre part la structure des mamelons caulinaires et la nodulation de tige chez *S. pubescens*.

Nous présenterons dans un premier chapitre une étude de la nodulation racinaire chez *S. pubescens* ainsi qu'une évaluation comparée de la fixation d'azote avec *S. rostrata* et deux mutants de *S. rostrata*.

Le deuxième chapitre sera consacré au phénomène de la nodulation de tiges et particulièrement à l'étude de la structure des mamelons caulinaires et au processus d'induction des nodules. Comme dans la première partie, une comparaison entre les deux types de nodulations caulinaires sera présentée.

CHAPITRE I

**ETUDE DE LA NODULATION RACINAIRE ET COMPARAISON DE
LA FIXATION D'AZOTE CHEZ *S. ROSTRATA* (SAUVAGE,
DEUX DE SES MUTANTS) & CHEZ *S. PUBESCENS*.**

I. INTRODUCTION

Deux genres de microsymbiotes, *Azorhizobium* et *Rhizobium* sont capables d'induire la formation de nodules sur les espèces du genre *Sesbania*.

Les *Azorhizobium* dont la souche type est ORS 571 forment des nodules effectifs (fixateurs d'azote) sur les racines et les tiges de *S. rostrata* ; généralement, elles n'induisent que des nodules ineffectifs chez les autres espèces de *Sesbania*.

Les souches de *Rhizobium* qui forment des nodules racinaires sur les *Sesbania* ne sont pas encore classées en espèces. Elles sont infectives (induisent des nodules) sur toutes les espèces de *Sesbania* et quelques unes peuvent former des nodules sur d'autres espèces de légumineuses tropicales. Elles sont généralement effectives à des degrés divers sur les espèces de *Sesbania* testées.

L'objet de ce premier chapitre est d'une part d'étudier l'infectivité et l'effectivité des souches d'*Azorhizobium* et de *Rhizobium* sur *S. pubescens* d'autre part de faire une comparaison de la nodulation et de la fixation de l'azote chez *S. rostrata*, *S. pubescens* (types sauvages) et deux mutants de *S. rostrata*.

II. MATERIEL & METHODES

2.1. Matériel Végétal

S. rostrata et *S. pubescens* sont des légumineuses annuelles qui poussent spontanément dans les bas-fonds, les bords des rivières et les mares temporaires ou permanentes des régions sahéliennes (Berhaut, 1976). On les trouve également dans les zones humides des régions inter-tropicales et tropicales d'Afrique (Greenway, 1961 ; Irvine, 1961 cités par Evans, 1988).

Les graines utilisées dans cette étude proviennent des régions de la Casamance et du Cap-Vert au Sénégal et des sols inondés en bordure du Fleuve Gambie.

2.1.1. Germination des graines et mise en culture des plantes

Les graines sont scarifiées dans de l'acide sulfurique concentré pour stériliser et ramolir les téguments. (pendant 45 minutes pour *S. rostrata* et 60 minutes pour *S. pubescens*). Après plusieurs rinçages à l'eau stérile, les graines sont plongées pendant 30 secondes à 1 minute dans une solution de chlorure mercurique à 0,1%. Elles sont ensuite abondamment rincées, imbibées pendant 6 à 7 heures dans de l'eau distillée stérilisée, puis déposées dans une boîte de Pétri contenant de l'eau gélosée à 0,5 %. Les boîtes sont ensuite incubées 24 à 48 heures à l'obscurité à la température de 30°C et sous atmosphère humide. A l'issue de cette incubation les graines donnent des germinations de 2 à 3 cm de long.

Les plantes ainsi obtenues peuvent être repiquées en serre ou en tubes de culture dans un milieu gélosé pour la croissance.

2.1.2. Culture en pots ou en vases de végétation

Dans la serre, les plantes sont repiquées stérilement dans des pots contenant 2,5 kg de sol de Bel-Air dont la composition est donnée au tableau I. Ce sol est préalablement stérilisé à 120°C pendant 1 heure et suffisamment humidifié ; les plantes placées dans ces pots sont aussitôt inoculées par dépôt de 5 ml d'une culture saturée (10^9 bact./ml) du microsymbiote bactérien.

Elles sont arrosées deux fois par jour avec de l'eau stérile pour maintenir l'humidité et assurer leur croissance.

2.1.3. Culture hydroponique (ou culture en tubes)

Les plantes de 2 à 3 cm sont repiquées soigneusement sous la hotte à flux laminaire, en tubes contenant du milieu nutritif gélosé incliné (milieu Jensen (Vincent, 1970) selon la technique de Gibson (1963) dont la composition est la suivante :

| | |
|--|----------|
| K ₂ HPO ₄ , | 0,2 g |
| MgSO ₄ (7H ₂ O), | 0,2 g |
| NaCl, | 0,2 g |
| CaPO ₄ , | 1,0 g |
| FeCl ₃ (6H ₂ O), | 0,14 g |
| H ₃ Bo ₃ , | 2,86 mg |
| MnSO ₄ (4H ₂ O), | 2,03 mg |
| ZnSO ₄ (7H ₂ O), | 0,22 mg |
| CuSO ₄ (5H ₂ O), | 0,08 mg |
| Na ₂ MoO ₄ (H ₂ O), | 0,09 mg. |

le pH est ajusté à 6,7 avant l'addition de la gélose et la stérilisation à 110° C pendant 30 mn.

Chaque tube est muni d'un capuchon de feuille d'aluminium. La racine est introduite dans le tube par un trou pratiqué dans le capuchon de telle sorte qu'elle plonge dans le milieu nutritif, le reste du tube est rempli d'eau distillée à hauteur suffisante pour éviter la dessiccation de la plante, l'ensemble est maintenu dans une atmosphère sursaturée.

L'inoculation est effectuée 2 à 3 jours après le repiquage période qui correspond à l'apparition des premières racines secondaires. En chambre de culture, les plantes sont installées, sous un éclairage continu (2500 lux) et à 25°C.

2.2. MATERIEL BACTERIEN

Le tableau II indique la liste des souches utilisées dans cette étude. Ce sont toutes des souches de la collection du Laboratoire de Microbiologie de l'ORSTOM ou isolées dans le cadre de cette étude.

2.2.1. Les milieux de culture pour les bactéries

2.2.1.1. Le milieu pour *Azorhizobium*

Le milieu complet appelé YL est utilisé pour la croissance et la fixation d'azote des souches d'*Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1983).

Il contient en g/litre d'eau :

| | |
|---|----------|
| D, L-sodium lactate: | 10,00 g |
| K ₂ HPO ₄ : | 1,67 g |
| KH ₂ PO ₄ : | 0,87 g |
| MgSO ₄ (7H ₂ O): | 0,10 g |
| NaCl: | 0,05 g |
| CaCl ₂ (2H ₂ O): | 40,00 mg |
| FeCl ₃ (6H ₂ O): | 10,00 mg |
| Na ₂ MoO ₄ (2H ₂ O): | 5,00 mg |
| MnSO ₄ (H ₂ O): | 2,50 mg |
| ZnSO ₄ (7H ₂ O): | 0,70 mg |
| CoSO ₄ (7H ₂ O): | 0,14 mg |
| CuSO ₄ (5H ₂ O): | 0,12 mg |
| H ₃ BO ₃ : | 0,03 mg |
| extrait de levure (Difco): | 1,00 g |
| (NH) ₂ SO ₄ : | 1,00 g |

Le pH est ajusté à 6,8 avant l'addition de la gélose et la stérilisation à 120° C pendant 20 minutes. Le milieu YLA correspond donc au milieu YL additionné de 15 g d'agar/litre.

2.2.1.2. Le milieu pour *Rhizobium*

La composition du milieu YM (Vincent, 1970) utilisé pour l'isolement et la culture des *Rhizobium* est la suivante (pour 1 litre d'eau) :

| | |
|---|---------|
| Mannitol, | 10,0 g |
| K ₂ HPO ₄ , | 0,5 g |
| MgSO ₄ (7H ₂ O), | 0,1 g |
| CaCl ₂ (2H ₂ O), | 40,0 mg |
| FeCl ₃ (6H ₂ O), | 4,0 mg |
| extrait de levure(Difco) | 1,0 g |

Le pH est ajusté à 6,8 avant la stérilisation à 120°C pendant 20 minutes. Le milieu YMA est le milieu YM additonné de 15 g d'agar.

2.2.2. Isolement et culture des souches bactériennes

2.2.2.1. Isolement des souches de *Rhizobium* à partir des nodules

Cet isolement s'effectue à partir de nodules de racines qui sont prélevés, lavés et désinfectés à l'éthanol(95%) pendant 5 mn, puis avec du chlorure mercurique (HgCl₂ à 0,1%) pendant 30 secondes.

| Souches | Origine d'isolement | Origines géographiques | Références |
|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|-----------------|
| Azorhizobium caulinodans ORS571 | S.rostrata nod.tige | Région du Fleuve (Nord Sénégal) | B.DREYFUS |
| Rhizobium sp ORS 52 | S.rostrata nod. racines | Sénégal | - |
| ORS 53 | - | - | - |
| ORS 611 | S.grandiflora rose | Philippines | I NDOYE |
| ORS 616 | S.grandiflora blanche | Inde | - |
| ORS P1 | ? | ? | B.DREYFUS et al |
| ORS P2 | S.pubescens nod.tige | Sénégal | - |
| ORS S1 | S.rostrata nod. tige | Région du Fleuve | - |
| ORS Pb 50 | - | (Nord Sénégal) | - |
| ORS P 4 | S.pubescens nod. racines | Sénégal(Cap-Vert) | - |
| ORS P 8 | - | - | - |
| ORS P10 | - | - | - |
| ORS P6 | Rhizosphère(sol) | - | - |
| ORS P12 | - | - | - |
| ORS P14 | - | - | - |
| ORS P 3 | S.pubescens nod. racines | - | - |
| ORS P9 | - | - | - |
| ORS P 13 | - | - | - |
| ORS P7 | Rhizosphère(sol) | - | - |
| ORS P 11 | - | - | - |
| ORS P 15 | - | - | - |
| ORS P16 | S.pubescens nod. tige | Gambie (Fleuve Gambie) | - |
| ORS P17 | - | - | - |

Tableau n° 2 : Liste des souches utilisées

Après plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile pendant 10 mn, ils sont coupés et une suspension du tissu central est étalée en stries sur du milieu YMA en boîte de Pétri. Les boîtes sont ensuite incubées à l'étuve à la température de 37°C pendant 24 à 48 heures. Chaque colonie est repiquée plusieurs fois sur de nouvelles boîtes jusqu'à l'obtention de souches pures.

2.2.2.2. Isolement à partir du sol

2.2.2.2.1. Isolement direct

Dans le cas des échantillons de sol de la rhizosphère des plantes de *Sesbania*, 1 g de chacun de ces sols est ajouté à 150 ml d'eau distillée stérile.

Après homogénéisation par agitation régulière, on laisse décanter le mélange. Quelques gouttes du surnageant sont ensuite déposées sur le milieu solide YM ou YL. Les opérations de purification et de contrôle sont les mêmes que décrites précédemment.

2.2.2.2.2. Isolement indirect par piégeage

Dans certains cas les échantillons de sol prélevés comme indiqué précédemment dans des sachets ou des pots stériles, servent de support de culture à la plante hôte. Cette culture s'effectue dans les conditions de la serre (ou en plein air) et 3 semaines à un mois après (pour *S. rostrata* et *S. pubescens*), chacun des nodules sur les racines de ces plantes est ouvert et les bactéries sont isolées et purifiées suivant la technique décrite précédemment.

Après purification toutes les souches isolées sont testées à nouveau pour leur aptitude à la nodulation et à la fixation de l'azote sur des plantes en chambre de culture.

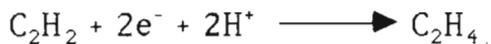
La liste de toutes les souches isolées est identique à celle donnée au tableau **II**.

2.2.3. Evaluation de la fixation de l'azote : mesure de l'activité de la nitrogénase par la méthode de l'Activité Réductrice d'Acétylène (ARA)

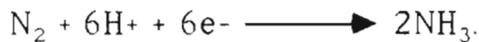
La mesure de l'Activité Réductrice d'Acétylène est une mesure indirecte de l'activité réductrice de la nitrogénase, complexe enzymatique responsable de la fixation de l'azote (Dilworth, 1966).

-Principe de la méthode

Le principe repose sur l'exploitation d'une des nombreuses réactions réductrices potentielles de la nitrogénase et qui réside dans la formation d'éthylène à partir d'acétylène (Hardy *et al.*, 1968).



d'autre part la nitrogénase réduit la triple liaison de la molécule d'azote en ammoniacque avec utilisation de 6 électrons .



La réduction de 3 moles d'azote (N_2) correspond à celle d'une mole de C_2H_2 ; d'où le coefficient de conversion théorique de 3: 1 (en d'autres termes, une mole d'éthylène formé est équivalente à 1/3 mole d'azote réduit).



Les protons entrent généralement en compétition avec l'acétylène, mais comme la quantité de C_2H_2 utilisée est habituellement faible, l'hydrogène produit peut être alors considérée comme négligeable (Hanus *et al.*, 1961 cité par Ndoye, 1990).

La mesure de l'ARA ne peut cependant constituer qu'une approche semi-quantitative de l'azote fixé. C'est une méthode indirecte et instantanée de mesure. En effet le coefficient de conversion théorique varie considérablement en fonction des conditions environnementales (variations journalières par exemple) et en fonction des facteurs intrinsèques. Actuellement il n'existe pas de méthode adéquate pour calibrer l'éthylène formé avec l'azote fixé, mais il semble que le rapport de conversion soit approximativement de 4:1 pour les légumineuses (Larue et Patterson, 1981, cités par Ndoye, 1990)

- Les conditions expérimentales

La mesure de l'ARA est effectuée par la chromatographie en phase gazeuse Hardy *et al.*, 1968, sur un Chromatographe Varian Aerograph série 1400 équipé d'une colonne de 120 cm remplie de sphérosil. Les températures sont respectivement: injecteur 120°C ; colonne 75°C ; détecteur à ionisation de flamme 150°C. Le débit du gaz vecteur (N_2) est de 40 ml/mn.

Cette technique autorise la détection facile du substrat et de son produit, l'éthylène. De plus, elle présente une très grande sensibilité.

-La technique du dosage

Elle consiste à transférer les racines ou les tiges des plantes portant les nodules dans des flacons de 250 ml ou de 500 ml ou dans des fioles de 15 ml fermés hermétiquement. L'acétylène est injecté à la concentration de 10%. Les flacons sont incubés à la température de 30°C.

L'Activité Réductrice d'Acétylène est linéaire pendant 1 heure ; des échantillons gazeux de 0,5 ml sont prélevés après 30 mn et 60 mn et injectés dans le chromatographe. La quantité d'éthylène présente dans l'échantillon est mesurée par la suite.

-Le calcul de la quantité de C_2H_4 produite

La quantité d'éthylène formée dans ces conditions, pendant un temps donné correspond au flot d'électrons transférés par la nitrogénase. La conversion des hauteurs de pic d'éthylène en nanomoles de C_2H_4 se fait par référence à un étalon standard. Une dilution étalon d'éthylène est préparée par l'introduction de 0,57 ml d'éthylène dans un flacon hermétiquement fermé de 570 ml (dilution 1/1000). La concentration de cette dilution étalon est donc de

$$\frac{10^6 \text{ nmoles}}{22.400} C_2H_4 / \text{ml}$$

L'injection au Chromatographe de 0,5ml de cette dilution donne un pic de hauteur: $h \times A$

(avec A = facteur d'atténuation ; h = hauteur du pic mesuré en cm).

Ainsi nous avons :

$$\frac{10^6 \times 0,5}{22.400} \times 1/h.A \times h_1.A_1 \times V/v$$

avec :

h_1 = hauteur du pic C_2H_4 en cm

h = hauteur du pic standard en cm

A_1 = atténuation due à l'échantillon

A = atténuation due au témoin standard

V = volume du flacon d'incubation en ml

v = volume injecté dans le chromatographe = 0,5 ml.

2.3. Comparaison de la nodulation et de la fixation de l'azote chez *S. rostrata*, *S. pubescens* et deux mutants de *S. rostrata*.

2.3.1. Protocole expérimental de l'étude comparative

Les objectifs de cette expérience sont :

- une étude comparative de la nodulation et de la fixation de l'azote
- et une étude de l'influence des diverses conditions physiques sur la capacité de la fixation de l'azote par les types de plantes.

Cette étude a été effectuée en serre sur quatre types de plantes de *Sesbania* cultivées dans les conditions contrôlées selon le protocole suivant:

Les quatre types de plantes suivantes ont été étudiées :

- *S. rostrata* (type sauvage)
- *S. pubescens* (type sauvage)
- *S. rostrata* "IP" (mutant insensible à la photopériode)
- *S. rostrata* "SST" (mutant sans sites sur la tige).

Ces mutants ont été obtenus par mutagenèse à l'éthyl méthyl sulfonate (EMS) au Laboratoire de Microbiologie de l'ORSTOM.

Le mutant "IP" se caractérise par une floraison très précoce tandis que le mutant "SST" se caractérise par l'absence de sites de nodulation ou primordia racinaires sur la tige tels qu'ils se présentent chez le type sauvage. Le dernier mutant "SST" présente en plus une racine pivotante plus développée et moins de racines secondaires que chez le type sauvage.

Ces plantes ont subi les traitements suivants :

i)- Inoculation des plantes

Pour l'inoculation des racines, une série de 6 plantes de chaque type sont inoculées soigneusement au moment du semis par dépôt de 5ml d'une culture saturée 10^9 bact./ml de la souche d'*Azorhizobium* ORS 571 pour *S. rostrata* et la souche de *Rhizobium* ORS P₁ pour *S. pubescens*.

L'inoculation des tiges est effectuée au bout de la sixième semaine et répétée à la huitième semaine après le repiquage. Elle concerne le type sauvage de *S. rostrata* et le mutant "IP" et consiste à vaporiser le long de la tige, une solution de la culture bactérienne liquide (dilution 1/5 environ). Outre la pulvérisation on a procédé dans une seconde phase à l'inoculation par le badigeonnage. L'inoculum liquide est prélevé à l'aide de coton hydrophile ou cardé mais stérile, et appliqué sur toute la tige.

ii)- Culture en conditions de submersion du sol

Elle est appliquée trois semaines après le repiquage. Pour chaque type, six plantes vont se développer sur sol submergé et six autres sur sol drainé.

iii)- Culture en lumière continue

Enfin, à partir de cette même date (3^e semaine) toutes les plantes sont soumises à un éclairage continu grâce à un dispositif prévu à cet effet jusqu'à la fin de l'expérience afin d'assurer une bonne croissance des plantes, car *S. rostrata* notamment est reconnue comme étant très sensible à la photopériode (Ndoye, 1988).

Les détails du protocole expérimental sont présentés ci-après :

PLANTES

- sauvage
- S. rostrata* - mutant insensible à la photopériode "IP"
- mutant sans sites de nodulation sur la tige "SST"

- S. pubescens* - sauvage

INOCULATION

- Souches - *Azorhizobium* (ORS 571) pour *S. rostrata*
- *Rhizobium* (ORS P1) pour *S. pubescens*

- Traitements
 - o témoins non inoculés
 - + traitement 1 inoculation des racines (au semis)
 - ++ traitement 2 inoculation des racines + les tiges (6^e et 8^e semaines après les semis pour *S. rostrata* sauvage et le type "IP").

REGIME HYDRIQUE

- inondation du sol (ou submersion du sol)
- non inondation du sol (ou drainage)
- S. rostrata* sauvage 6 pots inoculés Inondés (18 pots)
- 6 pots non inoculés Non inondés (18 pots)
- 6 pots inoculés (racines + tiges)
- (6 répétitions) = 36 pots

S. rostrata "IP" Idem
(6 répétitions) = 36 pots

S. rostrata "SST" 6 pots inoculés racines Inondés (12 pots)
(4 répétitions) = 24 pots 6 pots non inoculés Non inondés (12 pots)

S. pubescens Idem
(4 répétitions) = 24 pots

TOTAL = 120 POTS

2.3.2. Evaluation de la fixation d'azote

Dix semaines après le repiquage, les paramètres suivants ont été mesurés pour chacun des quatre types de plantes et pour les différents traitements

- le nombre et le poids sec moyens des nodules de racines et de tiges par plante (pour le type sauvage et le type "IP" de *S. rostrata*)
- les poids secs moyens des parties aériennes ou biomasse aérienne par plante
- les hauteurs moyennes des plantes.

Une analyse statistique de comparaison des résultats a été effectuée selon le Test statistique de Newman et Keuls (P = 5%) (Snedecor et Cochran, 1957).

III. RESULTATS

Dans cette rubrique seront présentés successivement les résultats des mesures de la capacité des souches à noduler (infectivité), leur capacité à fixer l'azote (effectivité) et ceux de l'étude comparée de la fixation d'azote chez *S. rostrata* et *S. pubescens*.

3.1. Infectivité des souches sur les racines

L'infectivité est l'aptitude d'une souche à noduler une espèce végétale donnée. Pour quantifier l'infectivité des souches, nous avons dénombré les nodules formés.

Rappelons que le tableau **II** cité ci-après donne la liste des souches dont l'aptitude à la nodulation des racines de *S. pubescens* et de *S. rostrata* a été testée.

3.1.1. Nombre de nodules racinaires

Les résultats du dénombrement des nodules sont présentés dans le tableau **III** ci-dessous.

Tableau n° III : Nombre moyen de nodules racinaires par plante de *S. pubescens*.

| SOUCHES | NOMBRE MOYEN DE NODULES./PLANTE |
|----------|---------------------------------|
| ORS 611 | 4,08 |
| ORS 616 | 3,66 |
| ORS 53 | 6,08 |
| ORS P1 | 6,66 |
| ORS P2 | 2,5 |
| ORS Pb50 | 1,00 |
| ORS S1 | 1,5 |
| ORS P4 | 4,5 |
| ORS P6 | 4,5 |
| ORS P3 | 1,6 |
| ORS P3 | 1,6 |
| ORS 571 | 5,7 |
| TÉMOIN | 0 |

Les résultats du tableau **III** indiquent une grande variabilité du nombre de nodules: certaines souches telles que ORS 571, ORS 616, ORS P₁ donnent un nombre moyen de nodules par plante compris entre 4 et 7 alors que ce chiffre varie de 1 à 2 pour de nombreuses autres souches.

Quant au tableau **IV** ci-dessous, il donne l'infectivité des souches testées (leur aptitude à la nodulation chez *S. rostrata* et chez *S. pubescens*).

Tableau n° IV : Infectivité des souches testées chez *S. pubescens* et chez *S. rostrata*.

| PLANTES HOTES | | |
|---------------|--------------------|---------------------|
| SOUCHES | <i>S. rostrata</i> | <i>S. pubescens</i> |
| ORS 571 | + | + |
| " 52 | + | + |
| " 53 | + | + |
| " 611 | + | + |
| " 616 | + | + |
| " P1 | + | + |
| " P2 | + | + |
| " P3 | - | + |
| " P4 | - | + |
| " P5 | + | + |
| " P6 | - | + |
| " S1 | + | + |
| " Pb50 | + | + |

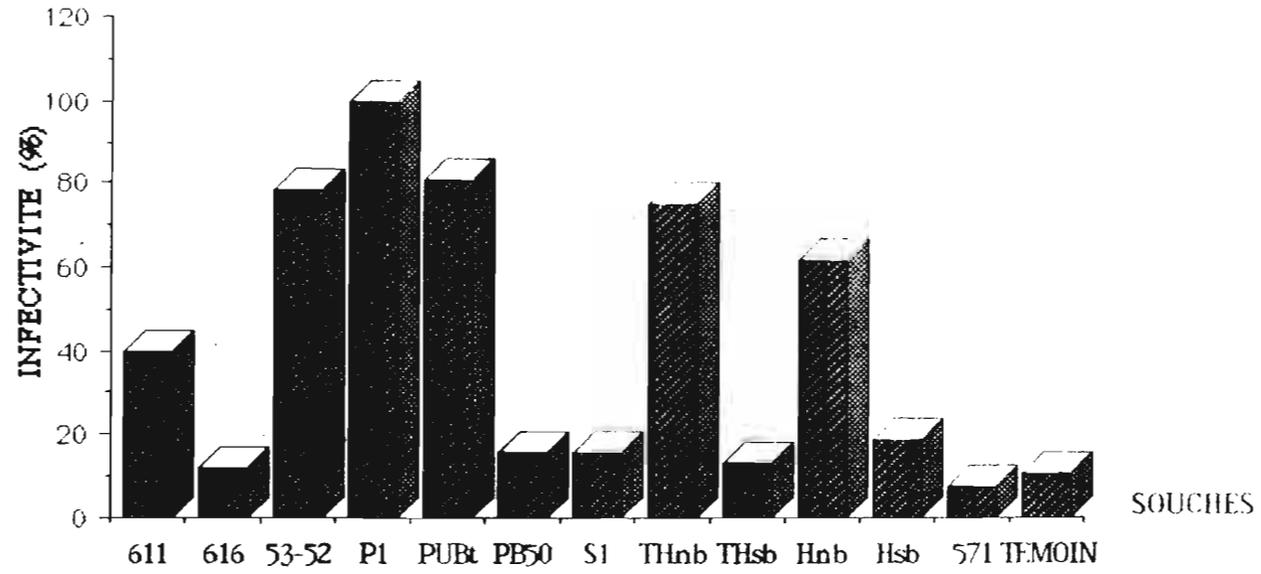
+ souches infectives

- souches non infectives.

Deux catégories de bactéries peuvent être distinguées d'une manière globale :

- les bactéries qui forment des nodules de racines à la fois chez *S. pubescens* et chez *S. rostrata*

- et celles qui ne forment des nodules que sur les racines chez *S. pubescens*.



Graphique 1: Expression de l'infectivité des souches testées chez *S. pubescens*

3.1.2. Infectivité relative des souches

L'infectivité relative d'une souche est déterminée par rapport à la souche la plus infective c'est-à-dire celle qui induit des nodules sur le nombre maximum de plantes. C'est donc le rapport du nombre de plantes nodulées par cette souche sur le nombre de plantes nodulées par la souche la plus infective.

La détermination de ce paramètre a permis de distinguer six catégories de souches chez *S. pubescens* (graphique 1).

- les souches très infectives
- les souches infectives
- les souches moyennement infectives
- les souches peu infectives
- les souches très peu infectives
- les souches non infectives

3.2. Effectivité des souches (fixation symbiotique de l'azote)

L'effectivité des souches (capacité à fixer l'azote atmosphérique en état de symbiose) a été évaluée par la méthode de l'Activité Réductrice d'Acétylène.

Le tableau **V** donne les résultats de la mesure de l'activité de la nitrogénase (en micromoles $C_2H_4/h/g$ de nodules secs ou ARA spécifique) ; cette mesure de l'activité réductrice de la nitrogénase permet d'apprécier l'effectivité de chaque souche chez les deux espèces d'expérience.

Tableau n° V : ARA spécifique chez *S. pubescens* (exprimée en nanomoles C₂H₄/h/g de poids de nodules secs).

| SOUCHES | NODULES PDS SEC MOY. (en mg) | ARA spécifique (en nanomoles C ₂ H ₄ /h/g de poids de nod. secs) |
|----------|------------------------------------|--|
| ORS 611 | 11,33 | 2,06 |
| ORS 616 | 3,66 | 0,17 |
| ORS 53 | 16,02 | 5 |
| ORS P1 | 2,86 | 2,23 |
| ORS P2 | 1,32 | 3,23 |
| ORS Pb50 | 2,01 | 0,13 |
| ORS S1 | 2,00 | 0,08 |
| ORS P4 | 16,23 | 6,34 |
| ORS P6 | 2,43 | 0,07 |
| ORS P3 | 1,25 | 0,32 |
| ORS P5 | 3,02 | 0,1 |
| ORS 571 | 0,0001 | 0 |
| TEMOIN | - | 0 |

Trois catégories de souches peuvent être distinguées:

- les souches ORS P1, ORS P2, ORS P3 très effectives
- les souches ORS P5 et ORS Pb50 moyennement effectives
- les autres souches qui sont peu effectives.

La détermination de l'ARA spécifique permet d'exprimer l'effectivité des souches (tableau **VI**) ; celle-ci a aussi été exprimée en pourcentage du poids sec des parties aériennes par rapport à la souche la plus effective(100%). Pour une souche effective (E), ce rapport est de 75 à 100% ; pour une souche inefficace(I) il correspond au même pourcentage que le témoin non inoculé c'est à dire de 0 à 30% du poids sec de la plante inoculée par la souche effective ; une souche peu effective (e) présente alors à un pourcentage intermédiaire.

Tableau n° VI : Nodulation et effectivité des souches testées sur les racines de *S. pubescens* et de *S. rostrata*.

| Souches | ORS | | | | | | ORS P | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|-----|------------------|----------------|----|----|-----|-------|---|---|---|---|---|----|----|----|---|---|---|---|----|----|----|
| | 571 | P _{b50} | S ₁ | 52 | 53 | 611 | 616 | 1 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 3 | 5 | 7 | 9 | 11 | 13 | 15 |
| Plante-hôte | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>S. rostrata</i> | E | e | e | E | E | E | I | E | E | 0 | E | 0 | 0 | 0 | 0 | e | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>S. pubescens</i> | I | I | I | E | E | E | E | E | E | E | I | e | E | E | I | I | I | I | I | I | I | I |

E nodulation effective
 I nodulation inefficace
 e nodulation peu effective
 0 absence de nodulation

Le graphique 2 illustre parfaitement cette variabilité de l'effectivité relative des souches.

3.3. DISCUSSION

La plupart des souches de *Rhizobium* ne sont pas effectives chez *S. rostrata*. La souche d'*Azorhizobium*, ORS 571, même si elle apparaît très infective chez *S. pubescens* n'est pas effective chez cette dernière espèce. Il faut remarquer que toutes les plantes inoculées avec les souches (ORS 571, ORS S₁, ORS Pb50) présentent les mêmes caractéristiques : celles de la souche ORS 571. Ces plantes présentent le même aspect que les plantes témoins non inoculées. Les souches effectives chez *S. pubescens* se caractérisent par la formation de nodules en grappes, polylobés relativement peu nombreux comme l'indique la FIG. 1.

Les souches très infectives ne se révèlent pas être toujours les plus effectives ; c'est le cas particulier de la souche d'*Azorhizobium* chez *S. pubescens*. D'une manière globale trois catégories de souches se dégagent de cette étude de l'effectivité relative des souches chez *S. pubescens* et chez *S. rostrata*

- des souches effectives (E),
- des souches moyennement effectives (e),
- enfin des inefficaces (I),

Contrairement à *S. rostrata* chez laquelle seule une symbiote très spécifique (ORS 571) forme de nombreux nodules très effectifs, chez *S. pubescens*, plusieurs souches de *Rhizobium* présentent des performances semblables et aucune d'elle ne peut être considérée seule comme très spécifique de *S. pubescens*.

Graphique 2 : Expression de l'efficacité des souches testées chez *S. pubescens*.

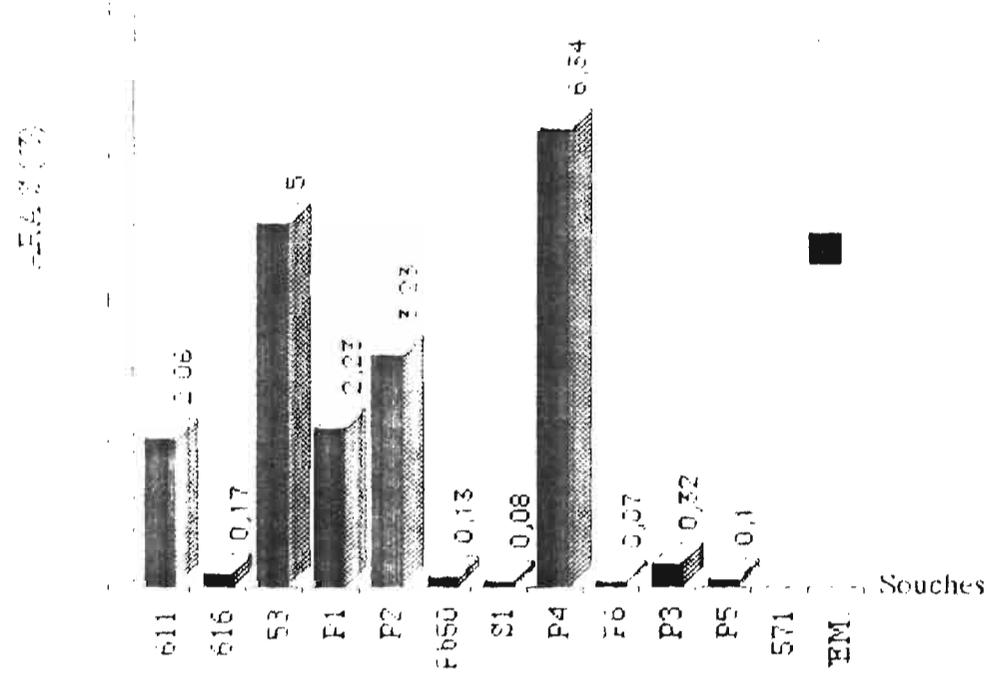


PLANCHE I

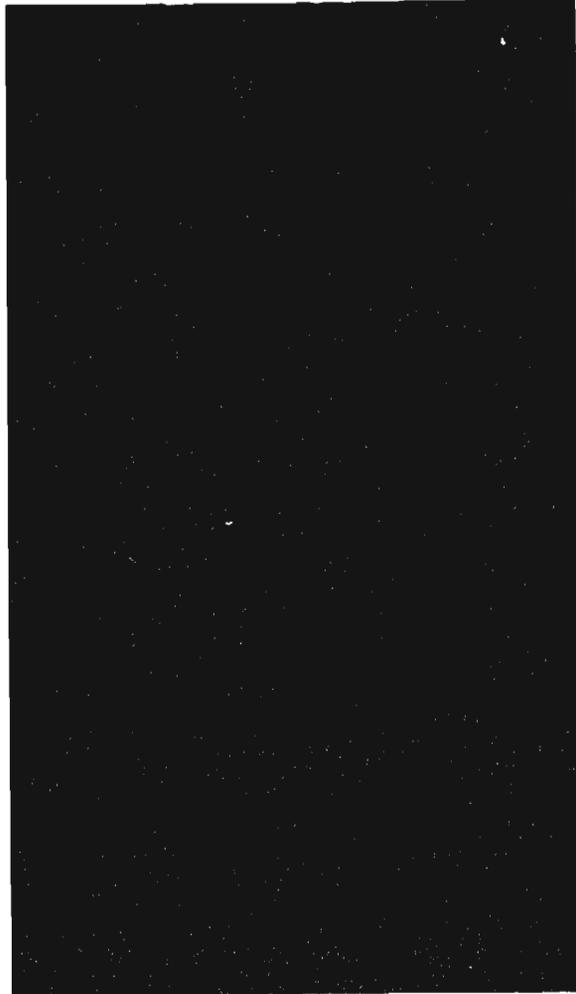


FIG. 1 : Vue generale : morphologie des nodules de racines sur une plante de *S. pubescens* de 35 jours cultivee en condition hydroponique :

- > nodules de racines en grappes, polylobes au niveau du collet.
- > nodules de racines en grappes polylobes localises au niveau des racines secondaires (grandeur nature).

On remarque que les souches les plus précoces à la nodulation des racines sont très souvent aussi les plus effectives.

Comme l'a montré N'Doye (1990), la plupart des souches de *Rhizobium* isolées à partir d'une espèce de *Sesbania* sont très infectives et effectives sur les autres espèces de *Sesbania* alors que la souche d'*Azorhizobium* isolée à partir de *S. rostrata* peut former des nodules sur ces espèces mais n'est capable de fixer l'azote que sur son hôte spécifique *S. rostrata*.

3.4. Comparaison de la nodulation et de la fixation d'azote entre *Sesbania rostrata*, *S. pubescens* et deux mutants de *S. rostrata*.

Les bases de cette comparaison seront essentiellement :

- les résultats des mesures des poids secs des parties aériennes (ou biomasse aérienne en g/plante)
- les hauteurs des plantes à l'issue de la période d'expérience ; elles sont traduites par des courbes de croissance

3.4.1. Nombre de nodules racinaires

Le nombre de nodules des racines ou des tiges ne constitue pas en lui seul un paramètre d'appréciation de la capacité de fixation de l'azote chez une plante d'expérience. Il s'agit donc d'une donnée à intégrer à d'autres mesures comme l'ARA global pour calculer l'ARA spécifique.

Le tableau **VII** suivant donne le nombre moyen de nodules racinaires par plante.

Tableau n° VII : Nombre moyen de nodules racinaires (en nodules/plante) des 4 types de plantes sous les deux régimes hydriques.

| TYPE DE PLANTE | REGIME HYDRIQUE | |
|--------------------------------|-----------------|------------|
| | DRAINAGE | SUBMERSION |
| <i>S. rostrata</i> (sauvage) + | 103 a | 183 a |
| <i>S. rostrata</i> ("IP") + | 191 a | 140 a |
| <i>S. rostrata</i> ("SST") + | 67 c | 53,66 c |
| <i>S. pubescens</i> + | 102 a | 90,66 b |

- En conditions de drainage il n'existe pas de différence significative entre les types sauvages de *S. rostrata* et de *S. pubescens*. Le mutant "IP" produit plus de nodules que les types sauvages, alors que le mutant "SST" est nettement moins performant.

- En conditions de submersion du sol, la production de nodules du type sauvage de *S. rostrata* double pratiquement, alors que celle de *S. pubescens* ne varie que très peu. La production moyenne de nodules du mutant "IP" augmente sensiblement. Entre *S. pubescens* et le mutant "SST", le nombre moyen de nodules ne varie que légèrement.

Les résultats du tableau **VIII** donnent les valeurs du nombre de nodules de tige chez *S. rostrata* sauvage et chez son mutant "IP" qui ont subi le traitement 2.

Tableau n° VIII : Nombre de nodules de tige chez *S. rostrata* (type sauvage et mutant "IP").

| | | |
|---------------------------------|---------|----------|
| <i>S. rostrata</i> (sauvage) ++ | 65,16 b | 93,16 a* |
| <i>S. rostrata</i> "IP" ++ | 85,5 a | 96,8 a* |

+ traitement 1 = inoculation des racines

++ traitement 2 = inoculation des racines et des tiges

* (en italique, le nombre de nodules de tige chez *S. rostrata* sauvage et mutant "IP" qui ont subi le traitement 2).

Ici ne sont pas mentionnés les chiffres relatifs aux nombres des nodules de racines des plantes témoins par suite de contaminations survenues au cours de l'expérience par des souches bactériennes autres que celles utilisées au repiquage.

3.4.2. Poids secs des nodules racinaires

Les valeurs de ce paramètre sont consignées dans le tableau **IX**.

Tableau n° IX : Poids secs moyens des nodules racinaires (en g/plante) selon le régime hydrique pour les 4 types de plantes

| TYPE DE PLANTE | REGIME HYDRIQUE | |
|---------------------------------|-----------------|------------|
| | DRAINAGE | SUBMERSION |
| <i>S. rostrata</i> (sauvage) + | 0,56 b | 0,68 b |
| <i>S. rostrata</i> "IP" + | 0,39 b | 0,29 b |
| <i>S. rostrata</i> "SST" + | 0,78 ab | 1,82 a |
| <i>S. pubescens</i> + | 1,00 a | 1,16 a |
| <hr/> | | |
| <i>S. rostrata</i> (sauvage) ++ | 0,69 b | 0,81 a* |
| <i>S. rostrata</i> "IP" ++ | 0,57 b | 1,13 a* |

+ traitement 1 (inoculation des racines)

++ traitement 2 (inoculation des racines et des tiges)

* (en italique) chiffres relatifs aux poids secs de nodules de tige.

Ces valeurs montrent qu'aussi bien en conditions de drainage que dans les conditions de submersion du sol, le poids moyen des nodules de *S. pubescens* est nettement supérieur à celui des nodules du type "sauvage" de *S. rostrata*. Il est presque 2 à 3 fois supérieur à celui du mutant "IP" de *S. rostrata*, mais ne diffère pas significativement de celui du mutant "SST". Il est remarquable que le mutant "SST" forme moins de nodules racinaires, mais présente un poids moyen des nodules qui est plus élevé que celui obtenu chez les autres types de plantes.

A l'exception du mutant "SST" de *S. rostrata* chez lequel la submersion du sol tend à augmenter le poids sec des nodules, aucune différence significative n'a été relevée entre le poids sec moyen des nodules obtenu dans les conditions de drainage par rapport à celui déterminé dans les conditions de submersion du sol chez les autres types de plantes.

3.4.3. Poids secs moyens des parties aériennes (biomasse aérienne)

Les poids secs moyens des parties aériennes ou biomasse aérienne exprimés en g/plante sont donnés dans le tableau X.

Tableau N° X : Poids secs moyens des parties aériennes ou biomasse aérienne (en g/plante).

| TYPE DE PLANTE | REGIME HYDRIQUE | |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|
| | DRAINAGE | SUBMERSION |
| <i>S. rostrata</i> (sauvage) + | 16,03 b | 21,06 a |
| <i>S. rostrata</i> "IP" + | 17,77 b | 20,15 a |
| <i>S. rostrata</i> "SST" + | 27,13 a | 14,2 b |
| <i>S. pubescens</i> + | 17,89 ab | 19,13 a |
| <i>S. rostrata</i> (sauvage) ++ | 20,94 a | 19,02 a |
| <i>S. rostrata</i> "IP" ++ | 20,49 a | 17,85 ab |

Les données de ce tableau montrent que *S. pubescens* ne présente aucune différence significative avec le type "sauvage" de *S. rostrata* aussi bien en conditions de drainage qu'en conditions de submersion des sols. On peut noter une fois de plus que le comportement du mutant "SST" diffère complètement de celui des autres plantes ; en conditions de drainage, il produit la plus forte biomasse (27,13 g/plante avec seulement 14,20 g/plante dans les conditions de submersion du sol), contre 16,03 g/plante chez le type "sauvage" de *S. rostrata*.

Quand les sols sont submergés, sa biomasse est réduite de moitié alors que les autres types de plantes enrégistrent un léger surcroît de biomasse.

3.4.4. Hauteurs des plantes

Les graphiques 3(a et b), 4(a et b), 5(a et b) présentées ci-après et le tableau **XI** donnent les courbes de la croissance et les hauteurs moyennes des plantes à 10 semaines après le repiquage au moment de la récolte.

Tableau n° XI : Hauteurs moyennes des plantes (en cm/plante) mesurées à l'issue de 10 semaines pour les 4 types de plantes dans les régimes hydriques de drainage et de submersion du sol.

| TYPE DE PLANTE | REGIME HYDRIQUE | |
|---------------------------------|-----------------|------------|
| | DRAINAGE | SUBMERSION |
| <i>S. rostrata</i> (sauvage) + | 188,5 a | 193,3 a |
| <i>S. rostrata</i> "IP" + | 176,3 b | 203,5 a |
| <i>S. rostrata</i> "SST" + | 181,6 a | 167,8 b |
| <i>S. pubescens</i> + | 149,6 b | 154,66 b |
| <i>S. rostrata</i> "sauvage" ++ | 187,00 a | 192,5 a* |
| <i>S. rostrata</i> "IP" ++ | 172,8 b | 188 a* |

+ traitement 1 inoculation des racines

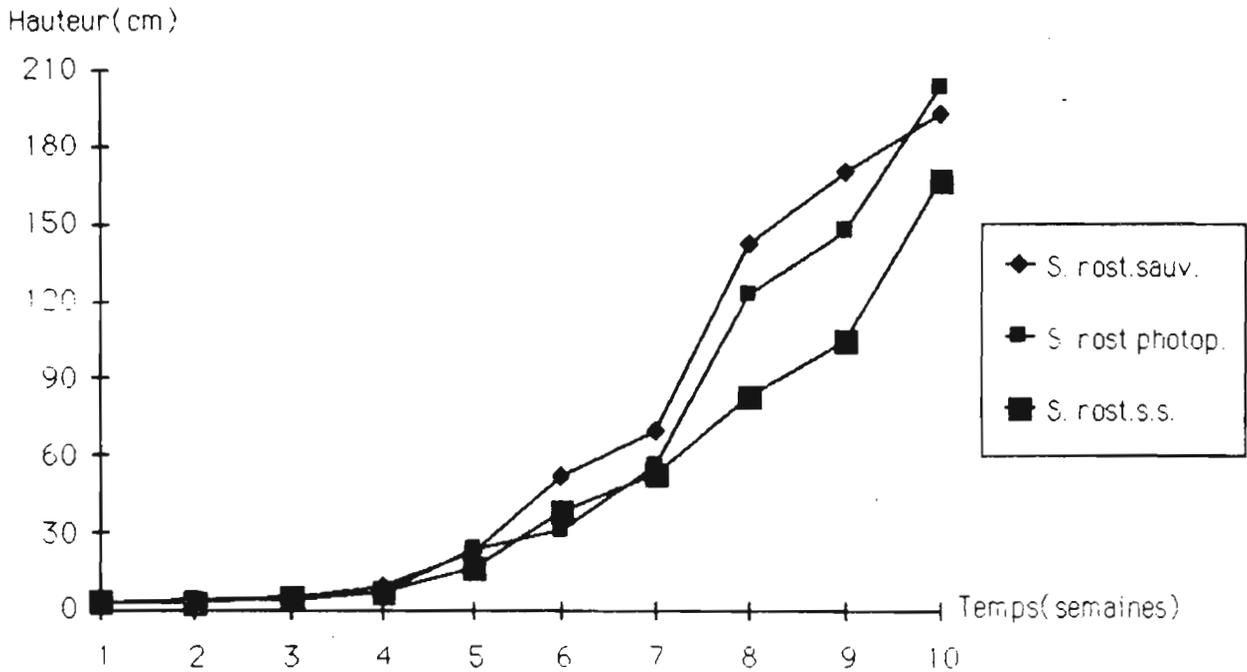
++ traitement 2 inoculation des racines et des tiges

* chiffres relatifs aux hauteurs moyennes des plantes des types (sauvage et "IP" ayant subi le traitement 2)

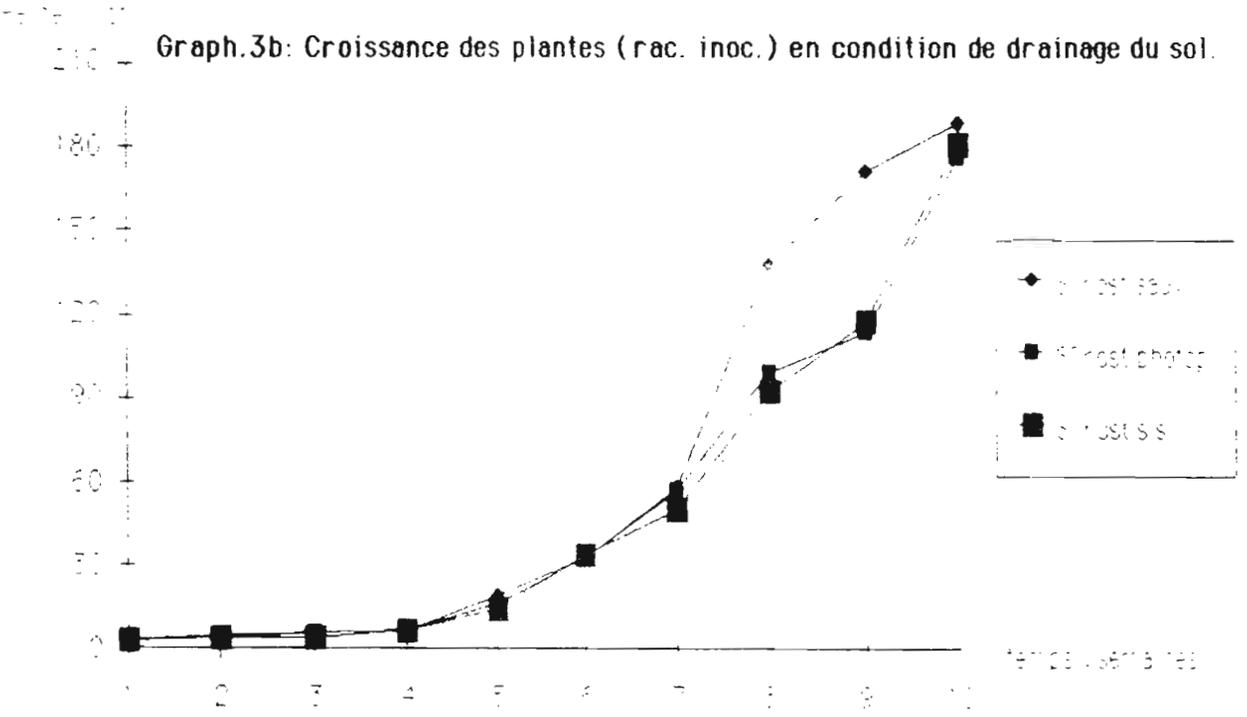
Dans l'ensemble de tous ces tableaux ci-dessus mentionnés, les chiffres d'une même colonne affectés par une même lettre ne diffèrent pas significativement selon le test de Newman et Keuls (P= 5%).

L'analyse statistique de comparaison des hauteurs montre que les plantes de *S. rostrata* type "sauvage" et du type "IP" sont significativement plus hautes que celles de *S. pubescens*. D'une manière globale, aucune différence significative n'existe entre les plantes cultivées sur sol drainé et celles cultivées sur sol submergé.

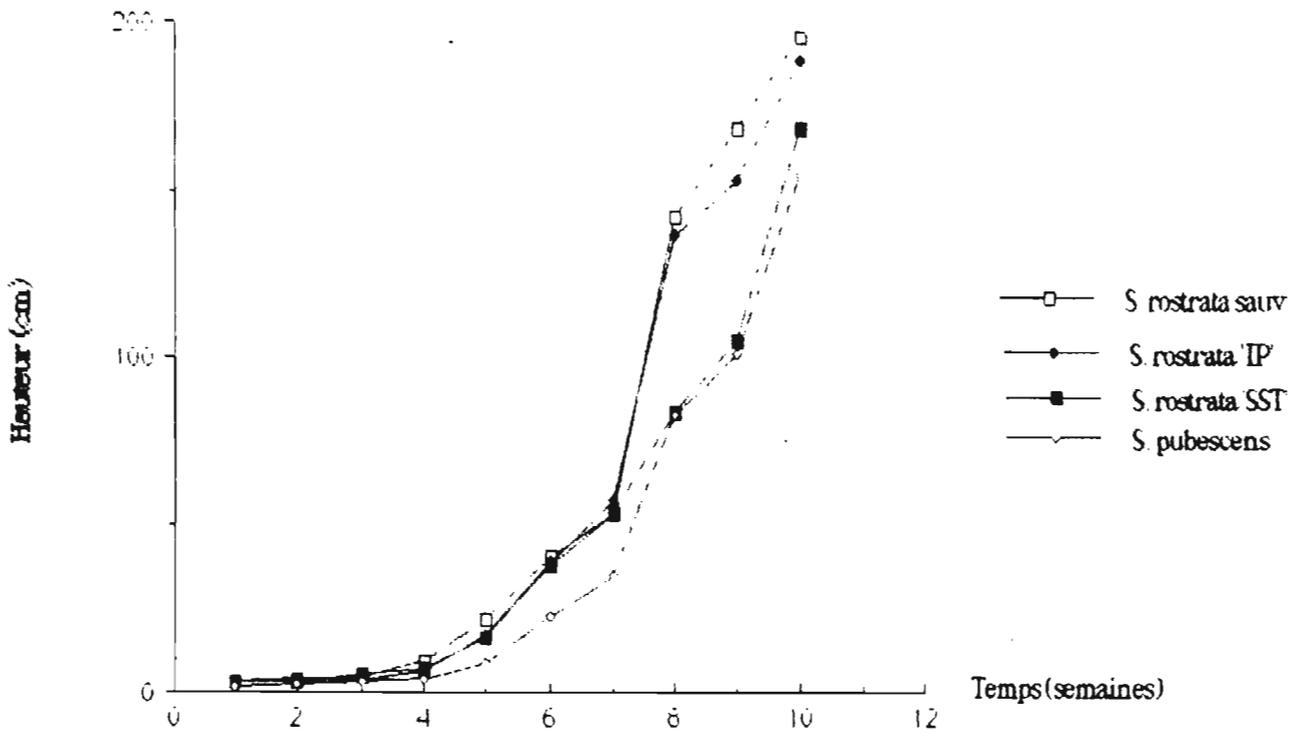
En ce qui concerne le rythme de la croissance, nous notons cependant qu'il existe une différence entre les plantes suivant le régime hydrique : ainsi, en conditions de drainage du sol, le mutant "IP" présente une croissance accélérée à partir de la 8^e semaine (graphique **5b**).



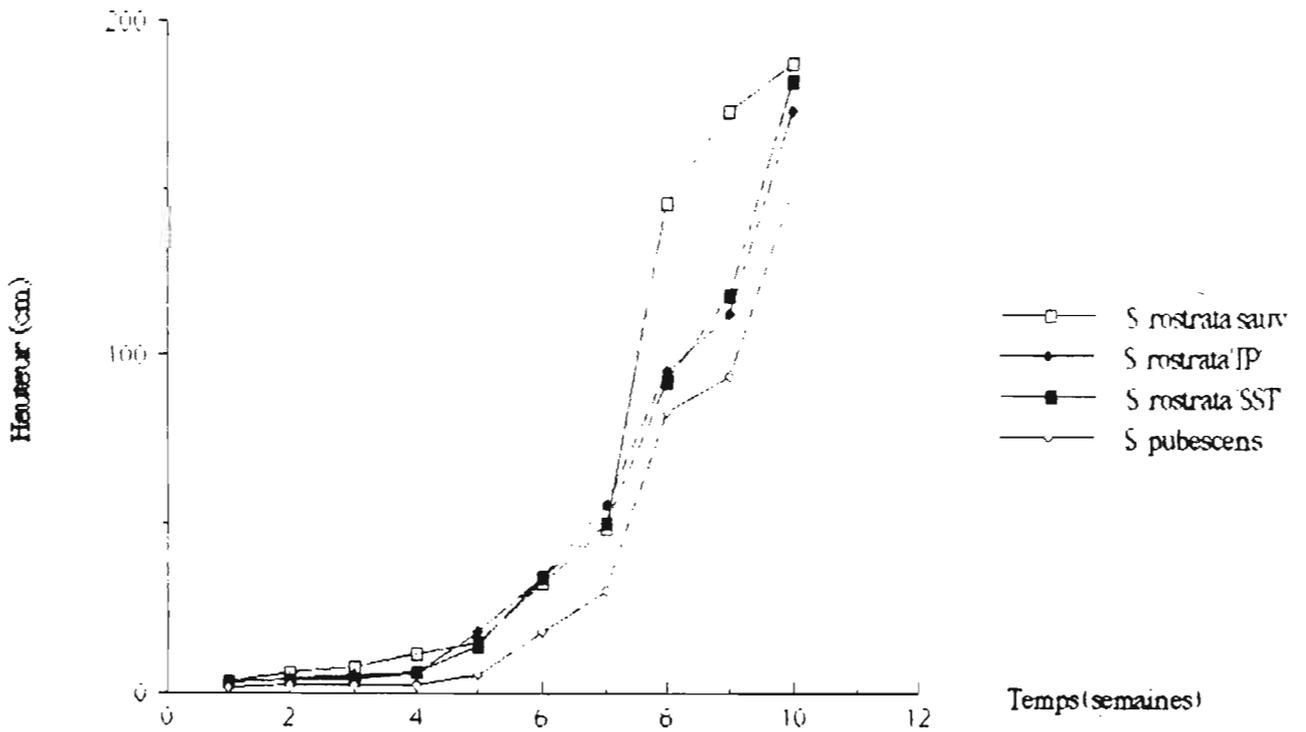
Graph.3a : Croissance des plantes (rac. inoc.) en condition de submersion du sol.



Graph.3b: Croissance des plantes (rac. inoc.) en condition de drainage du sol.



Graphique 4a. Courbe de croissance des plantes inoculées racines + tiges et racines en conditions de submersion du sol.



Graphique 4b. Courbe de croissance des plantes inoculées racines + tiges et racines en conditions de drainage du sol.

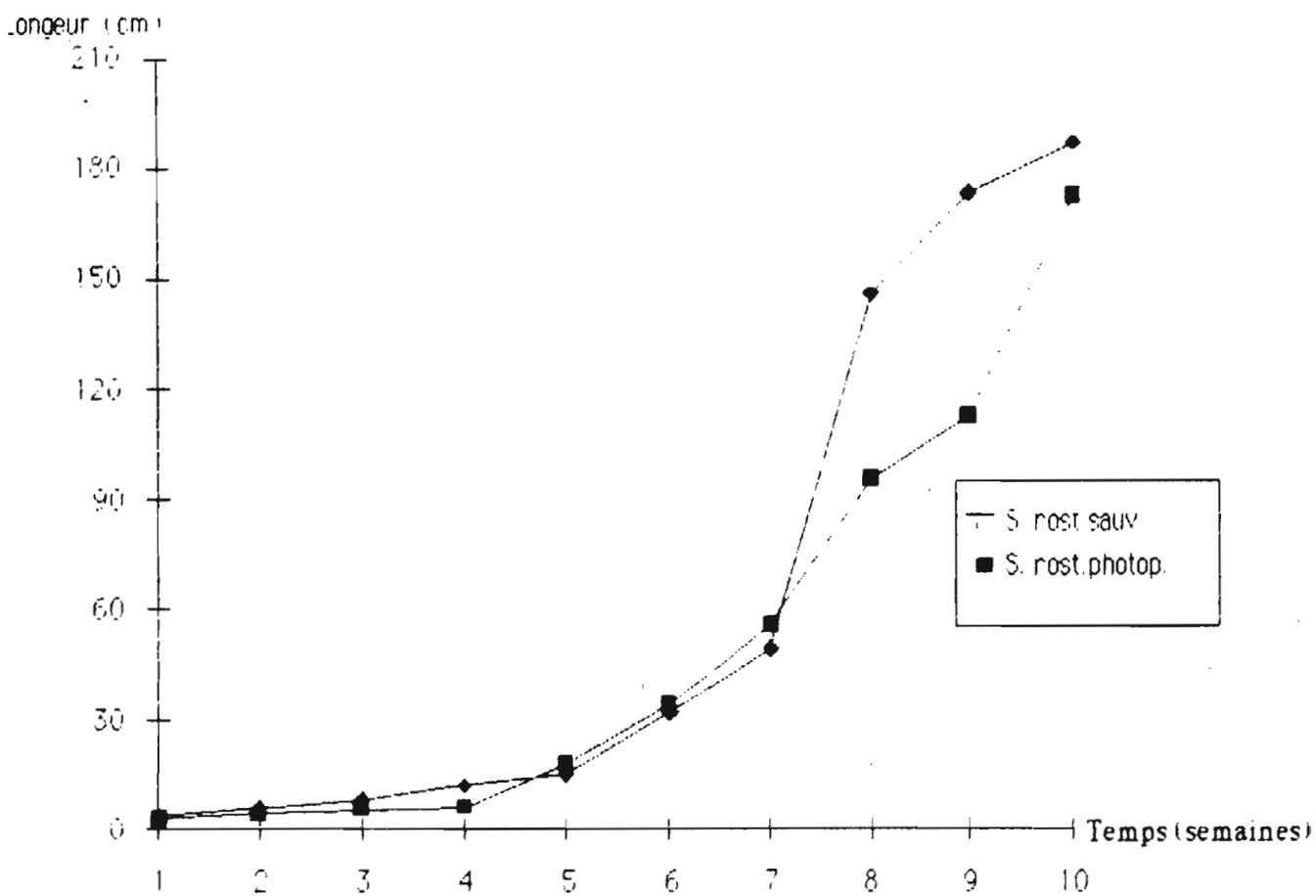


Figure 5a : Croissance des plantes (racines et tiges inoculées) en condition de drainage du sol

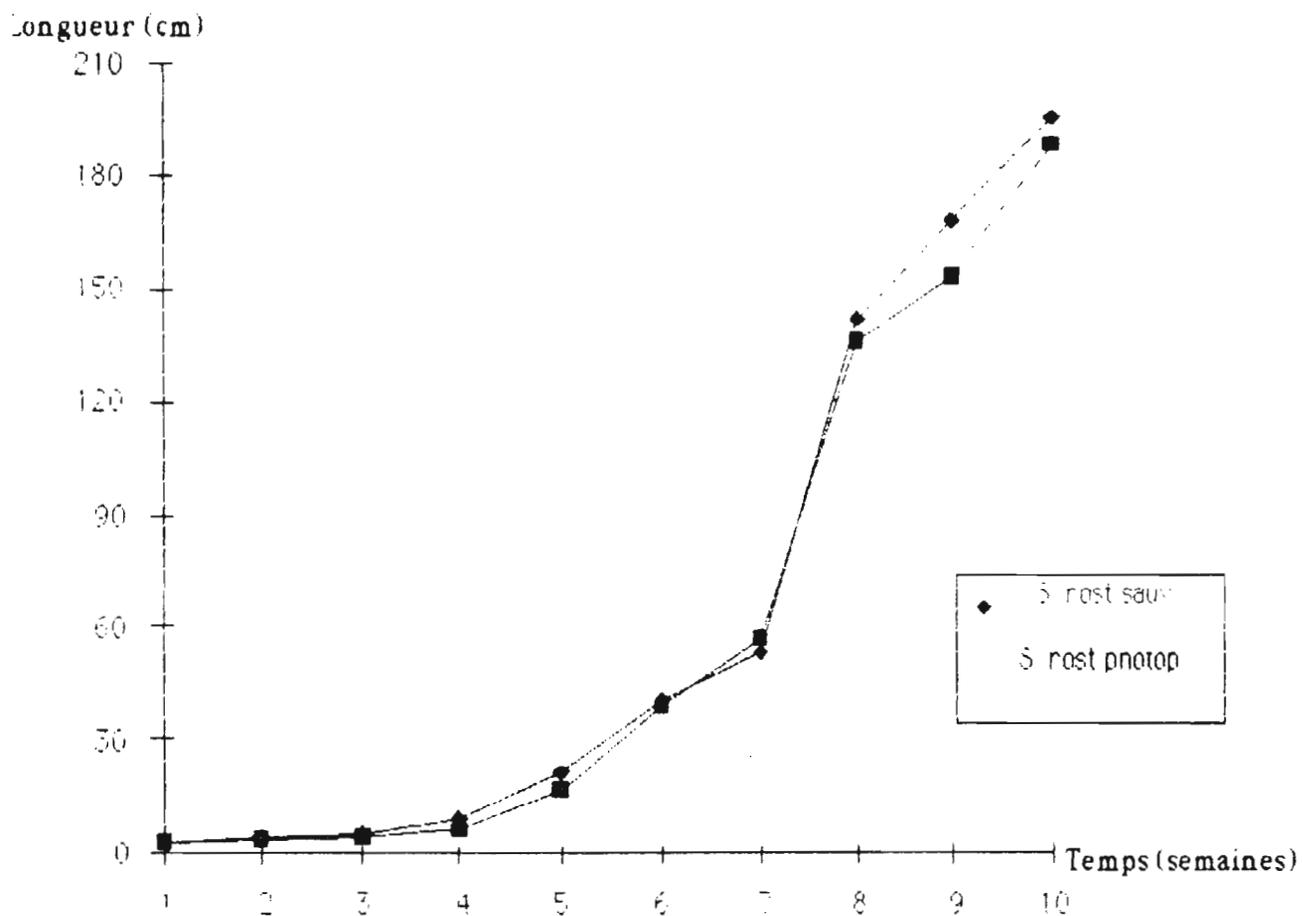


Figure 5 b: Croissance des plantes inoculées (racines + tiges) en conditions de submersion du sol.

3.5. DISCUSSION

Les conditions environnementales ont une influence considérable sur la croissance des plantes. Dans le cas précis des légumineuses fixatrices d'azote, les plantes peuvent présenter diverses réponses au stress hydrique ou à un excès d'eau.

Ainsi, Sau *et al.*, (1990) démontrent une remarquable influence du stress hydrique sur la fixation d'azote dans les nodules du *Vicia faba* ; elle se traduit par forte une réduction de la fixation d'azote dans le nodule et cette réduction se manifeste par une chute de la biomasse de la plante. De la même manière Sasakawa, (1990) mentionne une influence de facteurs environnementaux comme la température et l'éclairement sur la nodulation des tiges chez *A. indica*. Cette influence est identique à celle signalée chez *Vicia faba* (Sau *et al.*, 1990).

Des résultats de la présente étude, il ressort que les 4 types de plantes présentent des réponses variables selon le régime hydrique :

- D'un point de vue de la nodulation, le mutant "SST" présente dans les conditions de submersion du sol, peu de nodules racinaires ; cette réduction de la nodulation résulterait du faible nombre de racines secondaires observé chez ce mutant alors que les nodules se forment généralement à la base des racines secondaires (Dreyfus, Communication personnelle) ; cependant ses nodules présentent un poids sec moyen nettement plus important que celui des autres types. Ce type mutant produirait par conséquent de plus gros nodules que ceux du type "sauvage" de *S. rostrata* qui forme de nombreux petits nodules.

Les différences de nodulation observée chez le type sauvage de *S. rostrata* et chez *S. pubescens* pourraient être dues à un effet du microsymbiote utilisé. La souche d'*Azorhizobium* ORS 571 utilisée pour l'inoculation des types de *S. rostrata* est très infective et forme généralement de très nombreux nodules. Nous savons par ailleurs que les souches de *Rhizobium* forment de gros nodules sur *S. rostrata* (Ndoye, 1990). La souche ORS P₁, utilisée pour l'inoculation de *S. pubescens* étant un *Rhizobium*, un "effet souche" ne peut donc être exclu. En fait, les différences observées seraient le résultat de l'action conjuguée de l'effet de la souche bactérienne et de la plante hôte.

- En ce qui concerne la biomasse aérienne, exception faite du mutant "SST" dont la croissance est inhibée par la submersion du sol, toutes les autres plantes répondent favorablement à cette condition. Les deux types sauvage et le mutant "IP" de *S. rostrata* apparaissent comme les mieux adaptés aux conditions de la submersion du sol. Leur capacité de fixation de l'azote est élevée ce qui accroît leur biomasse.

Quant à l'espèce *S. pubescens*, les observations de son comportement vis à vis des conditions de cette expérience montrent qu'elle est plutôt indifférente aux deux régimes hydriques avec toutefois une capacité fixatrice assez élevée même si elle n'atteint pas celle de *S. rostrata* (type sauvage) à cause sans doute de la nodulation caulinaire.

Les résultats de cette expérience sont en accord avec ceux de travaux effectués antérieurement qui aboutissent à la conclusion selon laquelle le type sauvage de *S. rostrata*, de part son système de double nodulation racinaire et caulinaire, présente une parfaite adaptation à la submersion du sol. Cette propriété chez *S. rostrata* est d'autant plus connue qu'il fait l'objet de nombreuses applications en riziculture (Rinaudo *et al.*, 1982 ; IRRI, 1988 ; Ladha *et al.*, 1988 ; Ndoye et Dreyfus, 1988).

Concernant le comportement du mutant "SST", nous ne pouvons cependant pas dire que sa croissance soit affectée par les conditions de drainage du sol (sauf si les résultats obtenus se trouvent être reproductibles). Par contre il semble mal adapté aux conditions de submersion, ce qui réduit considérablement sa capacité de fixation de l'azote.

Dans notre expérience les interprétations des résultats sont limitées par les contaminations qui ne permettent pas une très bonne appréciation de l'inoculation avec les souches utilisées. De nombreux travaux réalisés sur des arbres fixateurs mettent en évidence l'importance de l'inoculation en vue de l'évaluation de la capacité de fixation des plantes inoculées par rapport aux témoins (Cornet *et al.*, 1985 ; Ndoye et Dreyfus, 1988 ; Sanginga, *et al.*, 1989 ; Sougoufara *et al.*, 1990). Ces travaux signalent les déconvenues et les inconvénients liés à cette méthode (la référence aux plantes témoins non inoculées) ; elle ne donne pas toujours une entière satisfaction (Sanginga *et al.*, 1989, 1990). Gauthier *et al.*, (1985) montrent par ailleurs tous les dangers liés à l'application d'une telle méthode toutefois très pratique ; ils déplorent cependant les conséquences liées aux contaminations des témoins.

Dans cette expérience, nous n'avons pas échappé à ces inconvénients de la méthode.

CHAPITRE II :

**ETUDE DES SITES DE NODULATION CAULINAIRE ET
NODULATION EXPERIMENTALE CHEZ *Sesbania pubescens***

I- INTRODUCTION

La nodulation caulinaire

Actuellement, la présence de sites de nodulation et le phénomène de la nodulation caulinaires sont bien connus et décrits dans les détails chez un certain nombre de Légumineuses.

Les nodules caulinaires se forment généralement à partir de structures prédéterminées de la tige.

Mais la nature de ces sites de nodulation caulinaire est très variable ; ce sont :

- soit des mamelons caulinaires formés par une ébauche racinaire qui a déjà percé l'épiderme de la tige chez *S. rostrata* et chez *A. afraspera* (Duhoux et Dreyfus, 1982 ; Alazard, 1985 ; Alazard et Duhoux, 1988),

- soit des poils épidermiques sur l'épicotyle du *Vicia faba* ,

- soit une zone corticale de la tige localisée près de la zone d'émergence des radicelles chez *A. indica* L., (selon Arora, 1954 cité par Duhoux et Dreyfus, 1982),

- soit enfin des racines adventives *sensu stricto* chez *Neptunia oleracea*.

Les potentialités organogènes des mamelons caulinaires de *S. rostrata* et de *Aeschynomene* sp. ont aussi été déterminées expérimentalement (Duhoux et Dreyfus, 1982 ; Duhoux, 1984). Ainsi chez ces espèces, les mamelons en immersion donnent des racines adventives qui se ramifient. Il a aussi été établi expérimentalement que l'infection des mamelons par les *Rhizobium* spécifiques conduit à la formation de nodules caulinaires. Cette formation des nodules s'effectue indifféremment avec ou sans intervention de l'eau par divers vecteurs de l'infection comme le vent, la poussière, les fourmis ou l'homme (Duhoux et Dreyfus, 1982 ; Duhoux, 1984).

Il convient de signaler qu'un certain nombre d'autres plantes dont *Citrus*, *Cotoneaster*, *Hydrangea*, *Jasminum*, *Populus*, *Ribes*, *Salix*... possèdent sur leurs tiges des structures latentes susceptibles de donner ultérieurement des racines adventives (Duhoux et Dreyfus, 1982).

La tige de *S. pubescens* présente à l'observation macroscopique rapide des mamelons caulinaires comparables à ceux décrits chez *S. rostrata*.

Toutefois, en conditions naturelles ou de serre aucun nodule de tige n'est observé.

Notre travail a donc pour objectif de préciser la structure de ces mamelons et d'établir si oui ou non ce sont des sites potentiels de nodulation.

Cette étude sera menée dans un premier temps par une observation en microscopie photonique en microscopie électronique à balayage ; elle est conduite à la fois chez *S. rostrata* et *S. pubescens* afin de faciliter la comparaison.

Dans une seconde étape une étude expérimentale de la nodulation est conduite sur des plantes entières et sur des boutures de *S. pubescens* afin d'étudier les potentialités organogènes des mamelons et notamment l'obtention de nodules.

Enfin, des greffes sont envisagées entre *S. rostrata* et *S. pubescens* afin éventuellement d'améliorer les potentialités de nodulation caulinaire chez *S. pubescens*.

L'ensemble de ces résultats sera comparé à ceux déjà obtenus chez *S. rostrata* et chez *Aeschynomene spp.*

II. MATERIEL & METHODES

2.1- Etudes cytologiques : techniques de la microscopie photonique

2.1.1. Matériel biologique

Le matériel biologique, prélevé sur *S. pubescens* et *S. rostrata*, consiste en des entrenoeuds (1 à 2 cm de longueur) de tiges prélevés sur des plantes cultivées en conditions hydroponiques (conditions décrites au chapitre I). Ces prélèvements sont effectués sur des plantes âgées de 12 jours à 3 mois.

Avant le prélèvement, le choix des échantillons est réalisé au photomicroscope "WILD M 400".

2.1.2. Fixation des échantillons

Les fragments sont fixés pendant 12 heures par le mélange de Navashine ou par l'AFA (Alcool-Formol- Acide acétique) dont les compositions sont données dans le tableau **XII**, puis transférés dans des microplines et soumis à un rinçage continu pendant 24 heures.

Tableau n° **XII** : Composition des solutions pour la fixation des échantillons.

- L'AFA (Fixateur alcoolique)

| | |
|----------------|------------|
| Alcool 95% | 16 volumes |
| Formol neutre | 2 volumes |
| Acide acétique | 1 volume |

- Le Nawashine (Fixateur acide)

| SOLUTION A | | SOLUTION B | |
|-----------------------------|--------|---------------|--------|
| Acide acétique | 70 ml | Formol neutre | 300 ml |
| Acide chromique cristallisé | 10 ml | Eau distillée | 700 ml |
| Eau distillée | 920 ml | | |

Les deux solutions sont additionnées volume à volume au moment de la fixation.

2.1.3. La déshydratation

Afin de faciliter la pénétration ultérieure du milieu d'inclusion hydrophobe que constitue le Paraplast, les échantillons sont déshydratés dans des bains successifs d'éthanol de degrés croissants et pour des durées indiquées au tableau **XIII** suivant :

Tableau n° XIII : Composition des bains d'éthanol de déshydratation.

| | |
|--------------------------------|-----------------------------|
| Alcool à 25% | 30 mn |
| Alcool à 50% | 30 mn |
| Alcool à 75% | 30 mn* |
| Alcool à 95% | 45 mn |
| Alcool à 100% (éthanol absolu) | 2 fois 45 mn |
| Alcool à 100% | 14 heures (toute une nuit). |

A cette étape les échantillons peuvent être conservés pendant longtemps avant de passer aux étapes suivantes.

2.1.4. Imprégnation au Paraplast

Au cours de cette étape, l'alcool non miscible au Paraplast, doit être remplacé par l'un de ses solvants : le toluène. A cet effet, on réalise différents mélanges alcool-toluène en diminuant progressivement les proportions d'alcool pendant que celles du toluène sont augmentées selon des proportions présentées au tableau **XIV** ci-après. Les pièces sont ensuite transférées dans du Paraplast pur (Brunswick Laboratory).

Tableau n° XIV : Composition des solutions d'alcool et de toluène d'imprégnation.

| SOLUTIONS v/v | ALCOOL | TOLUENE | TEMPS |
|---------------|--------|---------|----------------|
| Solution I | 3/4 | 1/4 | 30 mn |
| Solution II | 1/2 | 1/2 | 30 mn |
| Solution III | 1/4 | 3/4 | 30 mn |
| Toluène pur | | | (3 fois 30 mn) |

Avant la coloration, un mordantage de 30 minutes est effectué par une solution d'alun de fer dont la composition est donnée au tableau **XVII**. Après rinçage à l'eau courante, une goutte de colorant est déposée sur la lame pendant 1 à 2 mn, qui sera ensuite rincée à l'eau distillée.

Tableau n°**XVII** : Composition de la solution de mordant.

Solution d'alun de fer:

| | | |
|--|-----|----|
| Eau | 500 | ml |
| Acide acétique | 5 | ml |
| H ₂ SO ₄ concentré | 0,6 | ml |
| Sulfate d' ammonium ferrique | 15 | g |

Le paragon, le bleu de toluidine et l'hématoxyline ferrique de Régaud (tableau **XVIII**) (Gabe, 1960 ; Lison, 1960 ; Langeron, 1949) sont les principaux colorants qui ont été utilisés. Ces colorations mettent en évidence de façon très nette les cellules méristématiques.

Tableau n°**XVIII** : Composition des principaux colorants utilisés.

(1) Le paragon

| | | |
|-------------------------|-------|----|
| Bleu de Toluidine | 1,460 | g |
| Fushine basique | 0,540 | g |
| Alcool à 30% | 200 | ml |

(2) Le Bleu de Toluidine

| | | |
|------------------------------------|-----|----|
| Eau distillée | 75 | ml |
| Carbonate de lithium | 0,5 | gr |
| Bleu de toluidine | 1 | gr |
| Après dissolution complète ajouter | | |
| Glycérine | 20 | gr |
| Alcool à 95° | 5 | ml |

(3) L'Hématoxyline Ferrique de Régaud

| | |
|--------------------------------------|-------|
| Solution alcoolique d'hématoxyline | |
| cristallisé (Geigy) à 10 p 100 | 10 ml |
| Glycérine | 10 ml |
| Eau distillée | 80 ml |

2.1.7. Montage

Avant le montage une déshydratation rapide est effectuée en plongeant la lame dans des tubes Borrel contenant de l'alcool à 75%, 95% et 100% (2 fois). Afin de faciliter l'étalement du Baume du Canada, la lame est passée dans trois tubes contenant du toluène. Sur la préparation est déposée une goutte du Baume du Canada, puis elle est recouverte par une lamelle qui est, elle-même, passée dans du toluène.

2.2. Techniques de microscopie électronique à balayage

Nous avons eu recours aux techniques de la MEB pour les observations de surface; elles viennent en appui pour confirmer celles effectuées par les autres méthodes d'étude utilisées telle que la microscopie photonique.

2.2.1. Observations directes après congélation

Les échantillons sont des fragments de tiges provenant :

- soit de plantes entières de *S. pubescens* cultivées en condition hydroponique et en pépinières de plein air
- soit de boutures de 24 heures, 48 heures et 72 heures de ces mêmes plantes âgées de 3 mois.

Ces fragments de 0,5 cm comportent des mamelons caulinaires aux deux états de différenciation suivants: mamelons caulinaires proéminents et mamelons caulinaires peu proéminents. Sur les boutures sont également prélevés des fragments comportant des mamelons caulinaires induits par l'eau (émission de racines de 0,2 cm à 0,5 cm de longueur).

Les échantillons sont congelés dans l'azote liquide (-196°C) et les observations de surface sont réalisées sur un microscope à balayage JEOL JMS 35 CF sous une tension d'accélération de 8 Kv.

2.2.2. Préparation et observations après déshydratation

Sur certains échantillons, nous avons effectué des coupes longitudinales de mamelons caulinaires en vue d'observer leur structure interne. Ces échantillons sont placés dans des tubes à hémolyse dans une goutte d'eau distillée. Ces tubes sont placés dans un dessiccateur rempli d'acétone pure et relié à une pompe à vide. Une dépression est provoquée jusqu'à l'entrée en ébullition de l'acétone. Le dessiccateur est fermé jusqu'à ce que le liquide remonte dans les tubes à hémolyse, résultat obtenu au bout de 72 heures. Le dessiccateur est alors ouvert et les échantillons sont récupérés et transvasés dans de l'acétone pure pour le passage au point critique.

Après le passage au point critique (Tousmis^R, Samdri, 790), les échantillons sont disposés dans un portoir métallique pourvu d'une pellicule d'adhésif (vernis). Ils ensuite sont orientés et soumis à la métallisation (JEOL^R, Fine coat ion sputter, JFC 1100). Les observations de surface sont réalisées comme précédemment au microscope JEOL^R JMS 35 CF sous une tension d'accélération de 10 Kv.

2.3. Techniques d'inoculation de plantes entières en chambre de culture

Cette inoculation concerne deux lots de plantes entières que l'on a qualifié de "variants phénotypiques" du type sauvage classiquement observé, les plantes du lot "variant 1" présentent de nombreux mamelons très proéminents ; celles du lot "variant 2" ne présentent pas de mamelons caulinaires visibles. Toutes ces plantes sont âgées de 2 mois et 1/2 et ont été cultivées en condition hydroponique.

Il convient de signaler également que dans la population des plantes de *S. pubescens* étudiée, les proportions des plantes des différents lots étaient de 25% , 50% et de 25% pour respectivement le lot "variant 1", le lot "variant 2" et pour le type sauvage classique.

Les plantes des deux lots variants 1 et 2 sont inoculées avec une suspension bactérienne en phase de croissance exponentielle (10^9 bact./ml) des 6 souches (ORS 53 ; ORS P1 ; ORS P2 ; ORS P4 ; ORS 611 ; ORS 616) à raison de 3 plantes par souche selon les procédés suivants :

- badigeonnage simple sous la hotte à flux laminaire
- badigeonnage après un légère grattage de l'épiderme des mamelons caulinaires à l'aide d'une lame de scalpel stérile
- injection sous épidermique de l'inoculum à l'aide d'une micro-séringue munie d'une fine aiguille stérile. L'inoculation a été effectuée sur toute portion de la tige présentant des mamelons caulinaires. Cette opération a été répétée 3 fois à 15 jours d'intervalle et sur les mêmes plantes.

Le tableau **XIX**, présenté ci-dessous, résume les opérations d'inoculation qui ont été effectuées.

Les inoculations ont été effectuées à raison de

- 3 plantes par souches et par méthode d'inoculation
- 1 plante témoin par lot et par méthode d'inoculation
- 3 plantes du type sauvage ont aussi été inoculées dans les mêmes conditions que les plantes des lots variants.

Tableau n° XIX : Opérations d'inoculation de plantes entières de culture hydroponique.

| | Sauvage | Variante 1 | Variante 2 | Témoins |
|---------|---------|------------|------------|---------|
| Souches | | | | |
| ORS 53 | 9 | 9 | 9 | 3 |
| ORS 611 | 9 | 9 | 9 | 3 |
| ORS 616 | 9 | 9 | 9 | 3 |
| ORS P1 | 9 | 9 | 9 | 3 |
| ORS P2 | 9 | 9 | 9 | 3 |
| ORS P4 | 9 | 9 | 9 | 3 |

NB : lot "variant 1" (plantes à mamelons caulinaires très nettement visibles)

lot "variant 2" (plantes sans mamelons caulinaires visibles)

type "sauvage classique" de *S. pubescens* ; il présente très peu de mamelons caulinaires visibles

les témoins proviennent à la fois des plantes de chacun des variants phénotypiques et des plantes du type sauvage classique.

A l'issue de l'inoculation les plantes sont maintenues en chambre de culture à la température de 25°C et sous éclairage continu (2500 lux). Deux mois et 1/2 après l'inoculation, la formation de nodules a été recherchée.

2.4. Méthodes de bouturage et d'inoculation des boutures

Afin de définir les potentialités organogènes (rhizogènes et nodulaires) des mamelons caulinaires, le bouturage a été envisagé ici car comme l'ont montré les travaux antérieurs sur *S. rostrata*, il met en évidence les potentialités organogènes de ceux-ci (Duhoux et Dreyfus, 1982, Spencer-Barreto, *et al.*, 1989). Des travaux analogues ont été réalisés sur boutures de 3 espèces d'*Eucalyptus* (Clémens, 1978) et sur les hypocotyles d'*Helianthus annuus* (Liu *et al.*, 1990).

2.4.1. Bouturage en serre

Les plantes utilisées pour la production de boutures sont cultivées en pépinières de plein air.

Les boutures sont obtenues par sectionnement des plantes au niveau du collet. Ce sont des plantes âgées de 2 mois à 3 mois et 1/2. Elles mesurent de 30 à 35 cm de long et présentent 5 à 7 noeuds. Elles sont effeuillées à l'exclusion des 2 ou 3 feuilles de l'extrémité apicale.

Les boutures sont immergées dans des récipients selon les dispositifs expérimentaux suivants :

- Dispositif 1: bouteilles de 1500 ml ; hauteur 33 cm ; qualité du récipient: relativement opaque ;

- Dispositif 2: tubes de verre 220 ml ; hauteur 25 cm ; qualité du récipient : translucide ; diamètre intérieur: 3,2 cm.

Dans ces dispositifs, les récipients sont remplis jusqu'à ras-bords d'eau courante pour le dispositif 1 qui a servi à étudier uniquement les aspects de la rhizogenèse et d'eau stérile pour le dispositif 2 utilisé pour étudier la nodulation à partir des racines adventive. Ces récipients sont recouverts par un capuchon de parafilm ou un capuchon d'aluminium afin de conserver l'humidité. L'immersion s'effectue sur les $\frac{4}{5}$ de la longueur de la bouture.

2.4.2. Bouturage en chambre de culture

Nous avons utilisé le dispositif 3 présenté ci-après

- Dispositif 3: tubes de verre 110 ml ; hauteur 16,5 cm ; qualité translucide ; diamètre intérieur: 3 cm.

Dans ce dernier cas les boutures proviennent de plantes plus jeunes (2 à 2 mois $\frac{1}{2}$ d'âge), cultivées en condition hydroponique.

2.4.3. Inoculation des boutures

L'inoculum utilisé est une suspension bactérienne en phase de croissance exponentielle (10^9 bact. /ml) des souches : ORS 52; ORS 53; ORS 611 ; ORS 616 ; ORS P1 ; ORS P2 et ORS P4. Ce sont celles qui ont été reconnues très performantes pour la nodulation des racines au cours de la détermination du spectre d'hôte (Chapitre I § 2.1.).

La quantité d'inoculum utilisée est de 10 ml pour les boutures du dispositif 2 et de 5 ml pour celles du dispositif 3.

Deux méthodes d'inoculation ont été adoptées :

i) - l'inoculation en immersion

Dans chaque tube, 5 ou 10 ml d'inoculum liquide sont déposés aseptiquement sur les racines adventives quand elles commencent à émerger. La bouture est replacée dans l'eau après cette opération. L'inoculum peut aussi être ajouté au liquide contenu dans le tube par un trou pratiqué à travers le capuchon.

ii) - l'inoculation en émersion

Les boutures sont ici inoculées par pulvérisation de la suspension bactérienne. Le tube de culture est ensuite vidé aux 2/3 de son eau de sorte qu'une partie de la bouture portant les racines adventives en cours d'émission, reste à l'air libre dans une atmosphère humide. Toutes ces opérations s'effectuent avec un grand soin afin d'éviter de détruire les racines adventives qui seraient formées. L'émersion-inoculation n'a été appliquée qu'aux boutures en serre.

Dans l'optique de provoquer la nodulation, il s'est avéré essentiel de déterminer la période propice d'inoculation (période de compétence) qui permettrait l'induction du plus grand nombre de nodules sur les racines.

Pour ce faire, nous avons procédé à l'inoculation depuis le premier jour de l'immersion jusqu'au 10^è jour après celle-ci. L'émission de racines adventives par les mamelons caulinaires jeunes faiblement différenciés intervenant tardivement, nous avons également procédé à des réinoculations au 10^è jour après l'immersion afin de provoquer l'infection de ces racines adventives émises tardivement. Dans ces cas de réinoculations, les conditions d'inoculation sont les mêmes que lors des premières opérations.

Le relevé du nombre de nodules a été effectué 36 jours après la date de chaque inoculation. L'expérience a porté sur un nombre total de 132 boutures réparties en lots de 12 boutures par échantillon et par date d'inoculation (dispositif 2 en serre).

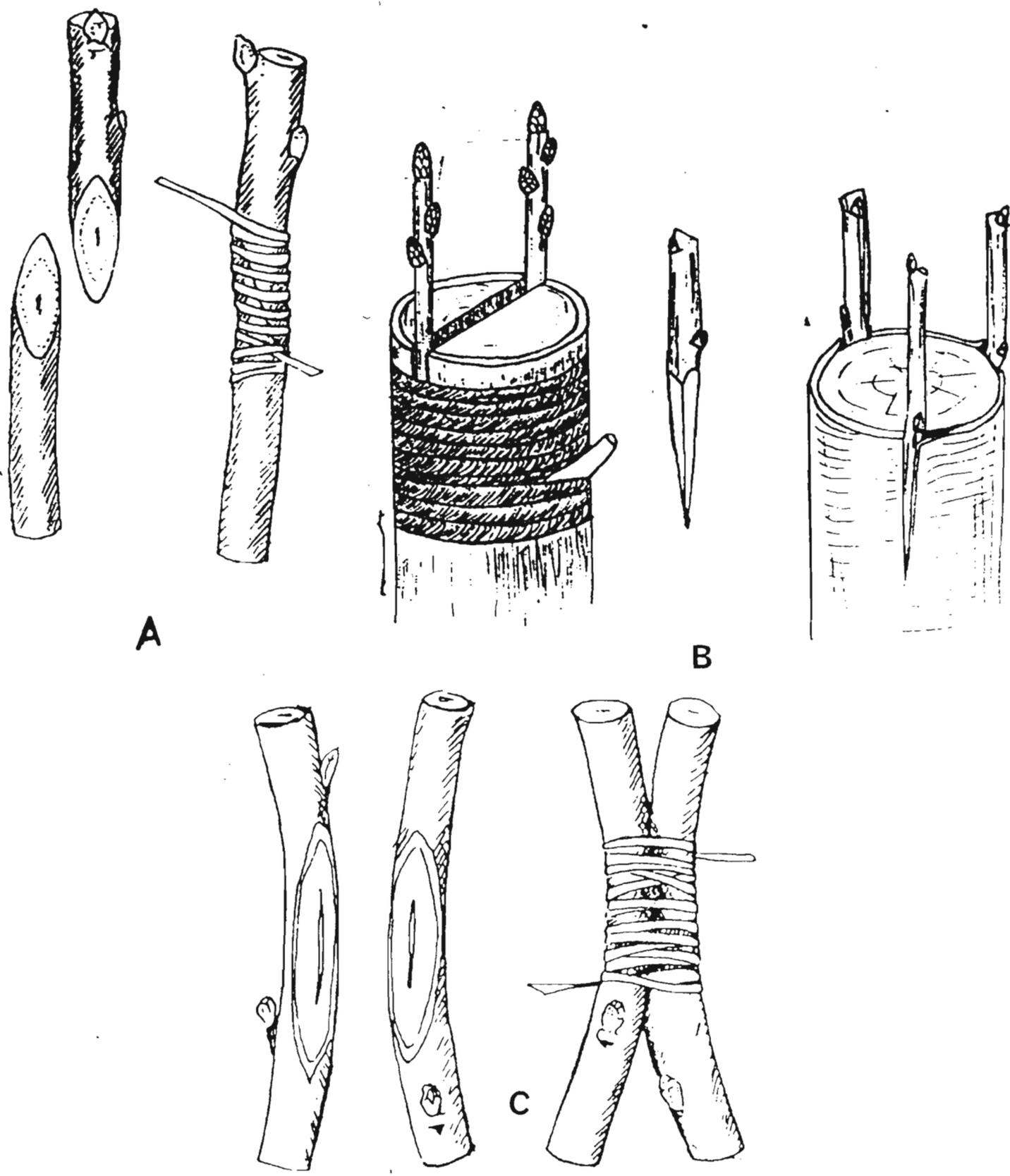
2.5. Méthodes d'analyse statistique utilisées

Les résultats ont été analysés selon les tests statistiques de Newman et Keuls ($P = 5\%$). Des comparaisons multiples de moyennes (Lamotte, 1971 ; Lison, 1969 ; Dagnélie, 1975) ont également été effectuées.

2.6. Techniques du greffage

En vue d'observer les influences physiologiques réciproques éventuelles entre des plantes cultivées en pots (pépinières de plein air) et âgées de 2 mois, nous avons testé les procédés de greffes ci-dessous où *S. rostrata* et *S. pubescens* ont été alternativement porte-greffe et greffon (FIG. 2):

- la greffe de rameaux de même diamètre, ou greffe anglaise, dont le principe consiste à appliquer l'une contre l'autre deux sections obliques du rameau porte-greffe et du greffon puis à les ligaturer solidement (schéma A)
- la greffe en fente: le greffon taillé en biseau à la base est appliqué dans la fente du porte-greffe et ligaturé solidement (schéma B)
- la greffe par approche qui consiste à appliquer en les rapprochant,



A

B

C

Fig.2: Schémas des principaux procédés de greffes utilisés :

- A : greffe anglaise
- B : greffe en fente
- C : greffe par approche

(Selon Champagnat et Ozenda, 1960).

les deux individus entiers par une surface de contact qui consiste en une entaille sur chaque rameau; l'ensemble est ligaturé solidement (schéma C).

Dans tous ces procédés de greffe, à l'issue de l'opération, du mastic est appliqué sur la greffe pour assurer de bonnes conditions d'asepsie et une bonne cicatrisation (Champagnat *et al.*, 1960).

III. RESULTATS

3.1. Etude morphologique des mamelons caulinaires de *S. pubescens*

3.1.1. Répartition spatiale des mamelons caulinaires (observations morphologiques)

L'observation macroscopique montre que les mamelons de *S. pubescens* se répartissent suivant des génératrices verticales. Généralement, les mamelons de chaque génératrice sont émis en partant de l'aisselle d'une feuille et prennent fin au 2^e/3^e supérieur de l'entre-nœud avant la feuille suivante (que ce soient les feuilles cotylédonnaires ou les feuilles vraies), à l'exception des trois premiers entre-nœuds suivant les feuilles cotylédonnaires (des cotylédons à la 3^e feuille vraie). Très souvent, ces portions de la tige sont relativement plus courtes ; les génératrices de mamelons de ces portions peuvent alors atteindre la feuille suivante. Ainsi deux génératrices de mamelons peuvent être observées au niveau de la paire de feuilles cotylédonnaires (FIG. 3); une seule se développe à l'aisselle des feuilles vraies. La répartition des génératrices suit alors celle des feuilles et est alterne (FIG. 4).

D'une manière générale, sur la génératrice, le nombre des mamelons visibles varie de 7 à 12 pour les plantes cultivées en plein air ; cette proportion est de 2 à 7 pour les plantes cultivées en condition hydroponique. Ces chiffres paraissent donc liés aux conditions du milieu. Ils sont également largement influencés par la vigueur de la plante.

3.1.2. Structure anatomique d'un mamelon caulinaire bien développé

Les coupes longitudinales des mamelons les plus proéminents (FIG. 5a) et les plus âgés situés à l'aisselle des feuilles, présentent une ébauche racinaire bien individualisée qui émerge de la zone corticale de la tige. Cette ébauche racinaire présente un ensemble de cellules méristématiques recouvertes par une coiffe, un cylindre central dans lequel la vascularisation est très nette. Cette vascularisation se raccorde à la vascularisation de la tige. L'apex racinaire est protégé par une fine assise de cellules épidermiques aplaties et une parfaite continuité tissulaire est observée entre cette assise de l'épiderme de la tige et celle du dôme). La FIG. 5b montre une coupe longitudinale de mamelon caulinaire bien développé chez *S. rostrata*.

PLANCHE II

(Etude morphologique des mamelons caulinaires de *S. pubescens* et de *S. rostrata*)

- répartition spatiale (observations morphologiques)

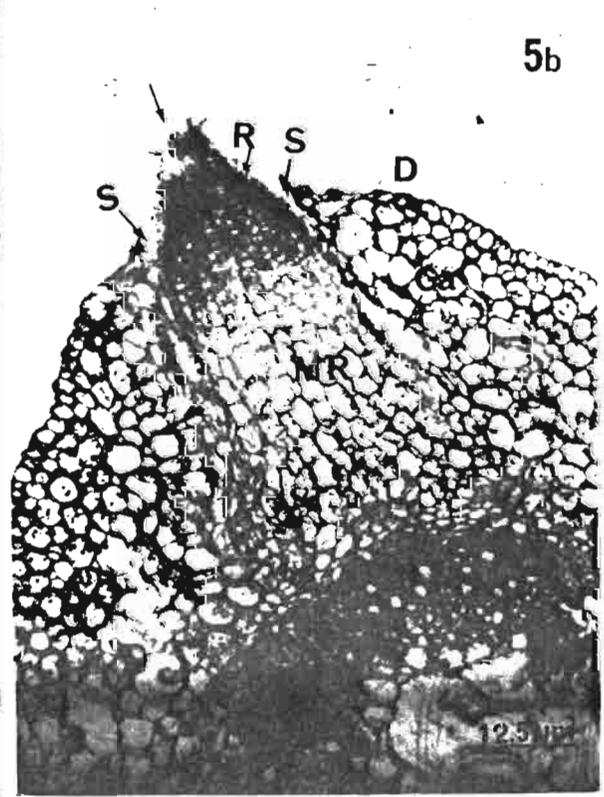
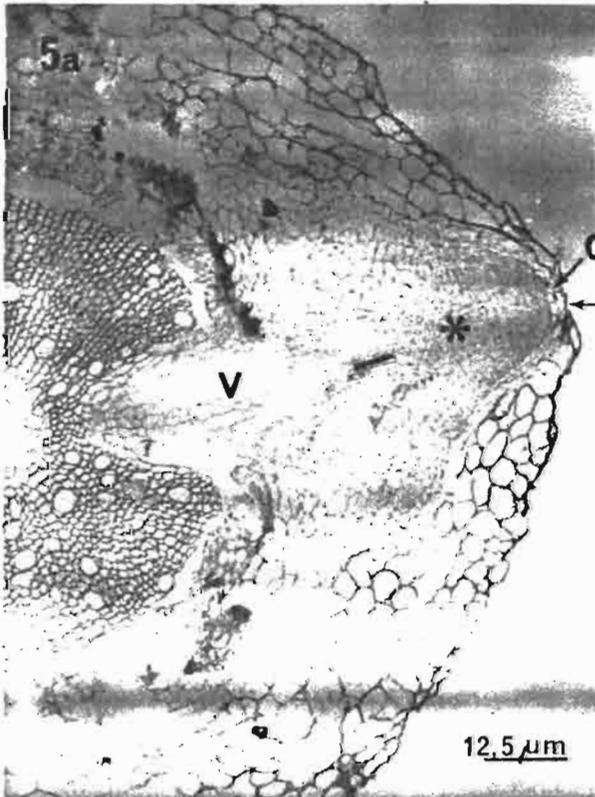
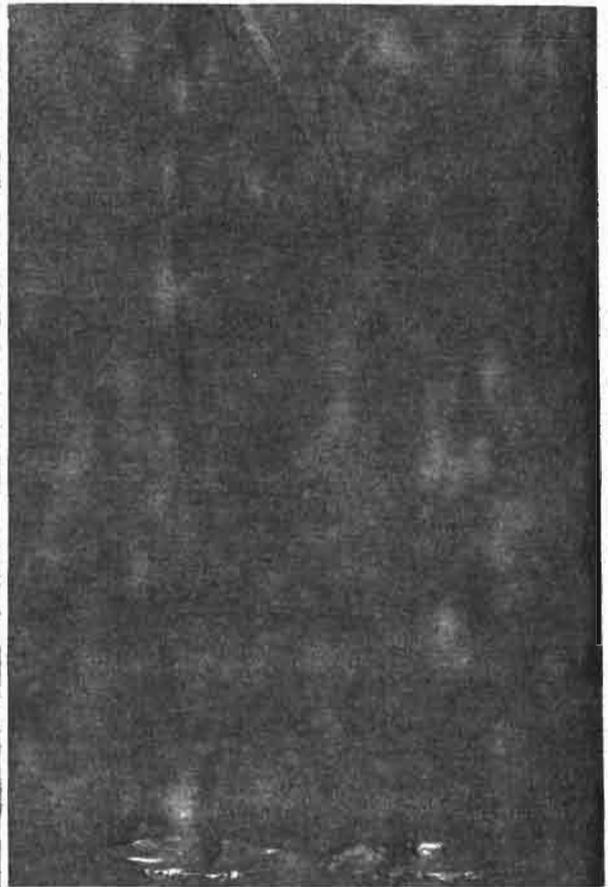
FIG. 3 : Vue générale : morphologie de la tige et des mamelons caulinaires de l'aisselle des feuilles cotylédonnaires sur une jeune plante de *S. pubescens* (25 jours) de culture hydroponique (vue grossie 5 fois).

FIG. 4 : Vue générale de tiges de *S. pubescens* et de *S. rostrata*. Les trois premiers entrenœuds de la tige sont plus courts ; les génératrices de mamelons caulinaires sont alternes (voir la flèche) (grandeur nature).

FIG. 5a : Observation en Microscopie Photonique (MPh) après fixation au Navashine et coloration au Bleu de toluidine d'une coupe longitudinale de mamelon caulaire de l'aisselle des cotylédons.

Barre : _____ 12,5 μ m

FIG. 5b : CL de mamelon caulaire type de *S. rostrata*.



3.2. Etude de l'ontogenèse des mamelons caulinaires

3.2.1. Aspects morphologiques

Sur une même génératrice, le mamelon le plus développé est toujours localisé à l'aisselle des feuilles. Il se caractérise par un dôme épidermique très proéminent (FIG. 6). Cette proéminence du dôme est de moins en moins accentuée au fur et à mesure que l'on s'éloigne de l'aisselle de la feuille pour disparaître complètement dans la partie apicale de la génératrice considérée.

Les observations macroscopiques des mamelons caulinaires révèlent à une date donnée, différents états de différenciation de ceux-ci sur une même génératrice.

3.2.2. Aspects histologiques

Le long de la génératrice, en remontant progressivement (FIG. 7), les sites apparaissent de moins en moins différenciés (FIG. 7, 8 et 9). L'ébauche racinaire est de plus en plus incluse dans les tissus corticaux de la tige et l'apex est protégé par plusieurs assises de cellules. La vascularisation est également de moins en moins bien différenciée.

3.3. Etude expérimentale de l'évolution des ébauches racinaires en racines adventives

Evolution des mamelons caulinaires dans l'eau : formation de l'aérenchyme et élongation de la racine adventive

Les expériences d'immersion de boutures de tiges de *S. pubescens* ont conduit à l'observation de trois phénomènes qui se présentent dans l'ordre suivant :

i)- une rupture de l'épiderme qui survient dès les 24 heures suivant l'immersion (FIG. 10) : pour une génératrice donnée, cette déchirure de l'épiderme part le plus souvent du mamelon de l'aisselle de la feuille dont le sommet du dôme constitue une zone de moindre résistance.

ii)- l'émergence de la racine à partir du mamelon

iii)- et la formation d'un aérenchyme, tissu spongieux d'aspect blanchâtre provenant de la turgescence des cellules et qui apparaît au niveau des assises de cellules corticales de la tige.

PLANCHE III

(Etude de l'ontogenèse des mamelons caulinaires chez *S. pubescens*)
- aspects morphologiques



FIG. 6 : Morphologie de tiges de *S. pubescens* et de *S. rostrata* ; mamelon caulinaire très proéminent de *S. pubescens* (double flèche). Aspects des mamelons caulinaires bien visibles sur la tige de *S. rostrata* uniquement (flèche) pour cette portion de la tige ($\times 2$).

PLANCHE IV

- aspects histologiques

FIG. 7a : Cl du mamelon caulinaire type de *S. pubescens*.

Observation en MPh de la coupe longitudinale d'un mamelon caulinaire de l'aisselle de la feuille chez *S. pubescens*. Le dôme épidermique (D Ep) est assez proéminent sur ce mamelon ; une assise de cellules corticales (Cc) à ne pas confondre avec le cylindre central (Cc) ; l'astérisque (*) indique la vascularisation de l'ébauche racinaire (Er).

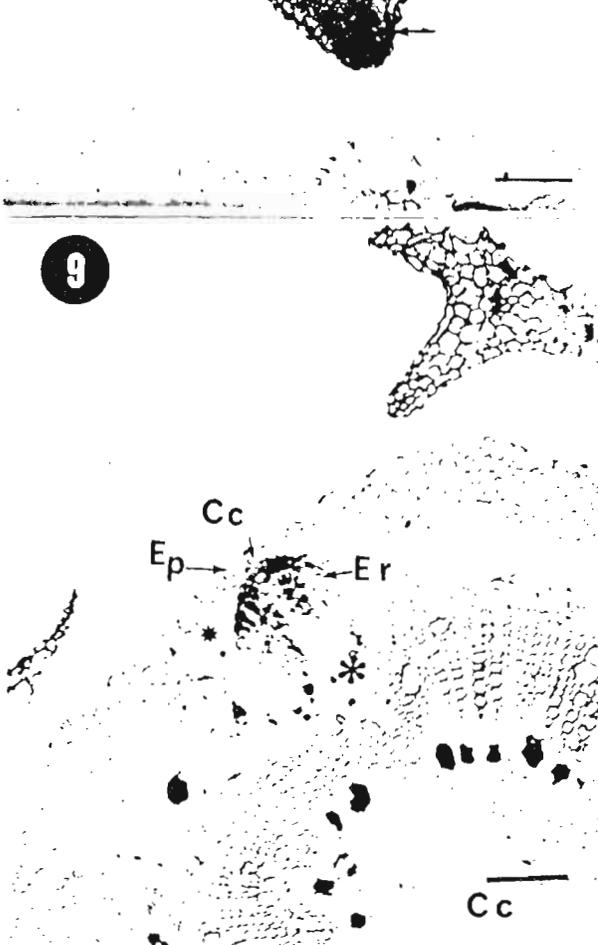
FIG. 7b : Coupe transversale de tige de *S. rostrata* présentant 3 génératrices de mamelons caulinaires.

FIG. 8 : Coupe longitudinale de mamelon type de *S. pubescens* localisé après celui de l'aisselle de la feuille. L'astérisque montre les cellules du méristème de la racine.

FIG. 9 : Cl de mamelon caulinaire de *S. pubescens* situé sur la génératrice suivante.

Barre : _____ 50 μ m.

* Les coupes longitudinales successives présentées dans cette planche illustrent les stades successifs de l'ontogenèse des mamelons caulinaires chez *S. pubescens* en culture hydroponique (plante âgée de 25 jours).



Lorsqu'une bouture est immergée dans l'eau, la réactivation des cellules méristématiques des ébauches racinaires des mamelons caulinaires et leur élongation sont fonction de la localisation du mamelon sur la génératrice et sur la tige. Ainsi les 2 premiers jours suivants l'immersion, seuls les mamelons caulinaires de la base peuvent émettre une racine adventive et qui peut atteindre de 0,2 cm à 2,5 cm de long (Fig. **11 et 12**). De telles longueurs ne seront atteintes que plus tardivement (entre les 5^e et 7^e jours) pour les racines des mamelons les moins proéminents.

D'un point de vue histologique, on observe

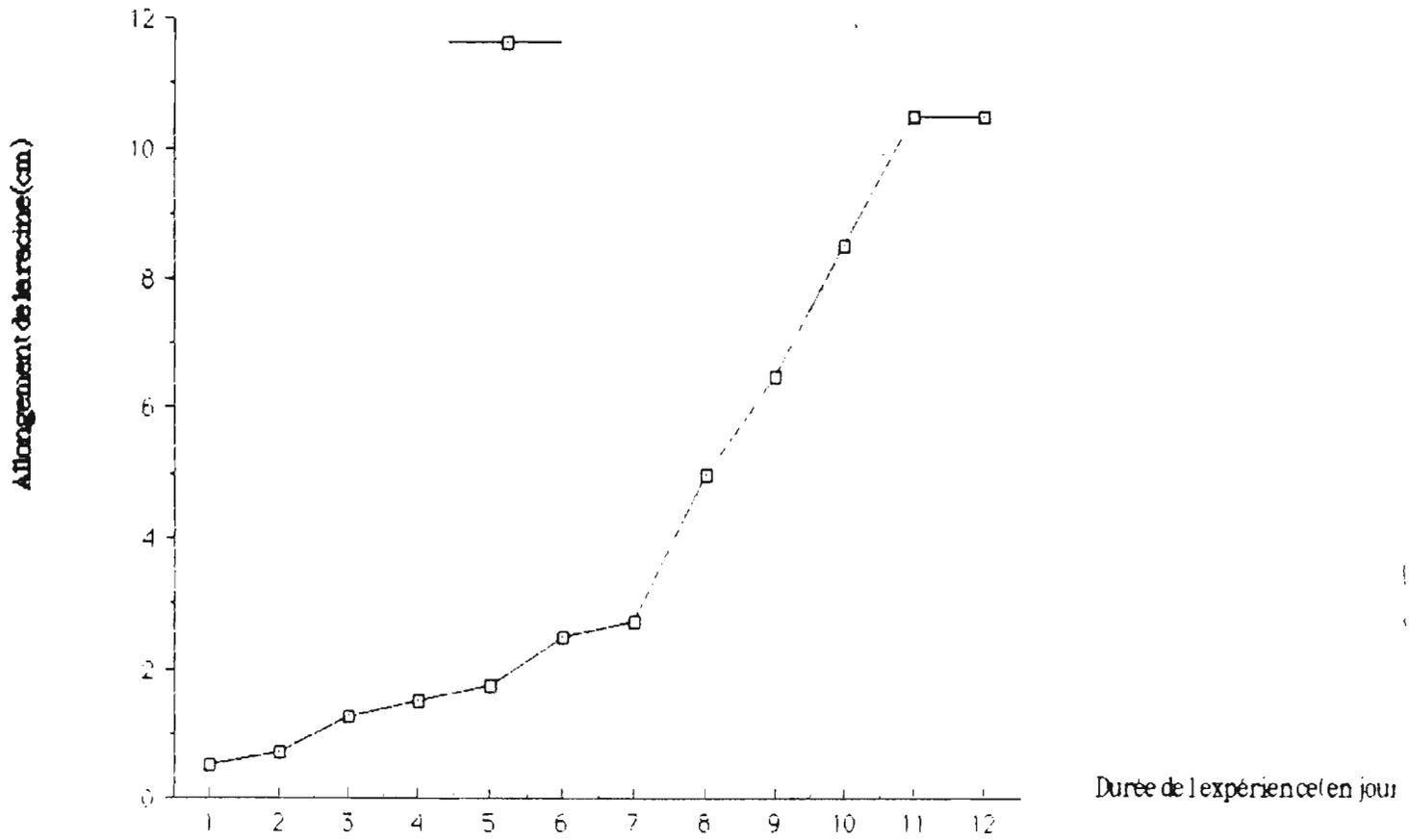
- l'aérenchyme et le méristème de l'ébauche racinaire (Fig. **13**)
- l'élongation racinaire et la rupture de l'épiderme (FIG. **14**)
- la racine adventive bien allongée (FIG. **15**).

Pour illustrer cette évolution, nous avons procédé à une mesure de l'allongement de la racine.

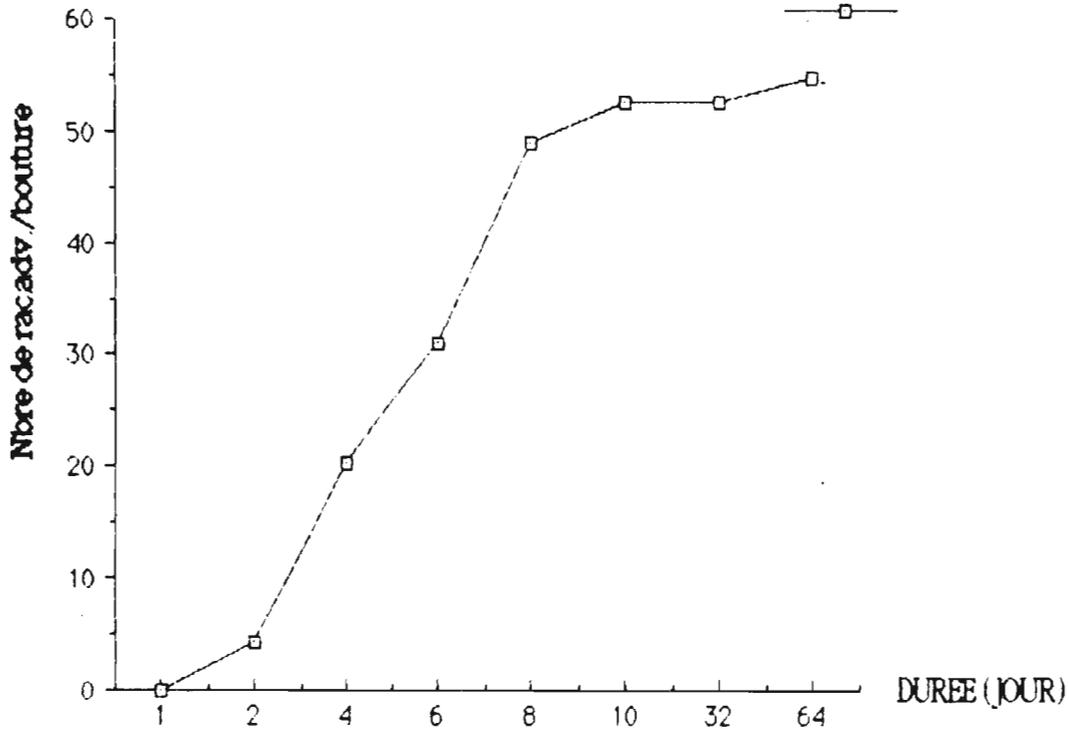
Le graphique **6** représente de l'élongation racinaire observée au bout de 12 jours sur une même racine adventive émise à partir d'un mamelon caulinaire de l'aisselle de la feuille.

Les observations ont montré qu'à partir de cette date (12 jours), il se forme de très nombreuses racines secondaires sur la racine adventive primitive (voir FIG. **16**) ; cette apparition de racines secondaires, sans arrêter l'allongement de la racine adventive, cependant le réduit sensiblement.

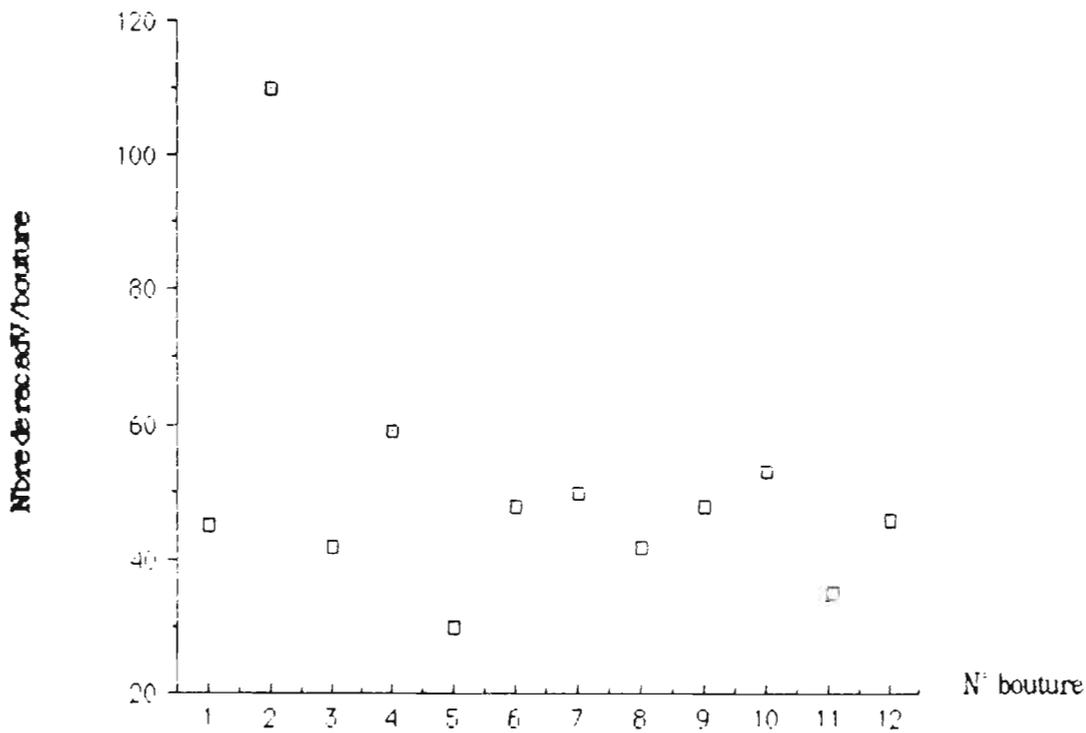
Les graphiques **7a et 7b** donnent une représentation du nombre de mamelons caulinaires réactivés pour donner des racines adventives respectivement à l'issue de 64 jours (pour des boutures en serre) et de 12 jours (pour des boutures en tubes en chambre de culture) sur des échantillons de 12 boutures ; nous pouvons remarquer une réactivation très tardive de mamelons caulinaires plus jeunes ; celle-ci peut survenir jusqu'à 25 jours après le premier jour de l'immersion (graphique **7a**). Cette réactivation tardive semble due au degré de différenciation de ces mamelons caulinaires ; elle est surtout très notable pour les boutures 5 et 7 pour cet échantillon. Ce sont généralement des mamelons caulinaires de la partie apicale des génératrices et de la tige qui évoluent les derniers. Ici il convient de signaler que le nombre de racines émises est beaucoup plus élevé que celui des mamelons observés à l'immersion. Cela suppose que de nombreux mamelons caulinaires peu visibles au moment de l'immersion se sont développés en racines plus tard.



GRAPHIQUE 6. Allongement de la racine adventive émise à partir d'un mamelon caulinaire de l'aisselle de la feuille (12 jours)



Graphique 7a: Rhizogenèse Adventive sur boutures chez *S. pubescens*
 Remarquer la réactivation très tardive
 au-delà de 1 mois de certains mamelons.



GRAPHIQUE 7b : Nombre de mamelons caulinaires réactivés sur un échantillon de 12 boutures
 Date de relevé : 12 jours

PLANCHE III

(Etude de l'ontogenèse des mamelons caulinaires chez *S. pubescens*)

- aspects morphologiques

FIG. 6 : Morphologie de tiges de *S. pubescens* et de *S. rostrata* ;
mamelon caulaire très proéminent de *S. pubescens* (double flèche).
Aspects des mamelons caulinaires bien visibles sur la tige de *S. rostrata*
uniquement (flèche) pour cette portion de la tige (x 2).

Planche V

(Etude de l'évolution des mamelons caulinaires en racines adventives)

(séries des inductions de mamelons caulinaires par l'immersion dans l'eau)

- formation de l'aérenchyme : observations en MEB

FIG. 10 : Observations de relief des modifications anatomiques induites par l'eau (24 heures) sur le mamelon caulinaire type de *S. pubescens*. Au centre est visible l'extrusion de la racine ; de part et d'autre, la brèche ouverte dans l'épiderme de la tige (petite flèche ; la grande flèche indique la cavité annulaire).

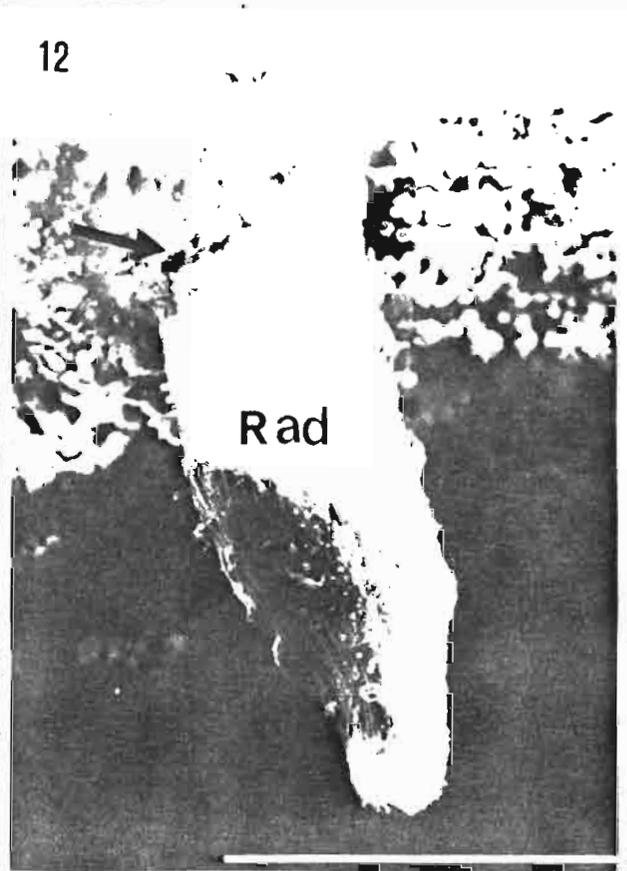
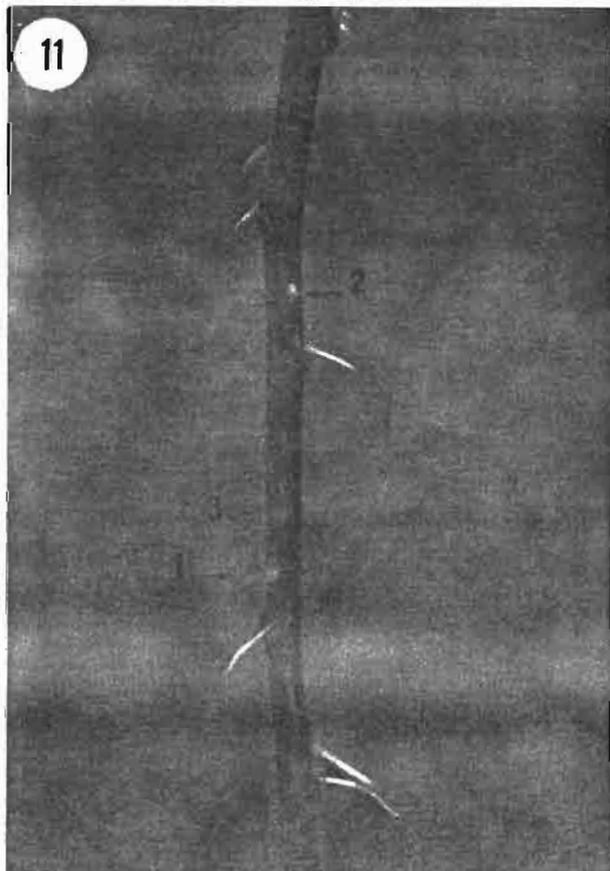
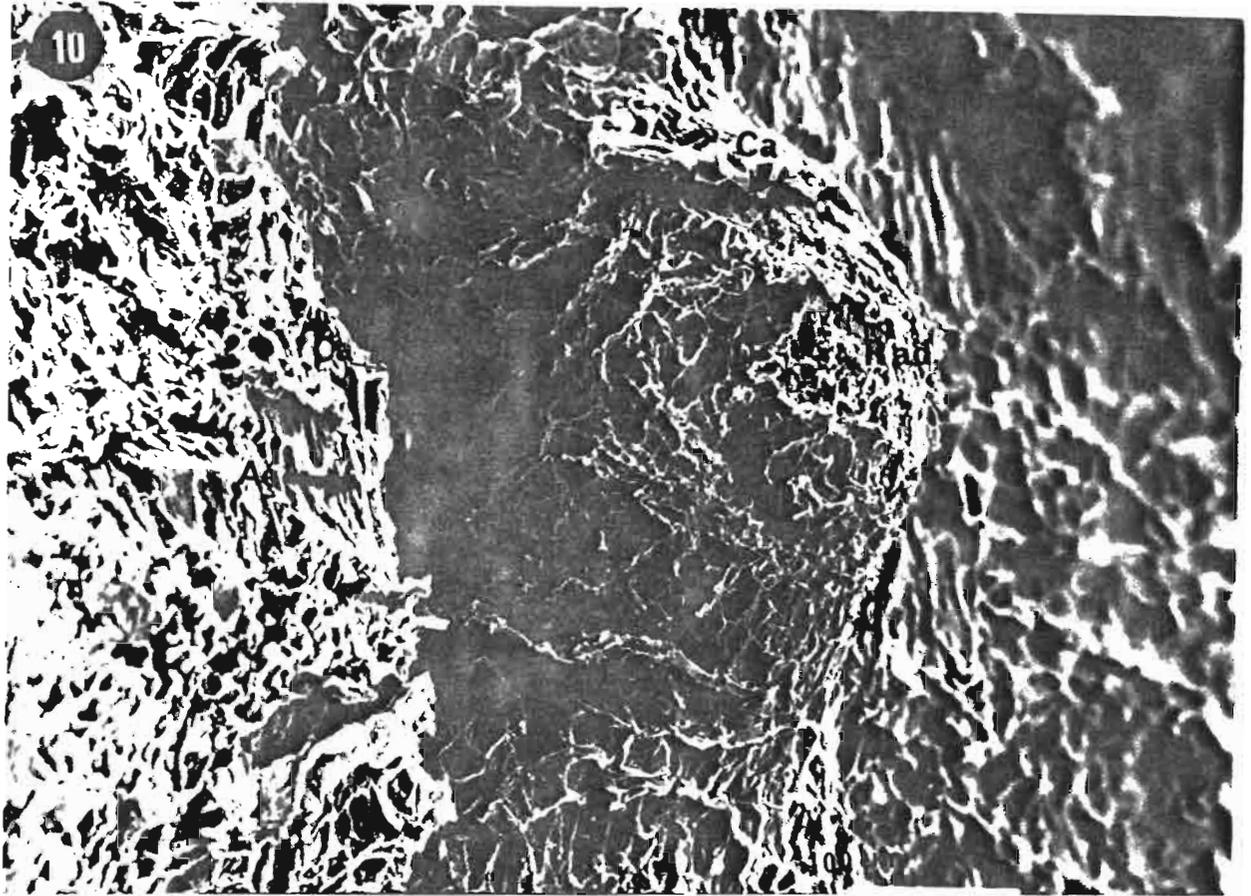
FIG. 12 : Vue en MEB d'une racine adventive obtenue à partir d'un mamelon caulinaire de l'aisselle de la feuille. Noter la longueur atteinte au bout de 72 heures d'immersion.

Barre : 100 μm .

FIG. 11 : Vue macroscopique d'une bouture de *S. pubescens* après 72 heures d'induction dans l'eau. Les différents niveaux de coupes indiqués (1, 2 et 3) correspondent aux vues en microscopie photonique ci-dessous ; (grandeur nature).

- 1 - Observation en microscopie photonique de la CI du mamelon caulinaire. Le dôme épidermique (D, Ep) est assez proéminent sur ce mamelon caulinaire ; assise de cellules corticales (Cc) à ne pas confondre avec le Cc, cylindre central ; l'astérisque (*) indique la vascularisation de l'ébauche racinaire (Er).

Barre : _____ 50 μm



3.4. Etude de l'évolution des mamelons caulinaires en nodules

3.4.1. Potentialités de nodulation sur plantes entières

Tous les nodules formés l'ont été que sur les plantes du seul lot "variant 1".

Les observations ont permis de noter 2 mois et 1/2 à l'issue des opérations d'inoculation après le grattage des couches superficielles de l'épiderme et par l'injection sous-épidermique, la présence de nodules sur la portion des tiges allant des cotylédons jusqu'à la première feuille vraie ; les résultats obtenus sont présentés au tableau **XX**. Aucun nodule n'a été observé au-delà de la 3^e feuille vraie malgré la présence de nombreux mamelons caulinaires très proéminents d'une part, et d'autre part malgré 3 opérations d'inoculations successives des mêmes plantes à 15 jours d'intervalle. De même aucun nodule n'a été observé sur les plantes du lot "variant 2" ni sur celles du type "sauvage classique".

Nous pensons que l'absence de nodulation au niveau des mamelons caulinaires qui se trouvent au-delà de la 3^e feuille vraie serait liée au degré de différenciation de ces mamelons situés plus haut. L'ébauche racinaire est plus difficilement accessible par les *Rhizobium*.

Parmi les 3 plantes qui ont présenté des nodules, les proportions de 2 et de 4 nodules (voir tableau **XX**) ont été obtenues respectivement pour l'inoculation après le grattage de l'épiderme du mamelon, et celle effectuée par l'injection sous-épidermique de l'inoculum.

Parmi les méthodes d'inoculation utilisées, les opérations par ces deux procédés pourraient être considérées comme celles qui ont permis d'atteindre la zone d'infection des mamelons caulinaires par les *Rhizobium*.

Tableau n° XX : Résultats des opérations d'inoculation des plantes entières de culture hydroponique pour mettre en évidence les potentialités de nodulation chez *S. pubescens*.

Les valeurs ci-dessous indiquées ne concernent que les plantes du lot "variant 1". (lot "variant 2" et sauvage classique = néant).

| Souches utilisées | | ORS 53 | ORS 611 | ORS 616 | ORS P ₁ | ORS P ₂ | ORS P ₄ |
|--|----------|----------|---------|---------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Nombre de plantes présentant des nodules : | A | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | B | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | C | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Nombre de nod. formés par méthodes d'inoc. | A | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | B | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| | C | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |

A - badigeonnage simple

B - inoculation après le grattage superficiel de l'épiderme du dôme

C - inoculation après l'injection de l'inoculum sous l'épiderme.

Planche VI

(Séries des coupes)

FIG. 13 : La coupe (du niveau 3 ci-contre) révèle la structure du méristème de l'ébauche racinaire en cours d'évolution (MER), Ph le phloème (tissu de la tige) ; Aérenchyme (Aé ; *), se forme sous les assises de cellules corticales et de l'épiderme ; la flèche indique une brèche ouverte dans l'épiderme de la tige.

- élongation racinaire :

FIG. 14 : Cl des mamelons caulinaires (niveau 2 ci-dessus) après l'induction dans l'eau ; les coupes ont été effectuées successivement de la base vers le sommet ; elles indiquent les différents stades de différenciation des mamelons sur la tige.

FIG. 15 : Cl du mamelon caulinaire le plus basal ; la racine adventive (R ad) est très bien développée (0,8 cm) (voir niveau 1 ci-dessus).

Barre : _____ 12,5 μ m.

FIG. 16 : Morphologie d'une bouture présentant un renflement nodulaire à la base de la racine adventive (x 2,5). Ce renflement de la base de la racine adventive d'un mamelon de l'aisselle de la tige est observé après 12 jours d'immersion et l'inoculation par une souche bactérienne très performante de *S. pubescens*.

NB :

1- niveau de la coupe de la racine adventive du mamelon le plus basal ;

2- niveau de la coupe du mamelon suivant développé en racine adventive (0,3 mm)

3- niveau de la coupe d'un mamelon dont le méristème est toujours inclus dans les tissus de la tige.

Barre _____ 50 μ m.

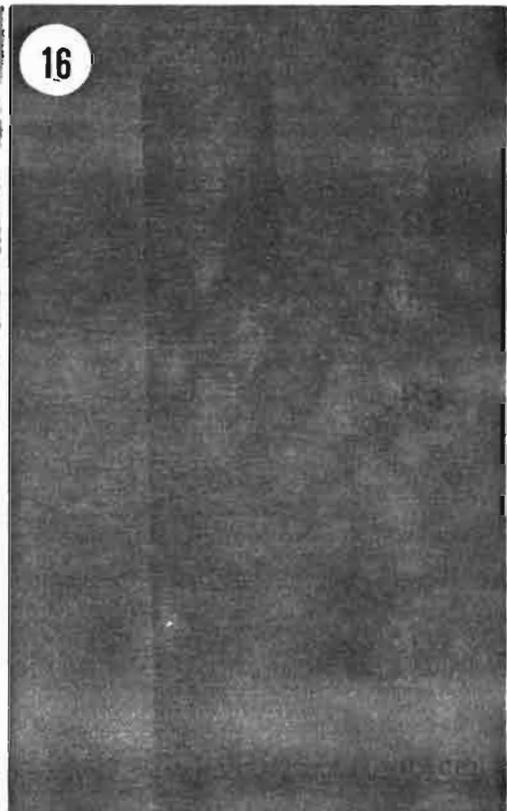
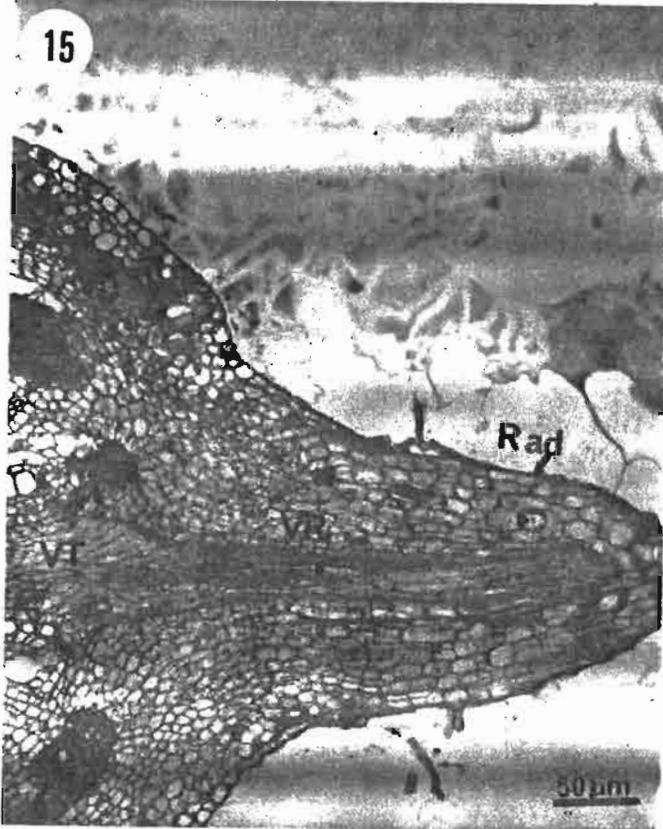
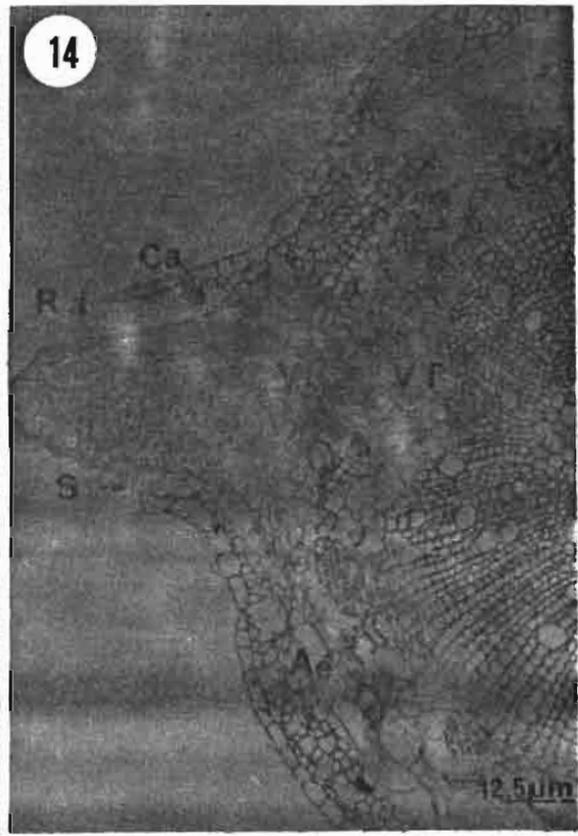
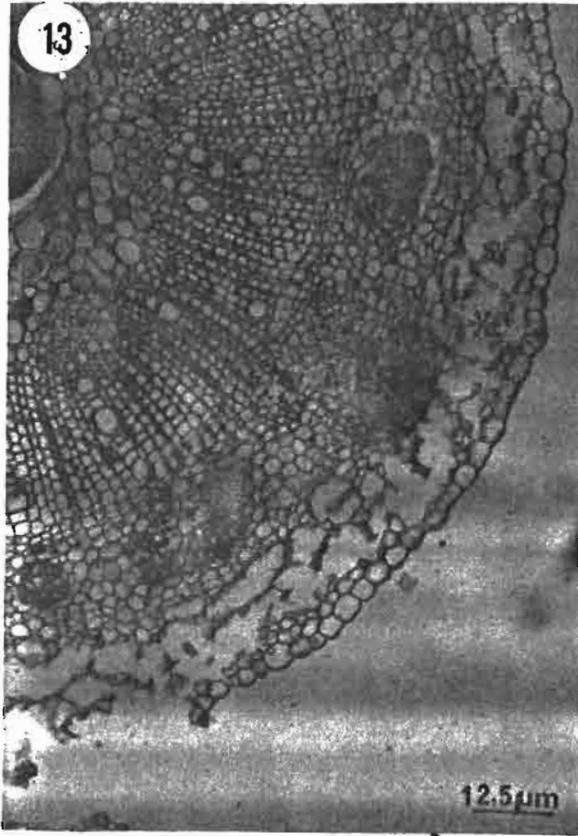


PLANCHE VII

(Etude de l'évolution des mamelons caulinaires en nodules) - nodulation expérimentale sur boutures chez *S. pubescens*.

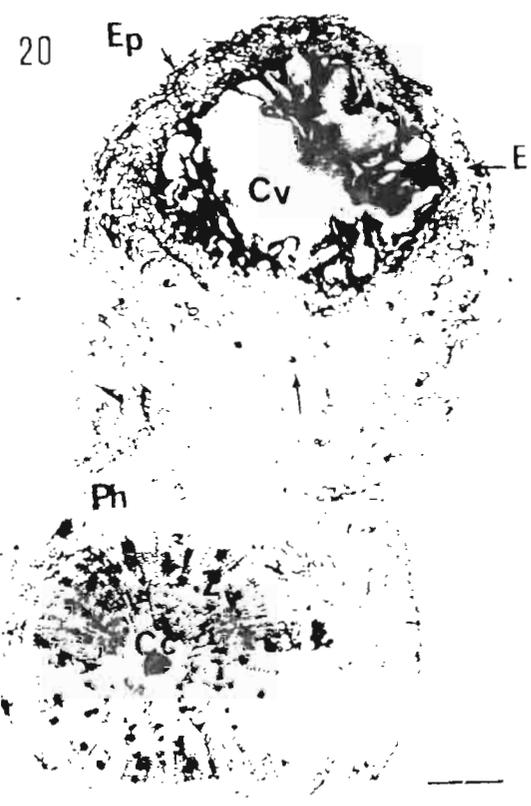
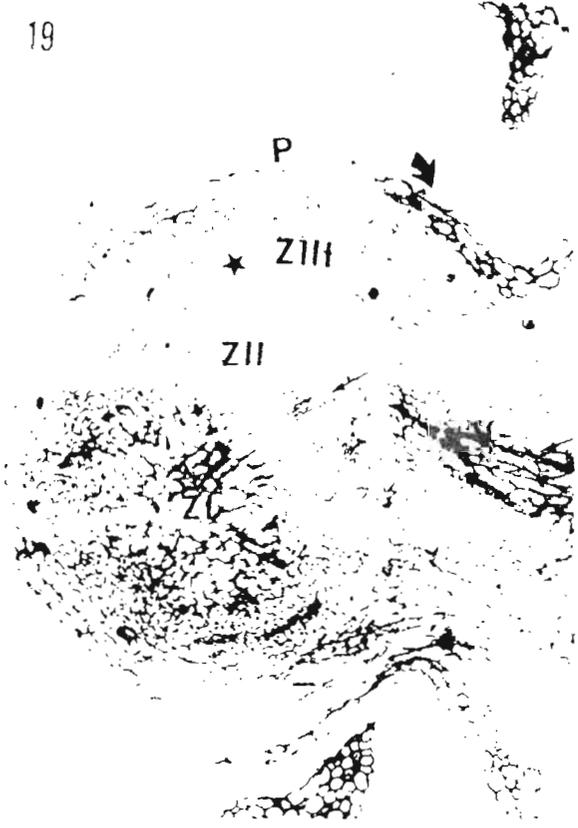
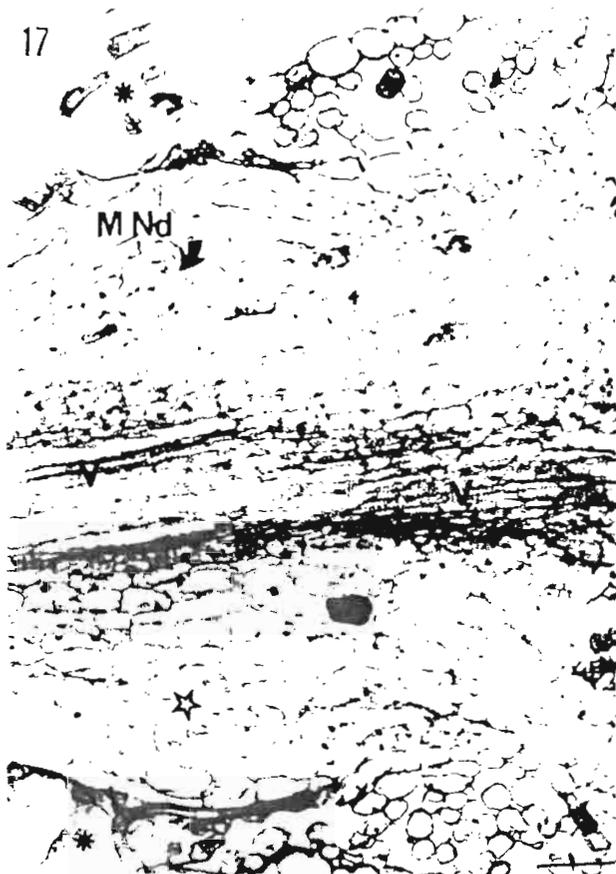
FIG. 17 : Cl des formations nodulaires présentées ci-dessus sur les tiges immergées 12 jours ; MNd, méristème nodulaire (astérisque) ; V, vascularisation) ; (*) Restes de l'épiderme de la tige.

FIG. 18 : Nodule mature de 19 jours chez *S. pubescens*.

FIG. 19 : Cl. et observation en MPh de nodule de 19 jours sur une bouture de *S. pubescens*. On peut distinguer : **Z I** : la zone bactéroïde centrale ; **Z II** : la zone méristématique composée des cellules envahies par les bactéries.

La flèche courbe indique ce que certains auteurs appellent les "poches" d'infiltration des bactéries.

FIG. 20 : Nodule sénescant de *S. pubescens* ; vue en Cl, le tissu nodulaire a disparu, il ne reste plus qu'une cavité.



Les résultats montrent qu'aucune des plantes du type sauvage classique ni des témoins n'a présenté de nodules.

Les observations ont montré que d'un point de vue "morphologique", les nodules formés ne sont identiques ni aux nodules caulinaires de *S. rostrata* ni aux "verrues" de *A. afraspera* (c'est ainsi que certains auteurs qualifient les nodules caulinaires des *Aeschynomene*). Ce sont des nodules plus allongés qui présentent une légère saillie au centre de la formation ; cette saillie pourrait être la pointe de la racine adventive ou être due aux conditions d'obtention de ces nodules. Cependant d'un point de vue de leur localisation sur la tige, ils sont tout à fait semblables aux nodules qui se forment sur les parties basses des tiges des *Aeschynomene* du groupe 3 (*A. elaphroxylon* G. & Perr.).

3.4.2. Etude de l'évolution en nodules sur les boutures de tiges immergées

i)- description morphologique de la nodulation

Les observations de la structure des nodules caulinaires au photomicroscope permettent de noter également que les nodules formés, dès leurs premiers stades restent enfouis sous l'aérenchyme ; ils ne deviennent très nettement visibles que 6 jours (voire au-delà) après les premiers stades de leur formation et de leur émergence.

D'un point de vue morphologique, les observations montrent qu'à leur apparition les nodules se présentent d'abord sous la forme d'un renflement à la base des racines adventives (Fig. 16).

Les coupes longitudinales de nodules sur racines présentées aux FIG. 17, 18 et 19 montrent les stades d'évolution des nodules.

Ces coupes de nodules présentent à la microscopie photonique :

- un épiderme (ou périderme) chlorophyllien
- une zone qui entoure le tissu central composée de nombreuses cellules méristématiques envahies par les bactéries ; c'est la zone bactéroïde. Elle est formée de tissu nodulaire dans le cas de nodule mature ; celui-ci présente trois zones essentielles de tissu nodulaire Z I, Z II et Z III) (FIG. 19).

- dans le cas des nodules sénescents, une cavité sans tissu (elle est remplie de colorant FIG. 20).

En résumé, les stades de l'évolution des nodules (ou ontogenèse des nodules) sont caractérisés successivement par

- le renflement constitué par un tissu méristématique que nous avons qualifié de nodulaire à la base de la racine adventive ; il correspond à la zone d'infection

- l'individualisation d'une zone bactéroïde totalement séparée de la zone corticale se distingue

- l'extension progressive du méristème de type nodulaire qui s'étend activement autour de la racine ; il est traversé par la vascularisation de la racine ; quelquefois ce tissu présente sa propre vascularisation qui se détache de celle de la racine.

Cette formation se précise et du 6^e au 12^e jour, selon les cas, un jeune nodule apparaît et s'individualise (voir les nodules aux divers stades de cette évolution).

Le nodule mature est obtenu au bout de 12 à 25 jours.

Certains nodules deviennent sénescents au bout d'un mois après leur formation (FIG. 20).

ii)- cinétique la nodulation caulinaire.

Le graphique 8 montre l'apparition des nodules sur les racines adventives au cours du temps. Cette apparition est très rapide à partir du 9^e jour. Elle donne une idée de l'évolution du phénomène de la nodulation.

3.4.3. Influence de la date d'inoculation sur la formation des nodules

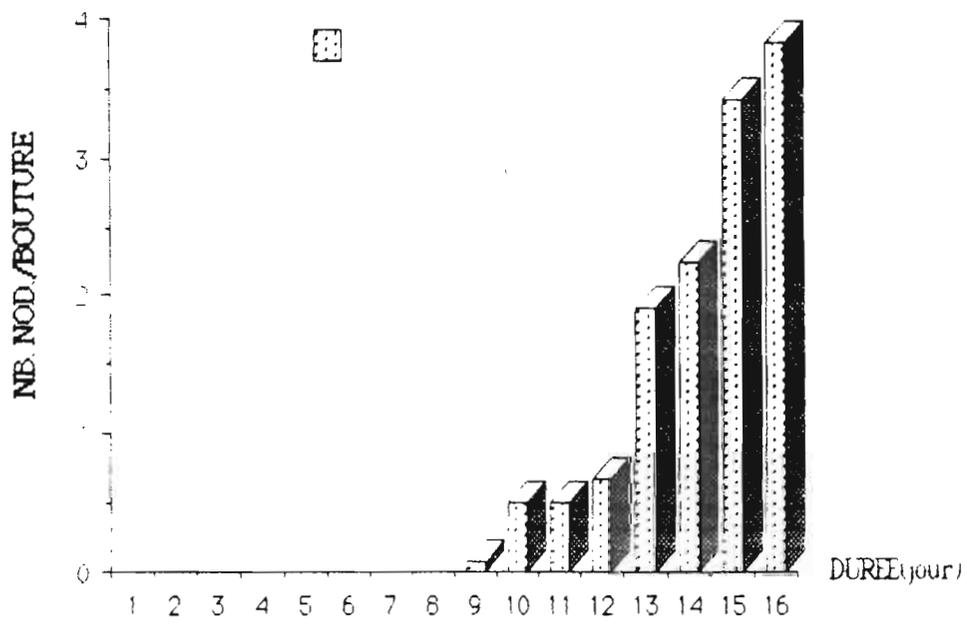
Au cours de l'émission des racines adventives à partir des mamelons caulinaires, quand celles-ci sont précocement mises en présence du *Rhizobium* spécifique par l'inoculation, certaines sont infectées et des nodules sont induits à l'aisselle des racines sur la tige.

Les résultats expérimentaux rapportés dans le graphique 9 montrent que le nombre de nodules formés varie en fonction de la date d'inoculation. Il est significativement plus élevé pour les inoculations précoces effectuées du jour d'inoculation jusqu'au 2^e jour après cette date.

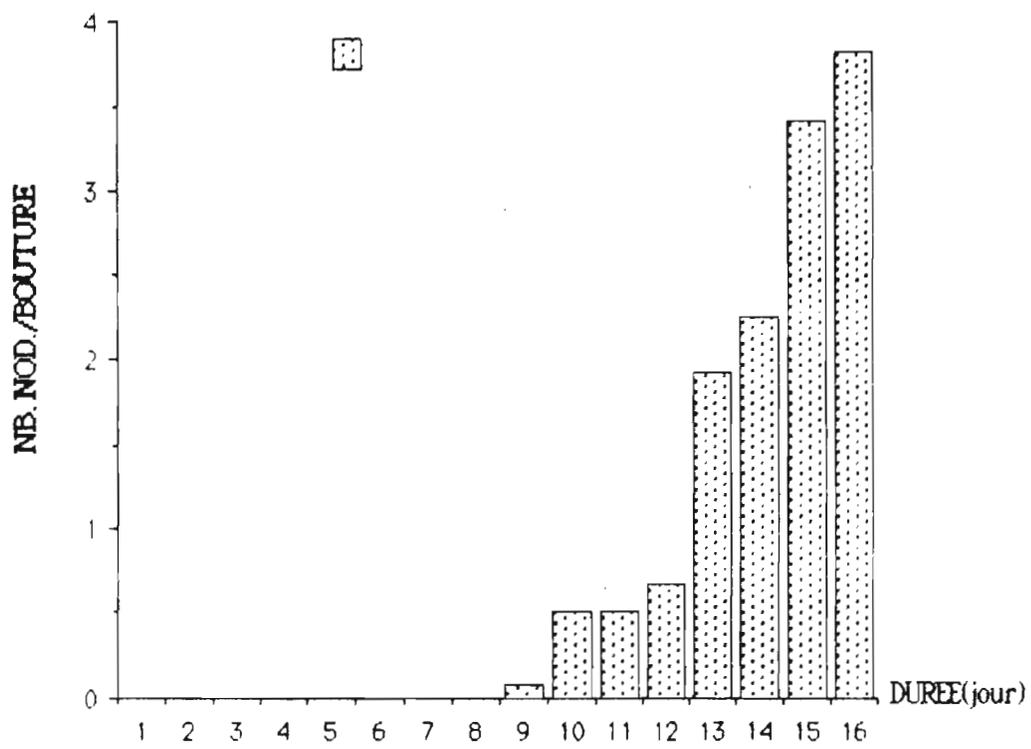
Par ailleurs nous avons quelquefois procédé à des réinoculations au 10^e jour afin d'apporter des bactéries plus vigoureuses dans le milieu compte tenu de l'émission tardive de certaines racines.

3.4.4. Influence du nombre de racines sur le nombre de nodules formés

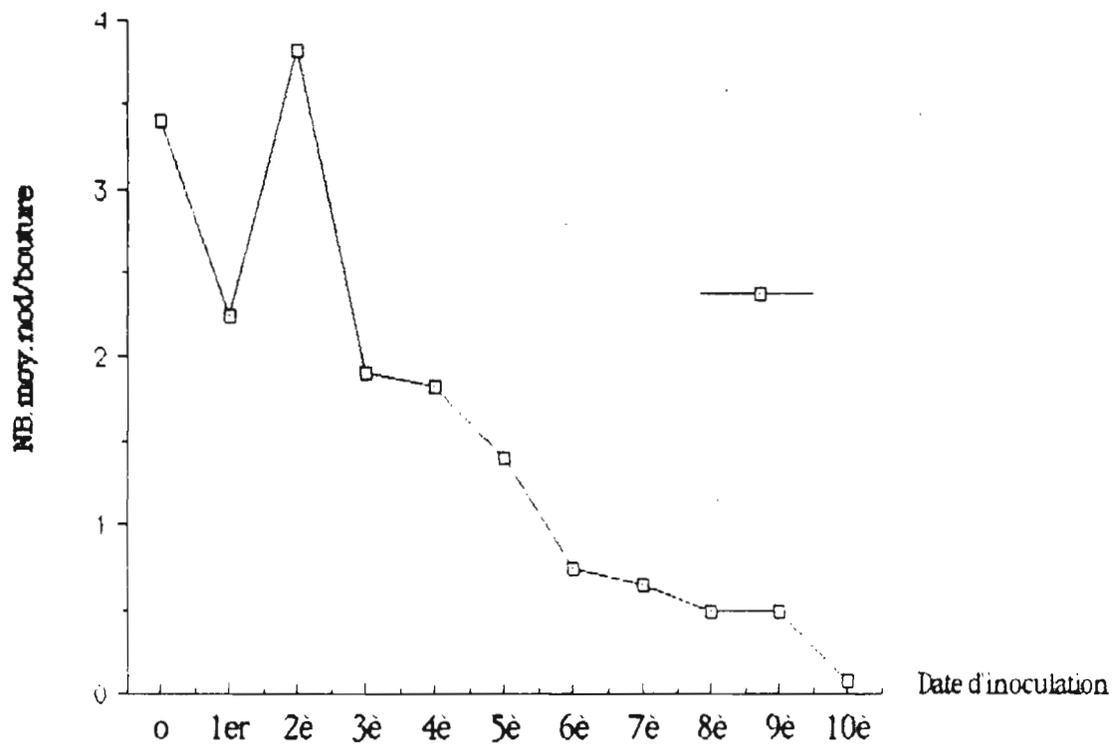
Les observations ont montré qu'à chaque nodule correspond une racine adventive. Il existe une certaine relation entre le nombre de nodules et le nombre des racines ; la rhizogenèse semble conditionner la nodulation qu'elle précède.



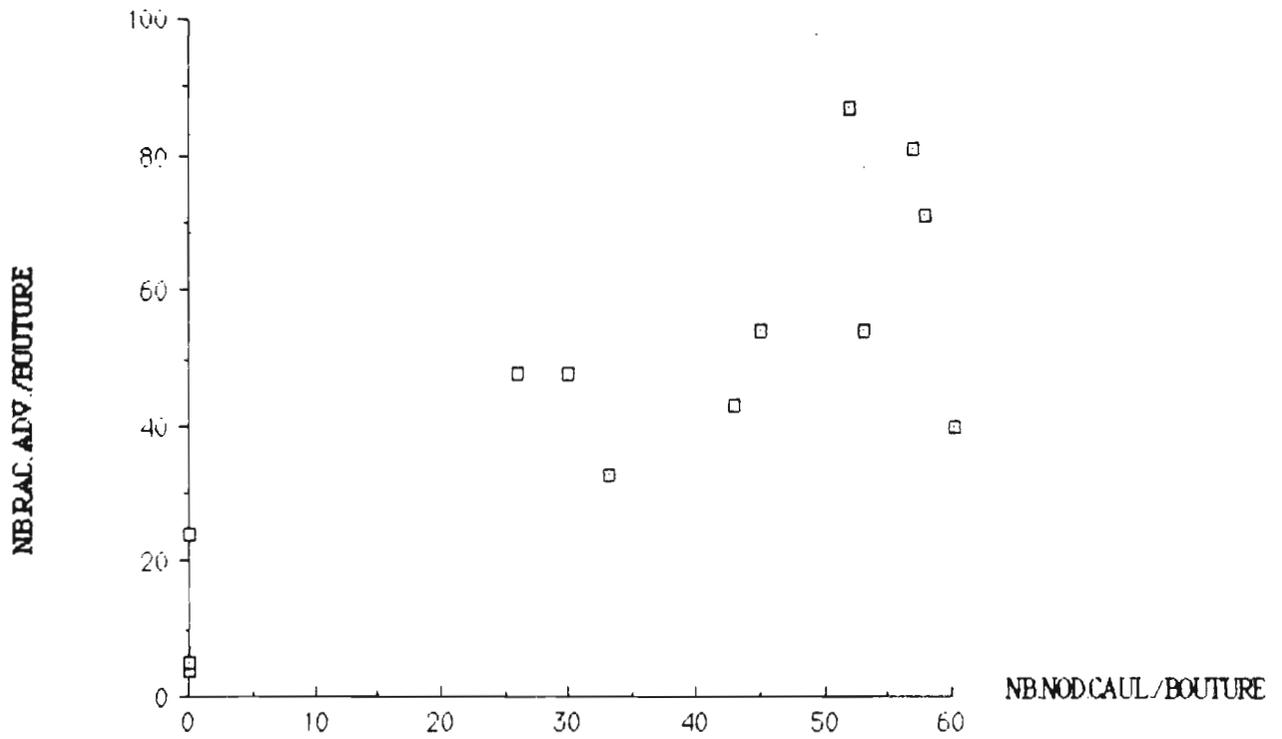
Graphique 8 : Nodulation caulinaire sur bouture chez *S. pubescens*



Graphique 8. Nodulation caulinaire sur bouture chez *S. pubescens*



GRAPHIQUE 9: Influence de la date d'inoculation sur la nodulation caulinaire sur boutures chez *S. pubescens*.



GRAPHIQUE 10 : Nombre de nodules caulinaire formés sur les racines adventives sur boutures chez *S. pubescens*
Date de relevé : 36 jours après l'immersion.

Le graphique **10** donne une représentation du nombre de nodules formés sur les racines adventives émises à l'issue de 36 jours d'observation. L'analyse statistique montre qu'il existe une corrélation positive (0,342) entre les variables nombre de racines et le nombre des nodules qui sont formés à partir des racines. Le coefficient de cette corrélation est de 0,714 (Dagnélie, 1975).

3.5. Les greffes:

Après les opérations de greffage, seul le procédé par approche a permis d'obtenir du succès ; pour la première série 5% de succès (*S. pubescens* / *S. rostrata*) et 15% de réussite des greffes de *S. rostrata* / *S. pubescens* sont observés à l'issue de toute la période d'observation.

Dans une seconde série, nous avons obtenu 95% de réussite (*S. pubescens* / *S. rostrata*) mais aucun effet notable pour l'amélioration de la nodulation de tige n'a été acquis après diverses tentatives de badigeonnage des sites observés sur les greffons par les souches de *S. pubescens* (ORS 52 , 53 , ORS P1 , ORS P2 , et ORS P4) et même avec la souche d'*Azorhizobium* (ORS 571).

3.6. DISCUSSION ET CONCLUSION

Les coupes cytologiques ont révélé que chez *S. pubescens*, les mamelons jusqu'au terme de leur développement, ne sont pas encore des sites qui peuvent être infectés pour donner des nodules (sites d'infection). Ce sont des sites potentiels de nodulation. Ils ne deviennent des sites d'infection qu'après l'immersion. Ce potentiel des sites n'est révélé qu'après le séjour dans l'eau qui aboutit, après 1 à 2 jours après l'immersion selon les cas, au stade de site accessible à l'infection externe par les bactéries.

Si jusqu'alors, l'espèce *S. pubescens* pourtant si affine de *S. rostrata*, n'avait pas encore retenue l'attention comme plante à nodules caulinaires, la raison principale est sans doute la discrétion de ses sites latents préformés.

Si sur une tige de *S. rostrata*, on peut distinguer quatre génératrices de sites en séries continues (Dreyfus et Duhoux, 1982), des sites en profusion chez *A. afraspera* (Alazard, 1985 ; Alazard et Duhoux, 1988), chez l'espèce *S. pubescens*, cette présentation diffère totalement non seulement par le nombre plus réduit de sites mais aussi des génératrices.

En outre, chez ces plantes, ces sites de nodulation peuvent se développer en nodules aériens sans intervention absolue de l'eau comme facteur externe pour assurer l'infection par les *Rhizobium* spécifiques, alors que chez *S. pubescens*, la présence de l'eau est indispensable.

En dehors de cette faible quantité des sites latents préformés, il faut noter également la nature même de ces sites latents. Cette différence essentielle liée à l'anatomie des sites a été révélée par l'étude cytologique en microscopie photonique. L'étude cytologique montre que le méristème racinaire des mamelons caulinaires de *S. pubescens* est beaucoup plus profond et plus discret que dans les sites de *S. rostrata* ou dans ceux de *A. afraspera*.

Rappelons que chez *A. afraspera* et *S. rostrata*, le site de nodulation est en fait constitué d'un dôme épidermique percé en son centre par une ébauche de racine (Alazard et Duhoux, 1988) ; (Duhoux, 1984 ; Spencer-Barreto *et al.*, 1989).

Chez *S. pubescens*, le mamelon caulaire type se caractérise par un dôme épidermique provoqué par l'ébauche de la racine ; mais nous n'avons pas observé jusqu'à ce jour de percée de la barrière épidermique par l'apex. Il subsiste toujours une couche de cellules épidermiques aplaties qui recouvrent l'apex de l'ébauche racinaire.

Ce type de site peut être rapproché de celui décrit chez *A. elaphroxylon*.

Nous pensons qu'il existe une similitude de structure entre la structure des mamelons caulinaires types de *S. pubescens* et celle des sites de nodulation des *Aeschynomene* du groupe 3 (*A. elaphroxylon*) issu de la classification des *Aeschynomene* en trois groupes définis à partir d'une étude de la cytologie des sites (Alazard, 1985 ; Alazard et Duhoux, 1988).

Une autre caractéristique essentielle des sites de nodulation chez *S. rostrata* et chez *A. afraspera* liée à la percée du dôme épidermique est la formation d'un sillon au-dessus de l'apex et la présence d'une cavité circulaire autour de la base de la racine.

Sillon et cavité circulaire autour de la base de la racine sont absents dans les structures des mamelons chez *S. pubescens*, alors que les études antérieures établissent une assez étroite relation entre l'accès par les *Rhizobium* (par la pénétration par cette cavité circulaire qui constitue le premier siège de l'infection externe) et la première colonisation des cellules du méristème de la racine par les bactéries (Duhoux, 1982 ; Tsien *et al.*, 1983).

Ces caractéristiques réunies de sites de nodulation chez *S. rostrata* permettent d'aboutir à la conclusion selon laquelle il existe un stade de compétence du site (il est qualifié de stade de site mature par les auteurs) au cours du développement pour permettre l'infection externe. Rappelons que l'infection chez *S. rostrata* peut être assurée par divers vecteurs qui ne sont pas absolument l'eau (Duhoux, 1984).

Les mamelons caulinaires de *S. pubescens* seraient donc, au terme de leur développement, inaptés à l'infection externe spontanée.

L'intervention de facteurs externes serait donc nécessaire pour conduire le site à un état accessible aux *Rhizobium* par la levée de la latence de l'ébauche racinaire et la formation d'un aerenchyme.

Ainsi sur des boutures, dès les deux premiers jours après l'immersion, certains sites donnent des racines adventives. Le stade de développement atteint par les sites de *S. pubescens* correspond alors à celui des sites compétents de *S. rostrata*, *A. afraspera* ou *A. indica* selon la localisation du site. L'émergence de la racine serait favorisée par la destruction de la barrière des tissus épidermiques et corticaux par l'eau.

Nous avons essayé d'établir une certaine analogie entre les événements qui surviennent au cours de l'immersion et le stade de compétence des sites de *S. rostrata* :

- l'immersion dans l'eau des sites provoque une brèche (déchirure de l'épiderme) qu'on peut assimiler au sillon observé sur le site compétent de *S. rostrata*

- la formation de l'aerenchyme correspondrait à la cavité circulaire autour de la racine. Elle joue le rôle d'un microenvironnement écologique favorable à l'infection externe.

La rupture consécutive à la poussée exercée par le méristème racinaire en évolution à laquelle on peut ajouter l'action de ramollissement des cellules épidermiques par l'eau, peuvent être considérées comme la conjonction de mécanismes physique et chimique.

L'action de l'eau provoquerait une turgescence des cellules épidermiques des assises du phloème notamment ; dans la formation de l'aerenchyme et l'ensemble des processus conduisant à la formation des racines adventives sur les boutures, un gaz, l'éthylène est probablement impliqué et jouerait un rôle très important.

Ainsi, Clemens *et al.*, 1978 notent outre la rupture de l'épiderme de la tige sur les boutures, l'apparition de l'aerenchyme sur les 5-10 cm de la base des boutures d'*Eucalyptus* ; cette formation précède de 2 à 3 jours l'apparition des racines adventives dans les conditions d'immersion ; il s'agirait selon les auteurs, d'une réaction adaptative aux conditions de la submersion du sol (Feldman, 1984 ; Liu, *et al.*, 1990).

Les différentes méthodes utilisées pour mettre en évidence les aspects de la rhizogénèse adventive ont abouti à l'observation suivante : l'évolution et le développement des ébauches pour donner des racines adventives sont sous l'influence de facteurs bien définis (facteurs de l'environnement) qui doivent jouer le rôle très important pour assurer l'évolution des ébauches racinaires depuis les études de Harris *et al.*, 1949, cités par Allen et Allen, 1981. Ces facteurs comme ils ont été signalés, sont endogènes (cytologiques) et exogènes (physiques et/ou chimiques) (Clemens *et al.*, 1978 ; Liu, *et al.*, 1990).

Il a été démontré que dans des cas exceptionnels, une assez forte humidité atmosphérique suffit à induire cette évolution chez *S. rostrata* (Spencer-Barreto, 1987). Ce phénomène est également observé chez les plantes du genre *Ficus* et chez les Rhizophoracées (plantes des mangroves).

Un tel phénomène n'a pas été observé chez *S. pubescens* pendant la période de cette étude.

Certains mamelons, en effet qu'ils soient les plus basaux ou les plus apicaux, sont peu développés ; à ce stade de l'évolution des mamelons, ceux-ci sont très peu perceptibles car le méristème racinaire sous-jacent est très profond ; c'est ce que l'étude cytologique nous a révélé.

Ainsi, plus la structure de la racine est profonde, plus le temps de contact avec l'eau devra être long pour assurer la destruction de la barrière histologique .

Une étroite corrélation entre le facteur externe primordial de l'induction qu'est l'eau et les structures histologiques de l'ébauche racinaire peut être établie.

En effet, l'action d'induction de l'eau serait le déclenchement d'une activation des cellules méristématiques qui aboutit à la formation et l'émergence de la racine adventive. La racine, dans le processus de l'induction de la nodulation, produirait des exudats qui favorisent l'infection par les *Rhizobium* spécifiques. Cette induction est facilitée en milieu aqueux.

Ainsi, quelques 2 à 3 jours après l'inoculation, chez *A. afraspera* un signal chimique est émis par la plante (racine de la plante) qui diffuse dans la rhizosphère et constitue l'interaction plante-*Rhizobium* qui induit la formation des nodules chez les légumineuses tempérées (Truchet *et al.*, 1980 ; Vasse, *et al.*, 1990).

Le mode d'infection des mamelons caulinaires et la formation des nodules chez *S. pubescens* semblent impliquer le passage par le développement de ceux-ci en racines adventives d'abord, puis en nodules ensuite.

L'hypothèse la plus vraisemblable semble qu'il y ait au moins un début de l'évolution de l'ébauche racinaire pour faciliter l'infection dans certaines conditions d'immersion.

Quant à l'induction des nodules sur les racines, même dans les meilleures conditions d'inoculation et d'infection, il existe toujours plus de racines que de nodules. Autrement dit, il ne peut pas y avoir une infection de toutes les racines émises pour donner des nodules.

Il est donc impossible d'obtenir une stricte relation de proportionnalité (rapport de 1/1) entre le nombre de nodules formés et celui des racines émises, bien que les deux phénomènes soient intimement liés. Une faible quantité de mamelons qui suppose un nombre tout aussi peu élevé de racines adventives peut conduire, dans les cas d'une faible induction, à un très faible nombre de nodules caulinaires.

Par contre nous pensons que l'intervention d'autres paramètres tels que la date d'inoculation, l'effet de la souche inoculée et la qualité de l'inoculum, pourraient modifier très sensiblement cette donnée.

Nous pensons que l'hypothèse de l'inclusion du méristème de racine sous l'épiderme peut être retenue. Elle pourrait être une des explications de la difficulté chez cette espèce, du mode de nodulation après infection externe par les *Rhizobium* telle que celle qui est caractéristique de *S. rostrata* ou de *A. afraspera*.

Il faut signaler qu'une véritable cinétique de la rhizogenèse adventive ou de la nodulation caulinaire suppose des dispositifs spéciaux, un suivi sur un même échantillon (ou des clones), à la limite sur une même racine en émission ou un nodule lors de sa formation.

Des études ultérieures de l'ultrastructure pourraient permettre de préciser les détails des stades de la formation des nodules et de comprendre l'organogenèse et la morphogenèse des nodules.

Ce sont deux phénomènes physiologiques très difficilement saisissables dans le cadre de ce seul travail ; toutes les illustrations qui sont données ici ne sont que des clichés instantannés de processus qui évoluent continuellement dans le temps.

Le travail que nous avons effectué ne constitue donc qu'une approche et ouvre des voies pour l'étude de bien d'autres aspects sur cette plante.

Nous pensons que les résultats obtenus à partir des opérations de greffage ne peuvent pas donner lieu à des interprétations immédiates ; pour des influences physiologiques il serait très prématuré d'attendre des résultats aussi immédiats de ces greffes. Cependant beaucoup d'espoirs sont placés dans les résultats ultérieurs qu'elles pourraient fournir.

A partir des graines issues des plantes des greffes, nous comptons obtenir des plantes qui présentent les caractéristiques de nodulation de *S. rostrata* chez *S. pubescens*.

BIBLIOGRAPHIE

1. **ALAZARD, D.** 1985. Stem & root nodulation in *Aeschynomene* spp.. Appli. Environ. Microbiol. **50**: 732-734.
2. **ALAZARD, D.** 1990. Nitrogen fixation in pure cultures by rhizobia isolated from stem of tropical *Aeschynomene* species. FEMS Microbiol. Lett. **68**: 177-182.
3. **ALAZARD, D., and DUHOUX, E.** 1987. Nitrogen-fixing stem nodules on *Aeschynomene afraspera*, Biol. Fert. Soil **4**: 61-66.
4. **ALAZARD, D., and DUHOUX, E.** 1988. Diversity of stem nodulation sites in *Aeschynomene* spp. J. Plant Physiol. **132**: 123-125.
5. **ALAZARD, D., and DUHOUX, E.** 1990. Devolpment of stem nodules in a tropical forage *Aeschynomene afraspera*. Journal of Experimental Botany **41**: 1199-1206.
6. **ALLEN, O.N., and ALLEN, E.K.** 1981. The Leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation, University of Wisconsin Press, Madison, 812p.
7. **BECKER, M., ALAZARD, D., and OTTOW, J.C.G.** 1986. Mineral effect on nodulation and nitrogen fixation of the stem nodulating legume *Aeschynomene afraspera*. Z. Pflanzenereahr. Bodenk. , **149**: 485-491.
8. **BERHAUT, J.** 1976. Flore illustrée du Sénégal, Tome IV, Légumineuses papilionacées, Edité par Gouvern du Sénégal, p 517.
9. **CHAMPAGNAT, P., OZENDA, P., and BAILLAUD, L.** 1969. Biologie Végétale, Croissance, Morphogenèse, Reproduction, TomeIII Masson et C^{ie} Editeurs Paris. pp 330-331.
10. **CLEMENS, J., KIRK, A.M., and MILLS, P.D.** 1978. The resistance to waterlogging of three *Eucalyptus* species. Effect of waterlogging and an ethylen-releasing. growth substance on *E. robusta*, *E. grandis* and *E. saligna*. Oecologia (Berlin) **34**: 125-131.
11. **CORNET, F., OTTO, C., RINAUDO, G., DIEM, H.G., and DOMMERGUES, Y.R.,** 1985. Nitrogen fixation by *Acacia holosericea* grown in field conditions. Acta Oecolog. **6**:211-218.

12. **DAGNELIE, P.** 1975. Analyse statistique à plusieurs variables. Les Presses Agronomiques de Gembloux p 362.
13. **DREYFUS, B.** 1982. La symbiose entre *Rhizobium* et *Sesbania rostrata*, légumineuse à nodules caulinaires. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Paris VII.
14. **DREYFUS, B., and DOMMERGUES, Y.R.** 1980. Non inhibition de la fixation d'azote atmosphérique chez une légumineuse à nodules caulinaires, *Sesbania rostrata* CR Acad Sci **291**: 767-770.
15. **DREYFUS, B., and DOMMERGUES, Y.R.** 1981a. Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata* FEMS Microbiol Lett **10**: 313- 317.
16. **DREYFUS, B., and DOMMERGUES, Y.R.** 1981b. Stem nodules on a tropical forage *Sesbania rostrata*. In Current perspectives in nitrogen fixation. AH Gibson, ed Australian Academy of Science, Canberra Australia, 615p.
17. **DREYFUS, B., ELMERICH, C., and DOMMERGUES, Y.R.** 1983. Free living *Rhizobium* strain to grow under N₂ as the sole nitrogen source Appli Environ Microbiol 45: 711- 713.
18. **DREYFUS, B., GARCIA, J.L., and GILLIS, M.** 1988. Characterisation of *Azorhizobium caulinodans* gen nov. sp. nov., a stem nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Int.J. Syst. Bacteriol. **38**: 89-98.
19. **DREYFUS, B., RINAUDO, G., and DOMMERGUES, Y.R.** 1985. Observation on the use of *Sesbania rostrata* as green manure in paddy fields. Mircen Journal **1**: 111-121.
20. **DUHOUX, E.** 1984. Ontogenèse des nodules caulinaires chez *Sesbania rostrata* (Légumineuses). Can. J. Bot. **62**: 982-994.
21. **DUHOUX, E., et DREYFUS, B.** 1982. Nature des sites d'infection par *Rhizobium* de la tige de la légumineuse, *Sesbania rostrata*, Brem C.R. Acad. Sc. Paris, t **294**:407-4011.
22. **EVANS, D.O.** 1988. What is *Sesbania*? Botany, Taxonomy, Plant geography, and natural history of the perennial members of the genus. In Perennial *Sesbania* species in Agroforestry Systems. ICRAF:NTFA, Special Publication 90/91 Nairobi Kenya, pp 5-19.

23. **EAGLESHAM, A.R.J., and SZALAY, A.A.** 1983. Aerial stem nodules on *Aeschynomene* spp. *Plant Sci Lett* **29**: 265-272.
24. **FELDMAN, L.J.L.** 1984. Regulation of root development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**: 223-242.
25. **FYSON, A., and SPRENT, J.I.** 1980. A light and scanning electron microscope study of stem nodules in *Vicia faba* L. *J. Exp. Bot.* **31**: 1101-1106.
26. **GABE, M.** 1968. *Techniques cytologiques* Masson et C^e édition Paris, 1113p.
27. **GAUTHIER, D.L., DIEM, H.G., DOMMERGUES, Y.R., and GANRY, F.** 1985. Assesment of N₂ fixation by *Casuarina equisetifolia* inoculated with *Frankia* ORS 21001 using ¹⁵N methods. *Soil Biol Biochem* **17**: 371-379.
28. **GIBSON, A.H.,** 1963. In *Manuel of pratical study of root nodules bacteria.* IBH Handbook n°15 Blackwell Sci. Publications. London.
29. **HARDY, R.W.F., HOLSTEN, R.D., and BURNS, R.C.** 1968. The acetylene-ethylene assay for N-fixation : Laboratory and field evaluation. *Plant Physiol* **43**: 1185-1207.
30. **LADHA, J.K., WATANABE, I., and SAONO, S.** 1988. Nitrogen fixation by Leguminous green manure and practices for its enhancement in tropical lowland rice. IRRI, Green manure in rice farming. *In* Proceeding of a symposium on sustainable agriculture pp 165-183.
31. **LEGOCKY, R.P., and SZALAY, A.A.** 1983. Molecular biology of stem nodulation. *In* Proceeding of the first international symposium on molecular genetics of the bacteria-plant interaction. A Puhler, ed Springer-Verlag Berlin, pp 255-268..
32. **LISON, L.** 1960. *Histochimie et cytologie animale. Principes et Méthodes* Gauthiers-Villars, Paris 842p.

33. **LISON, L.** 1968. Statistique appliquée à la Biologie Expérimentale, La Planification de l'expérience et l'analyse des résidus. Gauthiers-Villars. Paris.
34. **LIU, J., MUKHERJEE, I., and REID, D.M.** 1990. Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. III. The role of ethylene. *Physiol. Plant.* **78**: 268-276.
35. **NDOYE, I.** 1990. Contribution à l'étude de la symbiose entre *Azorhizobium*, *Rhizobium* et *Sesbania rostrata*. Thèse de Doctorat d'Université Spécialité: Microbiologie, Université des Sciences et Techniques de Lille p170.
36. **NDOYE, I., and DREYFUS, B.** 1988 N₂ Fixation by *Sesbania rostrata* and *Sesbania sesban* using ¹⁵N and total N difference methods *Soil Biol. Biochem.* **20**: 209-213.
37. **PRIN, Y., DUHOUX, E., DIEM, H.G., and DOMMERGUES, Y.R.** 1991. Aerial nodulation in *Casuarina cunninghamiana* *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 871-874.
38. **RINAUDO, G., and MONDIOUGUI, A.** 1985. Fixation de l'azote par *Sesbania rostrata* : son utilisation comme engrais vert. *Bull. Rev. Agro. Gembloux.*
39. **SANGINGA, N., DANSO, S.K.A., ZAPATA, F., and BOWEN, G.D.** 1990. Influence of reference trees on N₂-fixation estimates in *Leuceana leucocephala* and *Acacia albida* using ¹⁵N-labelling techniques. *Biol. Fertil. Soil.* **9**:341-346.
40. **SASAKAWA, H.** 1990. Influence of environmental factors on stem nodulation in *Aeschynomene indica*. *Soil Sci. Plant Nutr.* **36**: 159-162.
41. **SASAKAWA, H., TRUNG, B.C., and YOSHIDA, S.** 1986. Stem nodulation on *Aeschynomene indica* plants by isolated rhizobia. *Soil Sci. Plant Nutr.* **32**: 140-149.
42. **SOUGOUFARA, B., DANSO, S.K.A., DIEM, H.G., and DOMMERGUES, Y.R.** 1990. Estimating N₂ fixation and N derived from soil by *Casuarina equisetifolia* using ¹⁵N fertilizer: Some problems and solutions. *Soil Biol Biochem* **22**: 695-701.

- 43. SPENCER-BARRETO, M.M.** 1987. Plasticité Morphogénétique des ébauches racinaires adventives préformées sur la tige de *Sesbania rostrata* Brem (Leguminosae). Thèse de 3è cycle Faculté des Sciences Université Cheikh Anta DIOP Dakar p134.
- 44. SPENCER-BARRETO, M.M., GAGNAIRE, J., PLEBIN, R., BEAUDOING, G., et DUHOUX, E.** 1988. Les mamelons caulinares de *Sesbania rostrata* Brem: développement en racines adventives et role dans l'absorption minérale. *Acta Oecologica Oecol. Plant.* , **10**: 411-42.
- 45. TSIEN, H.C., DREYFUS, B., and SCHMIDT, E.L.** 1983. Initial stages in the morphogenesis of nitrogen-fixing stem nodules of *Sesbania rostrata*. *J. Bacteriol.* **156**: 888-897.
- 46. VASSE, J., DE BILLIS, F., CAMUT, S., and TRUCHET, G.** 1990. Correlation between ultratstructure differentiation of bacteroids and nitrogen-fixation in *Alfalfa* nodules. *Journal of Bacteriology.* **172**: 4295-4306.
- 47. VINCENT, J.M.** 1970. A manual for the Practical Study of Root-nodules-Bacteria. Blackwell, Oxford.
- 48. WALTER, C.A., and BIEN, A.** 1989. Aerial nodules in the tropical legume *Pentaclethra macroloba*. *Oecologia (Berlin)* **80**: 27-31.
- 49. YATAZAWA, M., HAMBALI, G., and WIRIADINATA, H.** 1987. Nitrogen-fixing nodules and stem-warts of tropical plants. *Biotropica Spec Publ* **31**: 191-205.
- 50. YATAZAWA, M., and YOSHIDA, S.** 1979. Stem nodules in *Aeschynomene indica* and their capacity of nitrogen fixation. *Plant Physiol* **45**: 293-295.
- 51. YATAZAWA, M., YOSHIDA, S., and MAEDA, E.** 1984. Fine structure of root nodules of *Aeschynomene indica* L. *Soil and Plant Nutrition* **30**: 405-412.
- 52. YOSHIDA, S.** 1982. Nitrogen fixation of *Aeschynomene indica* under upland and submerged conditions. *Jpn J. Trop. Agric.* , **26**: 74-79. (in Japanese with summery in English).
- 53. YOSHIDA, S., SASAKAWA, H., and TRUNG, B.C.** 1985. A comment on the nodulation of *Aeschynomene indica* plant. *Jpn J. Trop. Agric.* **29**: 218-220. (in Japanese with summury in English).

Annexes

Aeschynomene afraspera J. Léon.
A. elaphroxylon G.&Perr.
A. indica L.
Arachis hypogea L.
Casuarina cunninghamiana
C. equisetifolia Forst.
C. glauca
Pentaclethra macroloba
Neptunia oleracea L.
Sesbania grandifolia L.
S. pubescens DC.
S. rostrata Brem.
S. sesban L. Merrill.
Vicia faba L.

Titre du Mémoire de DEA : "Contribution à l'étude de la nodulation de tige par *RHIZOBIUM* chez une Légumineuse aquatique : *SESBANIA PUBESCENS* DC."

Résumé

Dans le genre *Sesbania*, la présence de sites préformés et le phénomène de nodulation caulinaire n'étaient jusque là connus que chez l'espèce *S. rostrata*. Les premières observations n'ont pas permis de déceler une nodulation caulinaire spontanée chez *S. pubescens*. Cette plante présente toutefois des sites caulinaires préformés nettement visibles surtout à l'aisselle des feuilles. Dans les conditions d'inondation (naturelles ou expérimentales), la formation de nodules caulinaires a été obtenue. De même, l'inoculation après grattage superficiel de l'épiderme des mamelons caulinaires ou l'injection sous épidermique a conduit à la formation de nodules en chambre de culture.

Nous avons isolé et étudié l'infectivité et l'effectivité de souches de *Rhizobium* issues de nodules de racines et de tiges.

Une étude cytologique par des techniques de microscopie photonique et électronique à balayage a permis de préciser la structure et la nature des sites de *S. pubescens*. Cette structure est caractérisée par la présence systématique de cellules épidermiques recouvrant l'ébauche de la racine alors que chez *S. rostrata* et chez *Aeschynomene afraspera*, ces sites de nodulation présentent une racine qui fait extrusion des tissus épidermiques de la tige. Cette étude nous a permis de suggérer que les sites de nodulation observés chez *S. pubescens* ne sont pas des "sites compétents pour l'infection externe" par les *Rhizobium*.

Mots-clés : Fixation symbiotique de l'azote - *Rhizobium*, *S. pubescens* - Mamelons caulinaires - Structure cytologique - Nodulation caulinaire expérimentale.