

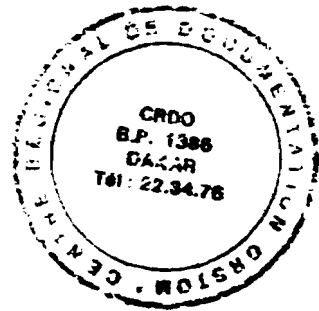
K. P. ...

Bibliothèque

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
ET TECHNIQUE OUTRE-MER

Laboratoire de Microbiologie des Sols ORSTOM, DAKAR

1983



ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE RHIZOBIUM TROPICAUX
NODULANT LA LUZERNE (*Medicago sativa*)

SOI < HOS

KAMMOUN Sadok
Elève 2ème année ORSTOM
Section: Microbiologie des Sols

EB30
KAM

FBI 01000 5547

I. INTRODUCTION

D'après les estimations des Nations Unies, la population mondiale qui était en 1980 de 4,4 milliards, s'accroît exponentiellement au taux de 1,9%, mais l'augmentation de la production ne suit pas le rythme de l'accroissement de la population.

L'apport protéique dans l'alimentation humaine est fait essentiellement avec les protéines d'origine animale. Le déficit protéique qui atteint les pays du Tiers Monde risque d'être considérablement aggravé par une crise alimentaire.

La demande en protéine va s'accroître, non seulement en raison de la poussée démographique mais aussi de l'évolution du niveau de vie des populations.

L'azote est un élément essentiel des protéines, afin d'augmenter les ressources en protéines animales, les besoins en fourrages riches en azote sont de plus en plus importants. Les légumineuses fourragères constituent un aliment riche en azote grâce à la fixation de l'azote atmosphérique.

En association avec les légumineuses, les procaryotes sont capables de réduire l'azote moléculaire en ammoniac disponible à la synthèse de protéines végétales puis animales. De point de vue écologique, la fixation biologique de l'azote est un phénomène important qui représente environ $175 \cdot 10^6$ t d'azote fixé par an. Les légumineuses en symbiose avec les Rhizobium constituent le système le plus efficace.

La symbiose Rhizobium-légumineuse représente une fixation annuelle de 15 à 35 10^6 t (HARDY, 1975), les engrais azotés comme l'ammoniac ou les nitrates peuvent être synthétisés par voie industrielle - la méthode la plus répandue est le procédé Haber qui consiste à synthétiser de l'ammoniac à partir d'azote moléculaire et d'hydrogène, ceci à haute température et à haute pression - l'hydrogène utilisé étant un sous-produit du pétrole,

l'azote produit par le procédé industriel et destiné à la fertilisation des sols exige un capital important puisque le coût de l'énergie n'a cessé d'augmenter, approximativement 16 hl de gaz naturel est consommé pour produire 1 kg d'azote (ammonium anhydre).

La production de produits agricoles est possible sans apport d'azote, ceci grâce à la fixation de l'azote atmosphérique par les légumineuses utilisées en rotation avec les céréales.

Trois groupes de bactéries sont capables d'établir une association symbiotique avec des organismes photosynthétiques: les actinomycètes formant des nodules radiculaires chez les Dicotylédones (19 genres connues), les Cyanobactéries avec des hôtes très variés (par exemple Anabaena-azolla) et les bactéries du genre Rhizobium qui forment des nodosités sur le système racinaire de nombreuses légumineuses.

Selon la vitesse de croissance des Rhizobium on distingue deux groupes de Rhizobium: Rhizobium à croissance rapide, groupe "R. leguminosarum, R. trifolii, R. phaseoli", groupe "R. meliloti, certains R. tropicaux (ex.: Sesbania, Acacia) et Rhizobium à croissance lente, groupe "R. cow-pea", groupe "R. japonicum et R. lupini" (Dommergues, 1983).

Il existe une certaine spécificité entre les souches de Rhizobium et les légumineuses hôtes pour la formation des nodosités, ce qui a permis de constituer de groupes d'inoculation croisée pour les légumineuses et définir des espèces de Rhizobium correspondantes.

Six groupes d'inoculation croisée ont été définis:

R. leguminosarum, R. trifolii, R. phaseoli, R. meliloti, R. lupini et R. japonicum, et Rhizobium du groupe Vigna (Dénarié et Truchet, 1979).

L'énergie nécessaire à la formation et au fonctionnement des nodosités est fournie par la photosynthèse. Le produit majeur transporté des feuilles vers les nodules par le phloème est le saccharose (Dénarié et Truchet, 1978), l'ammonium produit par la bactérie se combine au carbone (produit de la photosynthèse) pour donner des aminoacides puis des protéines.

Le complexe enzymatique capable de réaliser la réduction de l'azote moléculaire chez tous les systèmes biologiques s'appelle la nitrogénase- c'est un complexe enzymatique formé de deux protéines distinctes - toutes les nitrogénases connues ont la même structure - la protéine I, appelée molybdoferredoxine est un tétramère formé de deux types de protomères. La protéine II, appelée azoferredoxine, est un dimère formé d'un seul type de protomère.

Une source de protons, d'électrons, d'énergie et un environnement strictement anaérobie sont nécessaires pour le fonctionnement de la nitrogénase. Cependant les organismes aérobies qui fixent l'azote atmosphérique ont développé des mécanismes physiologiques élaborés pour maintenir les conditions nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase; la leghémoglobine dont le rôle est d'approvisionner les bactéroïdes en oxygène. c'est une homoprotéine détectée dans les nodules de légumineuses, la partie protéine est contrôlée génétiquement par l'hôte alors que l'hème du pigment semble être synthétisé par Rhizobium.

Après infection des poils absorbants, il y a formation et progression de cordons d'infection puis libération des bactéries hors des cordons d'infection, multiplication des bactéries dans les cellules de l'hôte et différenciation des bactéries en bactéroïdes fixatrices d'azote.

La reconnaissance spécifique de l'hôte par le Rhizobium semble intervenir à un stade très précoce; une glycoprotéine de l'hôte, une lectine, jouerait un rôle dans cette liaison spécifique (Dénarié et Truchet, 1979).

Notre travail a porté sur l'isolement et l'étude de souches de Rhizobium tropicaux se développant en symbiose avec la luzerne.

II. MATERIELS ET METHODES

1. Isolement des souches de Rhizobium tropicaux formant des nodules chez la luzerne (Medicago sativa)

1.1. Milieu d'isolement ou de culture

Le milieu d'isolement utilisé est le milieu Yeast-Extract-Mannitol (YEM) (Vincent, 1970): la composition de milieu est la suivante : g/l

Mannitol: 10; Glutamate de Na: 0,5; K_2HPO_4 : 0,5; Extrait de levure: 1; NaCl: 0,5ml d'une solution NaCl 2M; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ à 10%: 10 ml; $CaCl_2$ à 14 g/l: 1 ml; $FeCl_3$ à 4 g/l: 1ml; pH: 6,8 ajusté avec HCl N/10; le milieu gélosé est réalisé à partir du milieu précédent avec ajout d'agar à la concentration de 20 g/l.

1.2. Technique d'isolement

L'isolement a été réalisé à partir des nodules prélevés des racines de luzerne plantées dans la terre du Centre ORSTOM Bel-Air, Dakar, Sénégal (les graines ont été préalablement stérilisées et prégermées).

Deux techniques d'isolement peuvent être utilisées: la première consiste à stériliser superficiellement les nodules; on verse une solution d' $HgCl_2$ à 0,1%, 5mn après on élimine l' $HgCl_2$ et on lave les nodules 5 à 6 fois avec de l'eau stérile puis à l'aide d'une tige de verre préalablement trempée dans l'alcool et flambée On broie les nodules placés dans 3 ml d'eau stérile.

A l'aide de pipette pasteur stérile, on place une goutte du liquide ou d'une suspension diluée du surnageant dans une boîte de Petri YEM et on étale aseptiquement les gouttes avec un étaloir.

La deuxième technique consiste à casser les nodules en deux et à piquer le centre du nodule à l'aide d'un filament de platine puis à ensemercer des boîtes de Petri.

La deuxième technique a l'avantage par rapport à la première de permettre une purification beaucoup plus rapide et c'est la méthode qu'on a utilisée.

1.3. Conservation des souches

Les souches ainsi purifiées sont conservées soit pour de courtes périodes à + 4°C sur tube de gélose incliné soit congelées à - 80°C dans 50% de glycérol dans des tubes "vacutainer" stérile (1ml culture + 1ml glycérol).

2. Culture des plantes

2.1. Stérilisation et germination des graines

Les graines de luzerne sont lavées dans l'éthanol à 95% puis sont placées dans HgCl₂ 0,1%. Trois minutes après on les lave 5 fois avec de l'eau stérile et au dernier rinçage on les laisse gonfler dans l'eau stérile pendant une heure. Elles sont ensuite déposées dans des boîtes gélosées à 9%, placées dans une atmosphère humide à 30°C et à l'obscurité. Les boîtes sont renversées afin que la radicelle ne s'enfonce pas dans l'agar. Une fois germés, les plants sont mis en tubes Gibson ou dans des pots.

2.2. Identification des souches de Rhizobium isolées

Le seul critère d'appartenance au genre Rhizobium est la capacité des souches isolées de provoquer la formation de nodosités sur les racines.

2.2.1. Culture en tube Gibson.

2.2.1.1. *Dispositif de Gibson (Vincent, 1970) (Fig. 1).*

Une seule plantule par tube de 30mm x 70mm contenant une solution nutritive est déposée de manière à avoir la racine sur la pente du milieu gélosé.

2.2.1.2. *Milieu de culture des plantes en solution nutritive:*

*le milieu utilisé est le milieu de Yensen: mg/l
(Yensen, 1942 in Vincent, 1970).*

KH₂PO₄: 0,2; MgSO₄,7H₂O: 0,1; NaCl: 0,1; CaHPO₄: 1;
FeCl₃,6H₂O: 0,14; solution d'oligoéléments: 1ml

Solution d'oligoéléments = /l:

H₃PO₄: 2,86; MnSO₄,4H₂O: 2,03; ZnSO₄,7H₂O: 0,22; CuSO₄, 5H₂O:
0,08; H₂MoO₄, H₂O: 0,09

le pH est ajusté à 6,7 avec du NaOH 0,5N le milieu de culture des plantes est un milieu gélosé et contient 16 g d'agar par litre de milieu.

2.2.1.3. *Inoculation des plantes par les souches de Rhizobium; l'inoculum doit être exempt de contamination et doit être suffisamment concentré.*

Quelques gouttes de culture de bactéries (10^9 bactéries/ml) prises en phase stationnaire (24 h de culture pour les Rhizobium à croissance rapide) sont injectées dans le tube de culture des plantes. Ceci est réalisé d'une manière aseptique pour éviter toute contamination.

2.2.2. Culture en pot

Chaque plant prégermé ayant 2cm de racine est repiqué dans un pot de volume de 1,5 l et chaque traitement comporte 4 répétitions. L'irrigation est conduite délicatement afin d'éviter les contaminations.

2.2.2.1. *Stérilisation du sol*

Le sol peut être stérilisé soit à l'autoclave (Ets. LEQUEUX) une heure à 120°C ou au bromure de méthyl à la concentration de 300 kg/m³ de sol et couvert de plastique pendant 48 heures. Les pots ont été lavés à l'eau de robinet puis désinfectés à l'eau de javel.

2.2.2.2. *Composition de l'eau d'arrosage*

P	0,07 ppm
NO ₃ ⁻	traces
NH ₄ ⁺	0
Matière organique	3,2 ppm
Résidu sec	764 ppm
pH	6,6

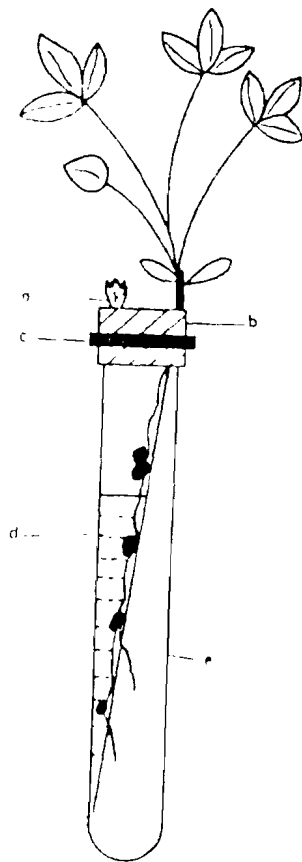


Fig. .1. Dispositif de Gibson pour tester l'infectivité (aptitude à noduler) et l'effectivité (aptitude à fixer N_2) des souches de Rhizobium

- a: bouchon pour arrosage;
 - b: feuille d'aluminium
 - c: bracelet caoutchouc
 - d: solution nutritive pour la plante (solution sans N)
 - e: gélose inclinée
- (Vincent, 1970)

2.2.2.3. *Caractéristiques du sol utilisé (sol de Bel Air, Centre ORSTOM, Laboratoire de Biologie des Sols Dakar).*

Le sol de Bel Air est un sol peu évolué issu d'une roche mère constituée de sable dunaire quaternaire. Les principales caractéristiques du sol utilisé sont les suivantes :

Argile %	4,4
Limon %	0,9
Sable %	94,7
N total ppm	180
P ass. ppm	105
P total ppm	176
pH	4,9

- L'azote total est dosé après minéralisation à l'acide sulfurique concentré.
- Le P assimilable est dosé après extraction à NaHCO_3 0,5 M selon la méthode Olsen (Jackson, 1958).
- Le P total est dosé après minéralisation à HNO_3 .
- Le pH est mesuré dans un mélange sol - solution de KCl 1 N (1/2,5 V/V).

2.2.3. Préparation de l'inoculum et inoculation

L'inoculum est préparé en erlenmeyer, la culture se fait avec agitation (100 rpm) à 30°C et sur milieu extrait de levure-mannitol (YEM). L'inoculation des plantes est faite au moment du repiquage; 1ml de culture bactérienne liquide prise en phase stationnaire est injecté dans la rhizosphère des plants.

2.2.4. Spectre d'hôtes

Afin de rechercher les plantes tropicales nodulées par les souches isolées, nous avons testé plusieurs plantes en tube Gibson et en utilisant le milieu de Jensen; certaines de ces plantes (Leucaena leucocephala, Neptunia aleracea, Acacia senegal, Sesbania rostrata et Albizia lebbeck) sont infectées par des Rhizobium à croissance rapide, tandis que Acacia albida n'est infectée que par des Rhizobium à croissance lente de type "Cow-pea" (Dreyfus et Dommergues, 1981).

Les graines de ces plantes ont été stérilisées superficiellement à l'acide sulfurique concentré pendant une durée différente selon les plantes :

graines des plantes testées	durée de stérilisation à l' H_2SO_4
<u>Leucaena leucocephala</u>	1 heure
<u>Neptunia oleracea</u>	45 minutes
<u>Acacia senegal</u>	14 minutes
<u>Albizia lebbeck</u>	1 heure
<u>Acacia albida</u>	1 heure
<u>Sesbania rostrata</u>	45 minutes

3. Evaluation de la fixation symbiotique

3.1. Méthodes d'évaluation de la fixation d'azote

Quatre méthodes permettent d'évaluer la fixation d'azote dans un système :

- mesure de l'augmentation de la teneur en azote par la méthode de Kjeldhal (Rinaudo, 1970)
- mesure de la réduction de l'acétylène en éthylène (méthode indirecte)
- mesure de l'enrichissement en ^{15}N fourni à la plante
- concentration en ureides dans la partie aérienne (applicable seulement aux légumineuses à ureides).

3.2. Critères utilisés pour l'appréciation des infections et de l'effet des symbiotes sur la plante.

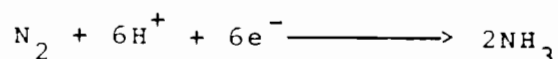
Nous avons utilisé la première méthode pour évaluer l'azote dans la partie aérienne et la deuxième méthode pour mesurer la réduction de l'acétylène en éthylène par les nodules. L'effet des symbiotes sur la plante a été estimé par la mesure du poids sec des plantes.

3.2.1. Méthode de réduction de l'acétylène

3.2.1.1. *Principe de la méthode*

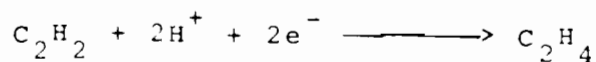
La nitrogénase réduit la triple liaison de la molécule d'azote en ammoniac. Beaucoup d'autres molécules à triple liaison peuvent être réduites par l'enzyme.

Le complexe enzymatique, la nitrogénase, peut transférer les électrons, non seulement à N_2 , mais aussi à N_2O , HN_3 , C_2H_2 , HCN , CH_3NC et H_3O^+



La chromatographie en phase gazeuse, couplée à l'ionisation de flamme, fournit un test excessivement sensible à l'éthylène.

La réduction de l'acétylène se fait suivant la réaction suivante:



Pour mesurer l'activité de la nitrogénase il suffit alors de mettre en présence l'enzyme active et l'acétylène puis de mesurer l'éthylène formé.

Ce test est beaucoup plus sensible que l'analyse isotopique (utilisant ^{15}N) ou la méthode de dosage de Kjeldhal. Ce test à l'acétylène fonctionne aussi bien avec microorganismes vivants qu'avec des nodules de racines ou de plantes entières.

3.2.1.2. Incubation sous C_2H_2

L'activité nitrogénase des nodules est mesurée par la méthode de réduction de l'acétylène en éthylène. Elle est réalisée rapidement et à la mi-journée lorsque les nodules sont en activité.

La plante est dépotée délicatement afin de garder les racines intactes. La terre adhérant aux racines est enlevée délicatement en prenant soin de ne pas arracher les nodules puis on coupe la plante en deux parties. La partie racine est introduite dans des flacons sérum de 570ml hermétiquement bouchés et la partie aérienne est mise à sécher pour déterminer le poids sec.

Une concentration finale de 10% d'acétylène est injectée. Les flacons sont incubés à 30°C. 15mn et 30mn après on prélève 0,5ml et on mesure la quantité d'éthylène formée par chromatographie en phase gazeuse. On a utilisé un chromatographe "Varian aerograph", série 1400, colonne Sphérosil, à ionisation de flamme.

3.2.2.1. Prélèvement des échantillons

Les parties aériennes sont coupées et mises à sécher dans une étuve à 60°C. 72 heures après on les pèse afin de déterminer le poids sec puis on les passe au broyeur (Réf.: Thomas Wiley, Model ED5). Sur un même échantillon on fait 3 dosages à partir de 20mg de poudre qu'on porte dans des matras en vue du dosage de l'N par la méthode de Kjeldhal.

3.2.2.2. Minéralisation

Elle est réalisée à l'acide sulfurique concentré pur. 1ml d'acide est ajouté à 20mg de poudre par matras. On chauffe sur des rampes de minéralisation munis de 6 brûleurs (thermostat à débit maximum) jusqu'à disparition des fumées blanches. On ajoute alors quelques gouttes d' H_2O_2 jusqu'à décoloration du milieu - l'eau oxygénée permet d'achever la minéralisation par augmentation brusque de la température jusqu'à 300°C. On remet à chauffer jusqu'à disparition des fumées blanches; le milieu devient limpide, on laisse refroidir, puis on dose l'azote total.

3.2.2.3. Dosage de l'azote

L'extrait est neutralisé par 5ml de NaOH, 10 N, il est distillé dans un appareil de PARNAS-WAGNER et l'ammoniac formé est dosé à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique N/70 apporté à l'aide d'une microburette. L'acide est ajouté de manière à maintenir la coloration gris-bleuâtre initiale obtenu par le réactif de TASHIRO.

La coloration provoquée par le réactif de TASHIRO est verte en milieu alcalin et mauve en milieu acide (réactif de Tashiro: bleu de méthylène à 0,70% dans l'alcool à 95° : 1 volume; rouge de méthyle à 0,15% dans l'alcool à 95°: 5 volume) la durée moyenne de la distillation est de 3mn.

- Calcul de la teneur en azote dans la partie aérienne. La masse atomique de l'N étant de 14, à 1ml de NCl N/70 correspond 0,2 mg, soit une concentration en N de 1%

$$N \% = 0,2 \times V \times \frac{100}{P}$$

P = poids de l'échantillon par matras = 20 mg

V = volume HCl N/70 versé.

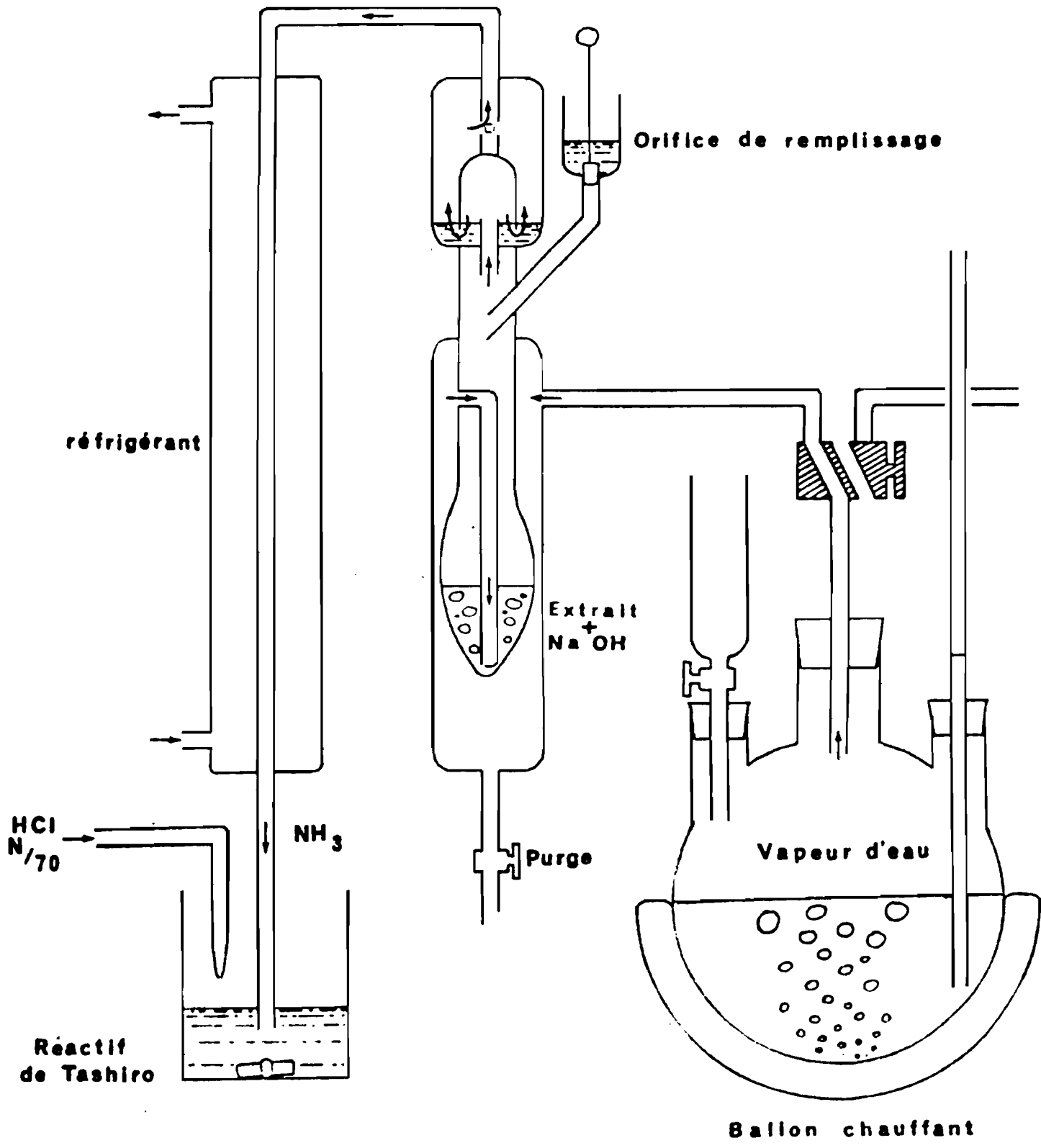


Schéma de l'appareil de PARNAS-WAGNER.

4. Etude des souches isolées

Elles ont été testées pour leur aptitude à noduler la luzerne et ont été comparées à une souche de R. meliloti L530.

4.1. Détermination du taux de croissance

Il permet de classer les souches isolées dans le groupe des Rhizobium à croissance lente ou rapide. Le taux de croissance des souches effectives est calculé d'après l'augmentation de la densité optique à 570nm. Les mesures sont effectuées avec un spectrophotomètre Beckman (model 25). La température optimale de croissance des souches a été déterminée par la mesure du taux de croissance à 30°, 35° et 40°C.

4.2. Mise en évidence des plasmides

La technique d'extraction rapide d'Eckardt permet de détecter les plasmides dans les souches isolées. La recherche de plasmide est importante dans la mesure où les plasmides mis en évidence chez certains Rhizobium jouent un rôle dans le contrôle de la formation de nodules et la spécificité de l'hôte.

La mise en évidence des plasmides est réalisée par électrophorèse en gel d'agarose (Sigma, type II) vertical en plaque (17,5 x 14,0 x 0,3cm). L'agarose est dissout dans du tampon électrophorèse par chauffage. Les gels sont constitués de deux couches :

- une couche (1,5 à 2cm) d'agarose 1,4% constituant la base;
- une couche d'agarose 0,7% constituant le gel proprement dit.

L'électrophorèse est réalisé en tampon tris-borate TB: g/l Tris base: 10,8 (89mM); Na₂EDTA: 0,93 (2,5 mM); Acide borique: 5,5 (89 mM). 0,5ml de suspension bactérienne est prélevé à partir d'une culture en phase stationnaire réalisée dans 5 ml de milieu liquide YEM. Les cellules sont récupérées par centrifugation pendant 1mn en tube eppendorf de 1,5ml (8000 rpm, centrifugeuse eppendorf); on lave le culot avec 0,5ml de sarcosyl 0,1% dans du TB puis on rince dans 0,5 ml de TE8.

Après centrifugation le culot est repris dans 20ul de TB 20%Ficoll (Sigma, type 400) on homogenéise et on laisse à la température ambiante pendant 30mn afin de sensibiliser les

cellules, on ajoute 40ml de solution A (lysozyme 7500 u/ml, bleue de bromophénol 0,05% et ficoll 20% dans du TB). On mélange les cellules avec la solution A et la suspension bactérienne est déposée sur un puits du gel laissé à l'air libre pendant 1 heure. la lyse bactérienne s'effectue sur un puits du gel, les cellules sont ensuite mélangées délicatement à l'aide d'une pipette pasteur avec 40ml du mélange détergeant (SDS 0,2% et Ficoll 10% dans du TB).

Afin d'éviter qu'ultérieurement le lysat bactérien et le tampon d'électrophorèse ne se mélange, on ajoute 100 ml de la solution C (SDS 0,2% et Ficoll 5% dans du TB).

Les puits du gel sont ensuite remplis avec du tampon d'électrophorèse Tris-borate, puis on laisse migrer 1 h à 8mA puis 3 h à 40 mA. Après migration les gels sont colorés pendant 30mn dans du tampon d'électrophorèse en présence de bromure d'éthidium à 1µg/ml et après rinçage à l'eau distillée, les gels sont photographiés avec un appareil polaroid MP4, film 665, équipé d'un filtre rouge.

4.3. Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques permet de caractériser et de comparer les souches entre elles et peut être utilisée pour marquer des souches en vue d'une étude génétique. Pour déterminer la résistance aux antibiotiques, on a utilisé la technique de diffusion dans laquelle le gradient de concentration de l'antibiotique est réalisé par diffusion dans la gélose à partir d'un centre.

— Technique de manipulation suivant CHABBERT, Y.A. (1972) : la boîte de Petri gélosée est inondée avec 3 à 5ml de culture bactérienne. On réaspire l'excès en inclinant la boîte dans plusieurs directions puis on applique les disques à 15mm de la périphérie de la boîte en appuyant légèrement pour assurer le contact avec le milieu. Ainsi 6 disques sont placés sur une boîte de 9cm de diamètre. Après application les boîtes sont laissées pendant 30min à la température du laboratoire (20 à 25°C) puis incubées pendant 18h à 37°C.

III. RESULTATS et DISCUSSION

.1. Isolement de souches tropicales nodulant la luzerne

L'isolement a été réalisé par piégeage dans le sol de la station Bel-Air ORSTOM, Dakar. Cinquante jours après le semis des graines stériles de Medicago sativa, variété MOAPA, dans 2m² de terrain, une observation des racines des plantes a montré la présence de nodules blanchâtres et rougeâtres à l'extérieur et extrêmement rouge en coupe (photo 1).

A partir de ces nodules une série d'isolement a été réalisée selon la technique indiquée dans le chapitre Matériels et Méthodes; on a pu isoler et purifier 18 souches en boîte gélosée YEM.

.2. Test de nodulation

Des plantes de luzerne, variété MOAPA, sont cultivées en tubes Gibson et inoculées avec les 18 souches isolées afin de tester leur infectivité et donc leur appartenance au genre Rhizobium. Trois sur les 18 souches isolées ont formé des nodules fixateurs rougeâtres et ont été répertoriées ORS111, ORS117 et ORS118.

La formation des nodules est observée 6 jours après l'inoculation avec les trois souches infectives et avec R. meliloti L530. Les trois souches sont effectives puisque les plantes sont beaucoup plus vigoureuses et plus vertes que la plante témoin non inoculée (photo 2).

Cette observation sera confirmée par la mesure de l'activité réductrice d'acétylène. Un test de nodulation en tube Gibson a été réalisé sur plusieurs légumineuses tropicales inoculées avec les souches isolées (Tableau 1).

Une souche isolée par piégeage à partir de la terre en provenance du Maroc a été testée en tube Gibson et a été repertoriée ORS115. C'est une souche effective, elle donne des plantes plus vigoureuses que le témoin (photo 1).

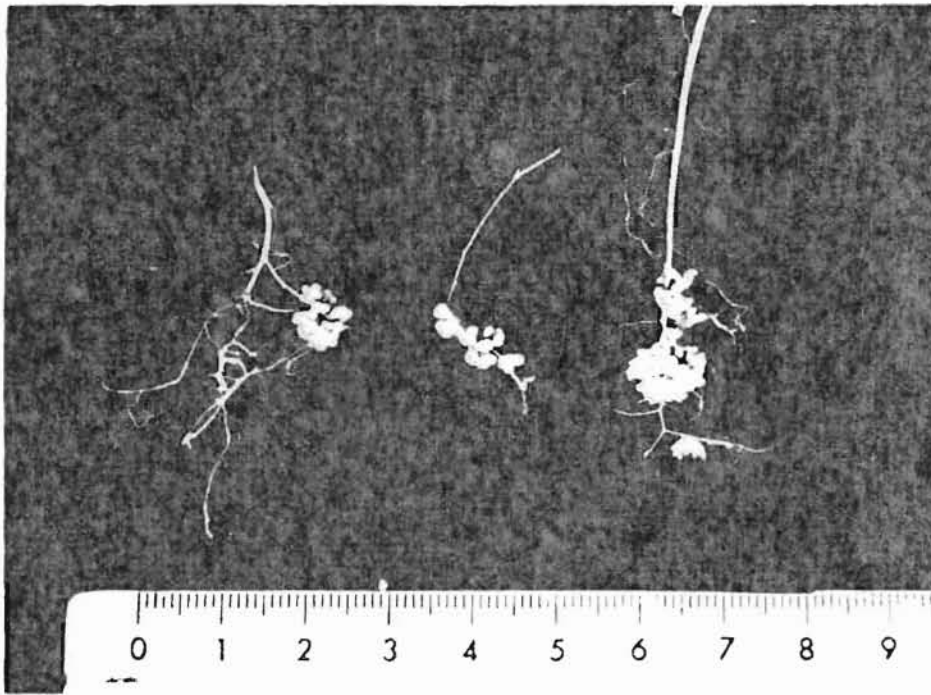


Photo 1. Nodules isolés de racines de luzerne

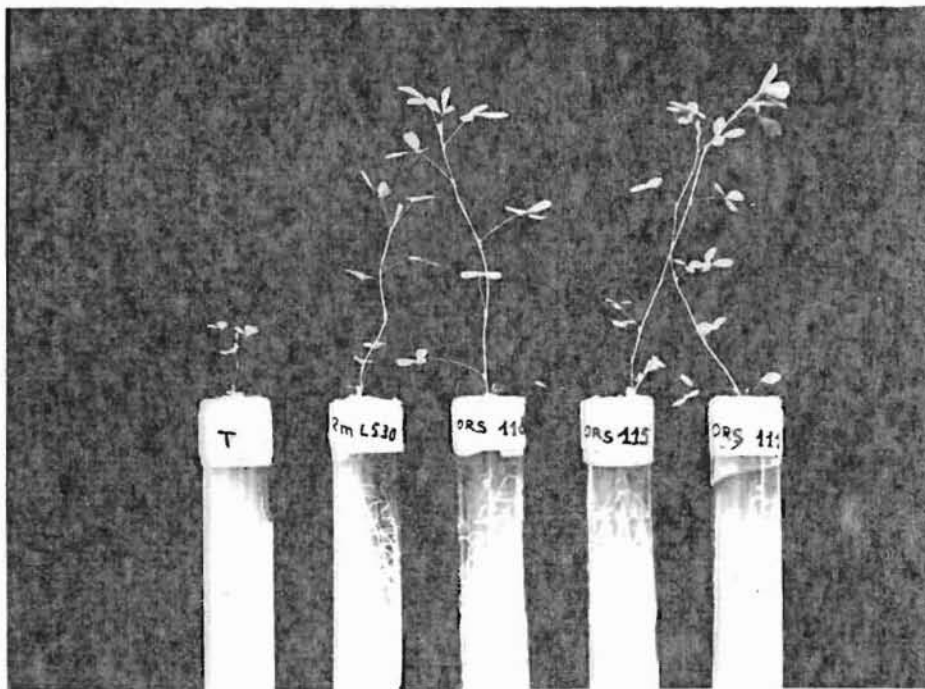


Photo 2. Test de nodulation en tube Gibson des souches isolées

Tableau 1

Espèces	Nodulation par ORS111, 117, 118 et R. meliloti L530
<i>Acacia albida</i>	P
<i>Albizia lebbek</i>	P
<i>Acacia senegal</i>	NI
<i>Sesbania rostrata</i>	NI
<i>Leucaena leucocephala</i>	P
<i>Neptunia oleracea</i>	I

P = pseudonodule

I = infective

NI= non infective

- Culture en pot :

L'inoculation de la luzerne cultivée avec ORS 111, ORS117, ORS118 et R. meliloti L530 a été faite au semis. Les plantes ont été récoltées 55 jours après le semis. Pendant cette période la luminosité était en moyenne de 70000 lux mesurée à la mi-journée, la température moyenne était de 30°C pendant le jour et de 22°C pendant la nuit.

.3. Caractéristiques symbiotiques des souches isolées (Tableau 2)

Les critères utilisés sont l'activité de réduction de l'acétylène, la teneur en azote et le poids sec des parties aériennes.

.3.1. Activité réductrice d'acétylène

Les activités de réduction d'acétylène chez les différentes souches sont comprises entre 1817 et 973nM par min et par pot. Cependant la souche ORS118 est la plus effective puisqu'elle réduit le plus d'acétylène (1817nM/min/pot) la souche ORS117 est une souche aussi très effective (1405nM/mn/pot) alors que la souche ORS111 n'a pas une activité réductrice d'acétylène (976nM/mn/pot) différente de R. meliloti L530 (973nM/mn/pot). toutefois la nodulation par ORS118 a été faite plutard que les autres souches et donc les nodules étaient plus jeunes.

.3.2. Teneur en azote et poids sec des parties aériennes

La teneur en azote des parties aériennes a été estimée par la méthode de Kjeldhal (Rinaudo, 1970). Toutes les souches ont permis d'obtenir une teneur en azote plus élevée que le témoin, cependant la teneur en azote entre les souches n'est pas significativement différente.

La souche ORS118 a permis un gain de 100% (2,57%) par rapport au témoin (1,26%). Une augmentation du poids sec des parties aériennes est observée chez toutes les souches par rapport au témoin non inoculé (6,35gr/pot), la souche ORS111 a permis une augmentation du poids sec de 92% (12,2 g/pot) par rapport au témoin.

Tableau 2. Caractéristiques symbiotiques des souches isolées

Souches					Témoin
Paramètres	R.m.L530	ORS 111	ORS 117	ORS 118	non inoculé
nmole d'Ethylène formé/min/pot	973,8	976,3	1405,3	1817,8	0
Pourcentage d'azote dans les parties aériennes	2,46±0,33	2,47±0,66	2,31±0,58	2,57±0,19	1,26±0,24
Poids sec des parties aériennes (g/pot)	11,4	12,2	11,87	10,86	6,35

4. Caractéristiques des souches isolées

4.1. Identification des plasmides par la méthode d'Eckardt (1979)

La mise en évidence des plasmides réalisée sur électrophorèse en gel d'agarose par la technique d'extraction rapide d'Eckardt a permis de détecter dans les souches isolées deux bandes en haut du gel correspondant à des plasmides de masse moléculaire comparable au gros plasmide de R. meliloti L530.

Ce résultat est important dans la mesure où les plasmides mis en évidence chez d'autres souches fixatrices d'azote jouent un rôle essentiel soit dans la fixation d'azote, soit dans l'association avec la plante.

Certains travaux chez Rhizobium ont montré que ces informations sont portées par des gros plasmides. Les plasmides détectés chez ORS117 et ORS118 devront être confirmés car on n'a pu mettre en évidence qu'un seul gros plasmide chez le témoin R. meliloti L530 en raison de problèmes de reproductibilité de la méthode d'Eckardt.

4.2. Etude de la résistance aux antibiotiques (Tableau 3)

La résistance aux antibiotiques des souches isolées a été réalisée en milieu YMA gélosé et en utilisant la technique de diffusion d'un antibiotique à partir d'un disque (Chabbert, 1972). Toutes les souches testées sont résistantes à la Kanamycine et à la pénicilline et sensibles à la tétracycline. Les souches isolées ORS111, ORS117 et ORS118 se différencient des souches de R. meliloti par leur résistance à la novobiocine.

4.3. Détermination de la température optimale de croissance (Tableau 4)

Le taux de croissance des différentes souches a été mesuré à 30°C, 35°C et 40°C sous agitation et dans du milieu YEM liquide. D'après le tableau 4, le taux de croissance maximum chez R. meliloti a été observé à 30°C alors que la température optimale de croissance des souches isolées est 35°C. Ces résultats suggèrent que les souches isolées sont effectivement des souches tropicales.

Tableau 3. Résistance des différentes souches aux antibiotiques

Antibiotiques						
Souches	S	TE	P	NB	C	K
ORS 111	+	- (1,2cm)	+	.	+	+
ORS 117	.	- (1,1cm)	+	.	+	+
ORS 118	.	- (1,4cm)	+	.	+	+
R.m 41	- (0,5cm)	- (1,8cm)	+	- (1cm)	+	+
R.m L530	+	- (1,8cm)	+	- (1cm)	.	+

Les concentrations utilisées sont de 10 ug par disque sauf pour le Streptomycine et la pénicilline 5ug par disque

+ = résistance

- = sensible

. = peu résistante

S = Streptomycine

TE = Tetramycine

C = Cloramphénicol

K = Kanamycine

NB = Novobiocine

P = Pénicilline

Tableau 4. Taux de croissance à différentes températures
et souches (h^{-1})

	ORS 111	ORS 117	ORS 118	Rm L530	Rm 41
30°C	0,24	0,29	0,28	0,34	0,31
35°C	0,28	0,31	0,31	0,27	0,28
40°C	0,19	0,25	0,24	0,21	0,22

IV. CONCLUSION

L'isolement de Rhizobium à partir de sols tropicaux nodulant la luzerne nous a permis d'obtenir deux souches natives ayant une activité fixatrice d'azote comparable aux meilleures souches de R. meliloti. Il s'agit là d'un fait qui, à notre connaissance, n'a pas été signalé en zone tropicale et qui mérite d'être développé.

1. Comparaison avec Rhizobium meliloti ex planta

Comme les souches de R. meliloti, les deux souches isolées forment des nodules sur les racines de la luzerne. Ces nodules sont rougeâtres à l'extérieur et extrêmement rouges à l'intérieur montrant ainsi la présence de leghémoglobine.

Cependant, ces souches paraissent différentes de R. meliloti:

- L'étude de la résistance aux antibiotiques a montré que les souches isolées se distinguent par leur résistance à la Kanamycine.
- La détermination de la température optimale de croissance, 35°C, supérieure à la température de croissance de R. meliloti, suggère que les souches isolées sont des souches tropicales adaptées aux conditions climatiques.

- En utilisant la technique rapide d'Eckardt de mise en évidence des plasmides on a pu détecter deux gros plasmides chez la souche ORS118. Des travaux effectués sur R. phaseoli et R. meliloti ont montré que les gènes responsables de la nodulation et de la fixation sont portés par des plasmides. Il serait alors intéressant de rechercher les caractéristiques phénotypiques codés par les plasmides détectés chez ORS118 notamment la résistance aux antibiotiques et l'étude des gènes codant pour la nodulation et la fixation d'azote.

2. Comparaison avec R. meliloti in planta

Les critères d'évaluation de l'efficacité de la symbiose entre la luzerne et les souches isolées ont permis de constater que la souche ORS118 est la souche la plus efficace avec une augmentation en azote de 100% par rapport au témoin non inoculé et une activité fixatrice d'acétylène par plante supérieure à celle de R. meliloti L530.

L'étude de la nodulation chez certaines plantes tropicales a montré que les souches isolées et R. meliloti forment des nodules sur Neptunia oleracea. La nodulation étant plus rapide chez Neptunia oleracea que chez la luzerne, cette plante constituerait donc un excellent modèle pour l'étude de l'infection par ces souches.

3. Perspectives

Il est intéressant de poursuivre ce travail sur plusieurs variétés de luzerne et d'étudier la spécificité des souches avec plusieurs variétés de Medicago sativa.

Une variété de luzerne arborescente paraît intéressante, Medicago arborea. C'est un arbuste vivace, très persistant (10 à 30 ans ou plus). Les jeunes pousses sont plus riches en feuilles (70 à 80%) que celle de Medicago sativa. Elle pourrait être cultivée avec succès sans irrigation, sur les sols pauvres, caillouteux et atteindre un rendement assez satisfaisant. Cet arbuste peut avoir un intérêt certain dans les régions tropicales où la quantité des pluies durant les dernières années a fortement chuté.

Les Rhizobium indigènes nodulant la luzerne sont surtout plus adaptés aux conditions climatiques tropicales que les souches de R. meliloti originaires des régions tempérées. Il est donc intéressant d'utiliser des souches natives pour inoculer des cultures de luzerne qui peuvent être développées en irrigué pendant la saison sèche dans les régions tropicales.

L'inoculation par une souche indigène performante (ORS118) permettrait d'augmenter un fourrage riche en azote destiné au bétail. Le problème fourrager constitue un problème essentiel à surmonter pour lutter contre la faim et éviter le surpâturage, facteur favorisant la désertification.

Ce travail m'a permis d'apprendre la méthodologie à suivre pour une étude de la symbiose Rhizobium-légumineuse. Un travail analogue est envisagé en Tunisie sur Medicago arborea.

R E F E R E N C E S

Dénarié, J., Truchet, G., (1979): *Physiol. Vég.* 17 (4), 643-667.

Dreyfus, B., Dommergues, Y. (1981): *Applied and environmental microbiology.* p. 97-99.

Eckardt, T. (1978): *Plasmid*, 1, 584-588.

Hardy, R.W.F., Havelka, D. (1975): *Nitrogen fixation research: a key to world food.* *Science* 188.

Jackson, M.L. (1958): *Soil chemical analysis* Prentice Hall, Inc., Englewood cliffs, N.J., 153-154.

Rinaudo, G. (1970): *Thèse de Docteur Ingénieur, Faculté des Sciences de Montpellier*, 25-27.

Chabbert, Y.A. (1972): *Les antibiotiques en bactériologie médicales* eds Flammarion, Paris.

Vincent, J.H. (1970): *A manual for the practical study of the root nodule bacteria.* I.B.P. Handbook n°15, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

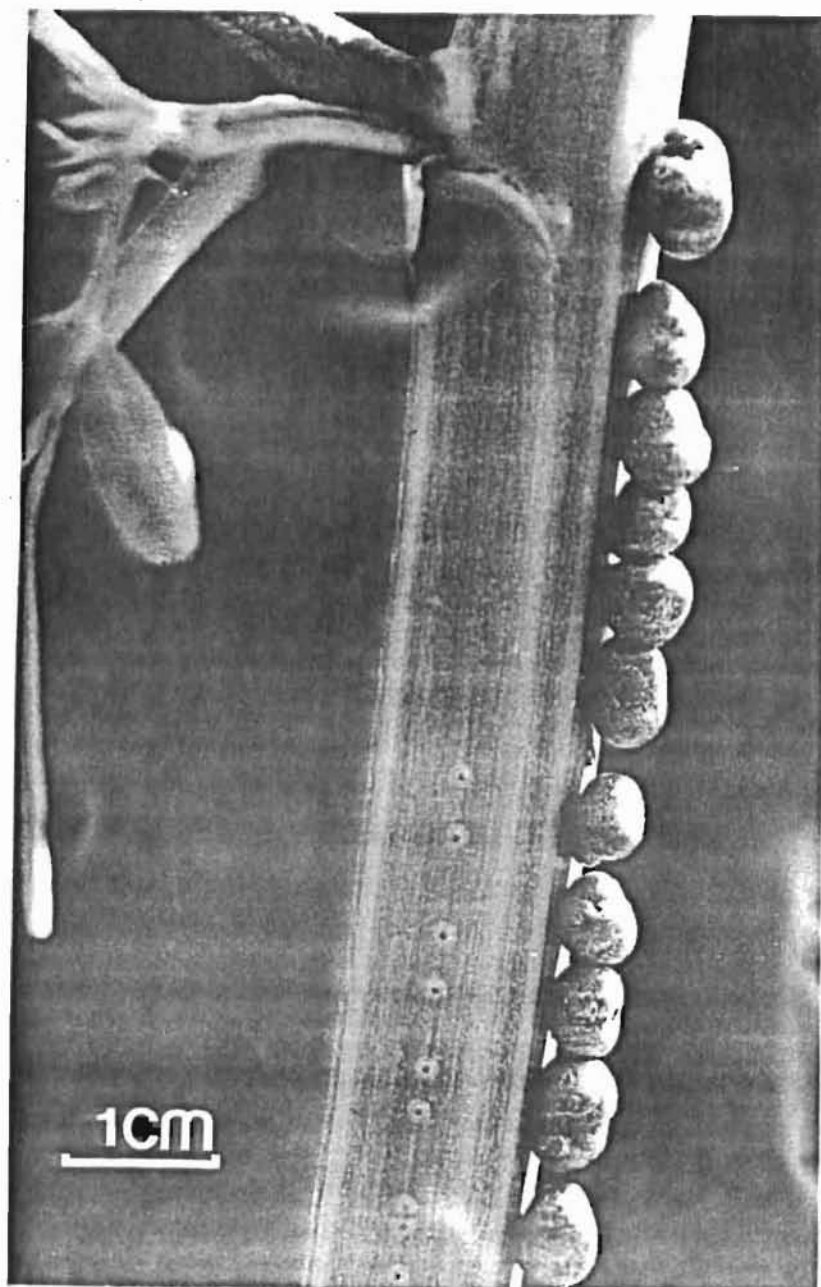


Fig. II.1.1. Tige de Sesbania rostrata. Sur la face antérieure on observe une rangée de sites de nodulation non infectés ressemblant à de petites pointes. Sur le côté, on observe une rangée de nodules provenant de l'infection des sites de nodulation inoculés par la souche de Rhizobium de tige ORS571. (Dreyfus, 1982)

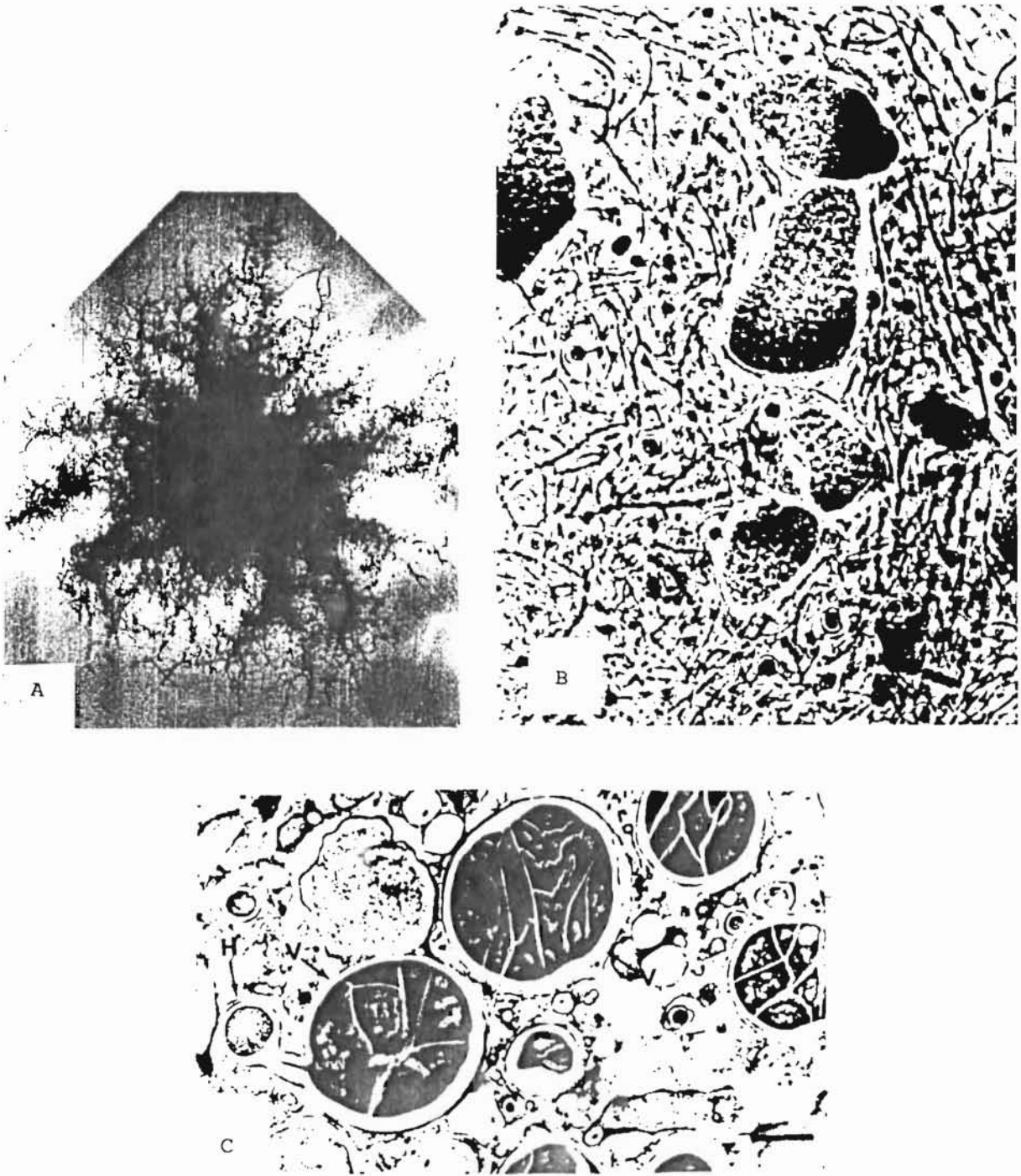


Fig. II.2.2. A. Colonie de Frankia sur gélose (diamètre 0,5mm)
 B. Culture de Frankia typique avec les trois structures:
 hyphes, vésicules (diamètre $3\mu\text{m}$) et sporanges
 en moyenne $20\mu\text{m}$)
 C. Vésicules sphériques (diamètre $3\mu\text{m}$) dans un nodule
 d'Hippophaë rhamnoides. Noter la compartimentation
 des vésicules (vésicules septées)
 (Diem 1982; Gauthier, 1982)

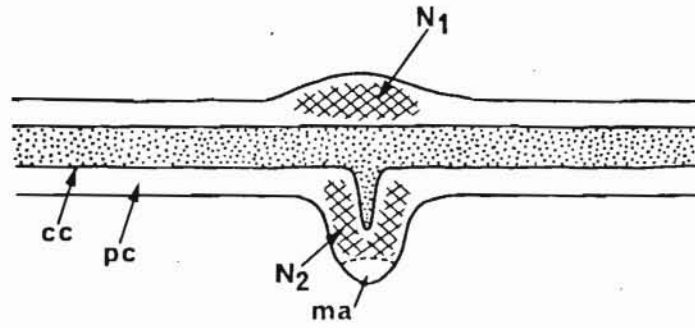


Fig. II.2.3. - Schéma de la formation des nodules chez les non-légumineuses (N_1 = nodule primaire ou pré-nodule; N_2 = nodule proprement dit; cc = cylindre central de la racine; pc = parenchyme cortical; ma = méristème apical. Les zones hachurées représentent les tissus infectés) (Blondeau 1980)

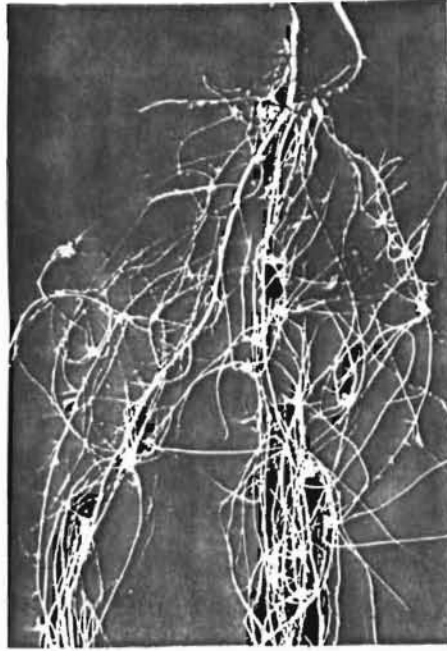


Fig. II.2.4. Nodules âgés de 1 mois sur des racines de Casuarina equisetifolia inoculées, avec une souche pure de Frankia (ORS 1106) (H.G. Diem, 1982).

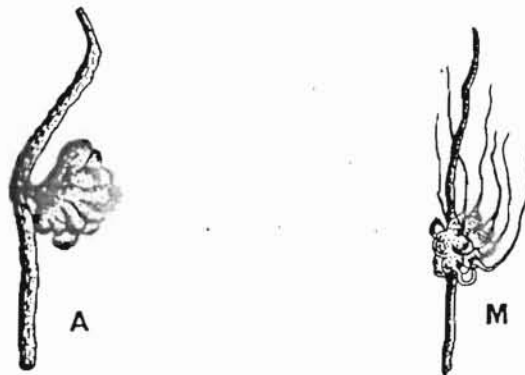


Fig. II.2.5. - Représentation schématique d'un nodule de type Alnus (à gauche) et de type Myrica (à droite). (Blondeau 1980)

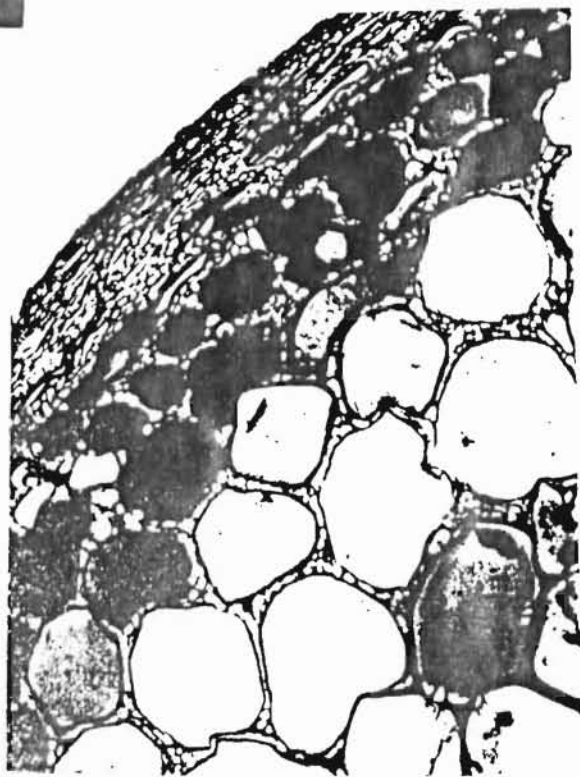
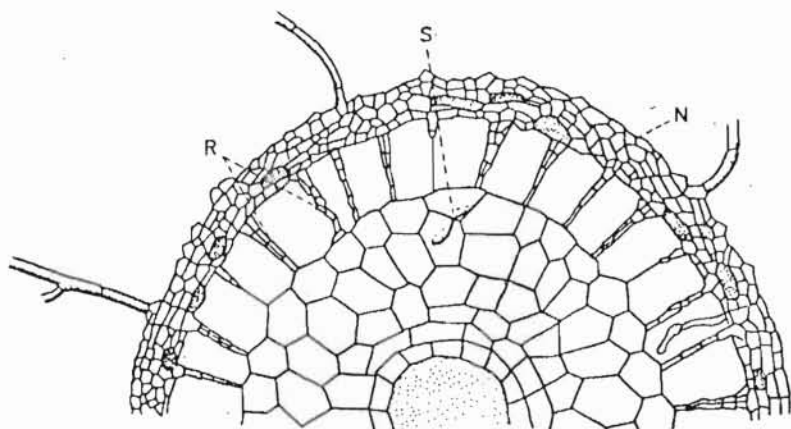


Fig. II.3.1. A. Mycorhize ectotrophe de Pin montrant la ramification dichotomique. (HacsKaylo, 1967)

B. Coupe schématique d'une mycorhize ectotrophe : N manteau; R, réseau de Hartig. (Harley, 1965)

C. Photographie correspondant au schéma B. (HacsKaylo, 1967)