COURS DE MICROBIOLOGIE DU SOL

(Deuxième partie)

Laboratoire de Microbiologie des Sols
ORSTOM , BP. 1386 DAKAR, Sénégal

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER

Avril 1983

COURS DE MICROBIOLOGIE DU SOL

DEUXIEME PARTIE :

LES PRINCIPALES SYMBIOSES AVEC LES PLANTES SUPERIEURES

Y. DOMMERGUES

Laboratoire de Microbiologie des Sols, Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, B.P. 1386, Dakar, Sénégal.

CHAPITRE 1 . LES LEGUMINEUSES

1. Les plantes-hôtes

Ce sont des plantes appartenant toutes à la famille des légumineuses (tribu des Rosales). Les légumineuses sont fondamentalement des espèces arborescentes tropicales; les espèces herbacées ou buissonnantes des régions tempérées en seraient des formes dérivées récentes (Tableau II.1.1). On connait 17.600 espèces de légumineuses (Meyer et Broughton, 1982) mais seulement une centaine d'entre elles sont cultivées. Malgré les recherches intensives sur les légumineuses depuis le début du siècle, les études sur la nodulation ont porté seulement sur 10% des espèces connues. Il convient de noter que le pourcentage d'espèces ne nodulant pas est important dans la sous famille des Césalpiniées, notamment dans les tribus suivantes : Bauhiniées, Cassiées, Eucésalpiniées (Tableau II.1.2).

La sous famille des Papilionacées se subdivise en dix tribus: Sophoracées, Dalbergiées, Phaséolées, Galégées, Hedysarées, Viciées, Cicérées, Trifoliées, Lotées,

2. Les *Rhizobium* .

In vitro, *Rhizobium* se présentent sous la forme de bâtonnets gram-négatifs de 0,5 - 0,9 x 1,2 - 3,0µm généralement mobiles quand ils sont jeunes grâce à quelques flagelles péritriches, polaires ou subpolaires. Les cellules plus âgées comportent un ou plusieurs granules réfringeants de poly-β-hydroxybutyrate (PHB).
Les *Rhizobium* forment des colonies incolores, blanches ou couleur crême sur le milieu mannitol extrait de levure[1]. Quelques souches sont roses.

[1] Pour la composition du milieu de culture voir Vincent (1970).

Tableau II.1.1. Caractéristiques et distribution des sous-familles de légumineuses. (Vincent, 1974)

Sous-familles	Espèces ligneuses (%)	% distribution dans les régions	
		tropicales et subtropicales	tempérées
Mimosées	95	90	10 (Acacia)
Césalpiniées	97	96	4
Papilionacées	38	37	63
Swartzioidées	100	100	0

Tableau II.1.2. Incidence de la nodulation dans chacune des sous-familles (Vincent, 1974)

Sous-familles	Nombre d'espèces	Espèces examinées	% d'espèces nodulées
Mimosées	1500	146	87
Césalpiniées	1300	115	23
Papilionacées	10000	1024	93
Swartzioidées	80	0	?

On distingue en général :

(1) Les Rhizobium à croissance rapide qui ont un temps de génération de 2-4 h, et qui forment des colonies de 2-4 mm de diamètre en 3-4 jours sur milieu gélosé.

(2) Les Rhizobium à croissance lente qui ont un temps de génération de 6-8 h et dont les colonies ne dépassent pas 1mm même après 7-10 jours d'incubation sur milieu solide.

"Cette distinction, fondée sur la vitesse de croissance, est en relation avec d'autres propriétés physiologiques et biochimiques: les premiers produisent souvent d'importantes quantités de substances gommeuses et s'accommodent de nombreux sucres en utilisant les voies glycolytiques des pentoses phosphates,d'Entner-Doudoroff et d'Embden-Meyerhof, alors que les souches à croissance lente sont plus exigeantes et préfèrent les pentoses (elles ne possèdent que la séquence d'Entner-Doudoroff")(Blondeau, 1980).

Si on les cultive dans des conditions standard,les souches à croissance rapide sont productrices d'acide et les souches à croissance lente productrices d'alcalis.

Rhizobiums à croissance rapide : groupe "R. Leguminosarum, R. trifolii, R. phaseoli", groupe R. meliloti; certains R. tropicaux (ex. Sesbania, Acacia).

Rhizobiums à croissance lente: groupe "R. cow-pea"; groupe "R. japonicum (sauf exception) et R. lupini"

"Au point de vue des relations symbiotiques, on s'était rendu compte depuis très longtemps qu'une certaine spécificité existait entre les Rhizobium et les légumineuses-hôtes: un Rhizobium qui peut qui peut infecter le Trèfle ne peut infecter le Lupin et vice versa.

On a donc été amené à regrouper les souches en fonction leur spécificité vis-à-vis des plantes et, de cette façon, six groupes d'inoculation croisée ont été constitués et ont actuellement la valeur d'espèce. Pour chacune de ces espèces, couramment désignées sur la base de leur plante-hôte type, la spécificité est plus ou moins large, c'est-à-dire qu'un nombre variable de plantes peut être infecté" (Blondeau, 1980).

En fait cette classification fondée sur la spécificité d'hôte n'est pas rigoureuse. On a pu mettre en évidence l'existence de continuums de souches entre les souches typiques appartenant à un groupe d'inoculation croisée et les souches typiques appartenant à un autre goupe d'inoculation croisée. C'est ainsi que l'on connait des souches intermédiaires entre les souches typiques du groupe cow-pea et les souches typiques du groupe R. japonicum, ces souches intermédiaires étant capables de noduler (efficacement) les cow-peas (Vigna unguiculata) et les Sojas.

"Le fait que ces groupes d'inoculation croisée ne s'excluent pas mutuellement met en question la valeur d'une telle nomenclature, surtout lorsque ces groupes sont assimilés à des espèces, mais jusqu'à maintenant on n'a jamais pu proposer d'autres méthodes suffisamment efficaces pour éliminer cette carence" (Blondeau, 1980).

Toutefois des études taxonomiques fondées notamment sur la constitution antigénique et l'homologie du DNA des souches ont permis de confirmer la validité de la classification d'une partie des Rhizobium en trois groupes (1er, 2ème et 3ème) figurant au Tableau II.1.3. Pendant très longtemps on a cru que les Rhizobium fixaient N_2 seulement in planta c'est à dire en symbiose avec la plante-hôte. Mais en 1975 plusieurs laboratoires ont découvert simultanément qu'une souche de Rhizobium du groupe cowpea (32H1) présentait une activité nitrogénase en culture.

Tableau II.1.3 . Groupes de Rhizobium et espèces nodulées (NAS, 1979)

groupe I	R. meliloti
groupe II	R. trifolii, R. leguminosarum, R. phaseoli
groupe III	R. lupini, R. japonicum
groupe IV	R. du complexe cowpea
groupe IV bis	autres Rhizobium

	Rhizobium Species	Plants Nodulated
	Designated	
I	*R. meliloti*	*Medicago sativa* (alfalfa)
		Melilotus sp. (sweet clover)
		Medicago sp. (burr and barrel medic annuals)
		Trigonella foenum graecum (fenugreek)
II	*R. trifolii*	*Trifolium* sp. (clovers)
	R. leguminosarum	*Pisum sativum* (garden and field peas)
		Vicia faba (broad bean)
		Lens esculenta (lentils)
		Lathyrus sp. (peavine)
	R. phaseoli	*Phaseolus vulgaris* (common, field, haricot, kidney, pinto, snap beans, etc.)
		P. coccineus (runner bean, scarlet runner)
III	*R. lupini*	*Lupinus* sp. (all lupins)
		Ornithopus sativus (serradella)
	R. japonicum	*Glycine max* (soybean)
	Undesignated	
IV	*Rhizobium* sp. (Cowpea type)	*Vigna unguiculata* (cowpea)
		Arachis hypogaea (peanut, groundnut)
		Vigna radiata (mung bean)
		Phaseolus lunatus (lima bean)
		P. acutifolius (tepary bean)
		Psophocarpus tetragonolobus (winged bean)
		Sphenostylis sp. (African yam bean)
		Pachyrhizus sp. (jicamus)
		Centrosema sp. (centro)
		Mucuna deeringiana (velvet bean)
		Canavalia ensiformis (jack bean)
		Lablab purpureus (hyacinth bean)
		Phaseolus aconitifolius (moth bean)
		Cyamopsis tetragonoloba (guar)
		Voandzeia subterranea (Bambara groundnut)
		Cajanus cajan (pigeon pea)
		Desmodium sp.
		Cassia sp.
		Lespedeza sp.
		Indigofera sp.
		Crotalaria sp.
		Pueraria sp.
IV bis	*Rhizobium* sp.	*Cicer arietinum* (chick-pea, garbanzo)
		Coronilla varia (crownvetch)
		Onobrychis vicisefolia (sainfoin)
		Leucaena leucocephala (ipil-ipil)
		Petalostemum sp. (prairie clover)
		Albizzia julibrissin
		Lotus sp. (trefoils)
		Anthyllis vulneraria (kidney vetch)
		Sesbania sp.

Sources: R. E. Buchanan, and N. E. Gibbons, eds. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 8th edition. Baltimore: The Williams and Wilkins Co. E. B. Fred; I. L. Baldwin; and E. McCoy. 1932. *Root-Nodule Bacteria and Leguminous Plants.* Madison: University of Wisconsin Press.

Ultérieurement on a montré qu'un petit nombre de souches de Rhizobium, appartenant toutes au groupe des Rhizobium à croissance lente, étaient capables de présenter une activité nitrogénase sous de faibles tensions d'O_2 (micro-aérobiose) sans pouvoir toutefois croître à partir de N_2. Tout récemment B. Dreyfus (ORSTOM, Dakar) a découvert qu'une souche de Rhizobium à croissance rapide isolée des nodules caulinaires de Sesbania rostrata (ORS571) pouvait avoir in vitro une très forte activité nitrogénase et en même temps pousser à partir de N_2 (c'est-à-dire dans un milieu sans azote combiné). Il semble donc y avoir tous les intermédiaires entre les souches ne présentant aucune activité nitrogénase et les souches capables de pousser à partir de N_2.

3. L'infection de la plante-hôte et la nodulation

3.1. Le Rhizobium dans la rhizosphère

Nombre d'auteurs ont prétendu que la multiplication des Rhizobiums dans la rhizosphère constituait la première étape de la symbiose. En fait il y a souvent un effet rhizosphère c'est-à-dire un accroissement du nombre des Rhizobium dans la rhizosphère par rapport au sol. Mais cet effet n'est pas toujours sélectif.

Nombre de souches de Rhizobium (mais pas toutes) sont capables de se développer dans la rhizosphère de plantes qui ne sont pas la plante-hôte. C'est ainsi que R. meliloti est stimulé à la fois dans la rhizosphère de son hôte Medicago et dans la rhizosphère de la graminée Poa (ce Rhizobium n'est pas stimulé dans la rhizosphère de Trifolium). La compétence saprophytique d'une souche de Rhizobium (c'est à dire son aptitude à survivre dans le sol ou une rhizosphère autre que la plante-hôte) confère probablement à cette souche une supériorité par rapport aux autres.

3.2. Les modes de l'infection

On peut distinguer trois modes d'infection :

- l'infection par les poils absorbants, qui est le type d'infection le plus courant et le mieux connu;
- l'infection au point d'émergence des racines latérales
- l'infection des sites de nodulation des tiges de *Sesbania rostrata*.

3.2.1. Infection par les poils absorbants (Fig. II.1.2.)

3.2.1.1. Courbure des poils absorbants

Après invasion et multiplication dans la rhizosphère d'une légumineuse homologue, les *Rhizobium* spécifiques se fixent sur les poils absorbants par leur extrémité (fixation polaire). Peu après les poils se recourbent en crosse. Cette déformation des poils absorbants peut être provoquée par des filtrats stériles de cultures de *Rhizobium*; mais la déformation obtenue est moins marquée.

3.2.1.2. Initiation du cordon d'infection

Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer la formation du cordon d'infection :

- hypothèse de l'invagination de la paroi du poil absorbant qui ultérieurement se développe pour donner un cordon qui a la même composition que l'apex du poil absorbant;
- hypothèse selon laquelle le *Rhizobium* induirait des modification de la paroi du poil par émission d'enzymes hydrolytiques.

3.2.1.3. Cordon d'infection et dédifférenciation d'une zone méristématique.

Quand le cordon d'infection progresse vers la base du poil absorbant, le noyau (agrandi) du poil précède le cordon d'infection semblant guider les *Rhizobium* vers le cortex racinaire. Les *Rhizobium* sont alignés longitudinalement dans le cordon, en général en une seule ligne.

La présence du cordon d'infection provoque une dédifférenciation des cellules corticales internes qui constituent une zone méris-

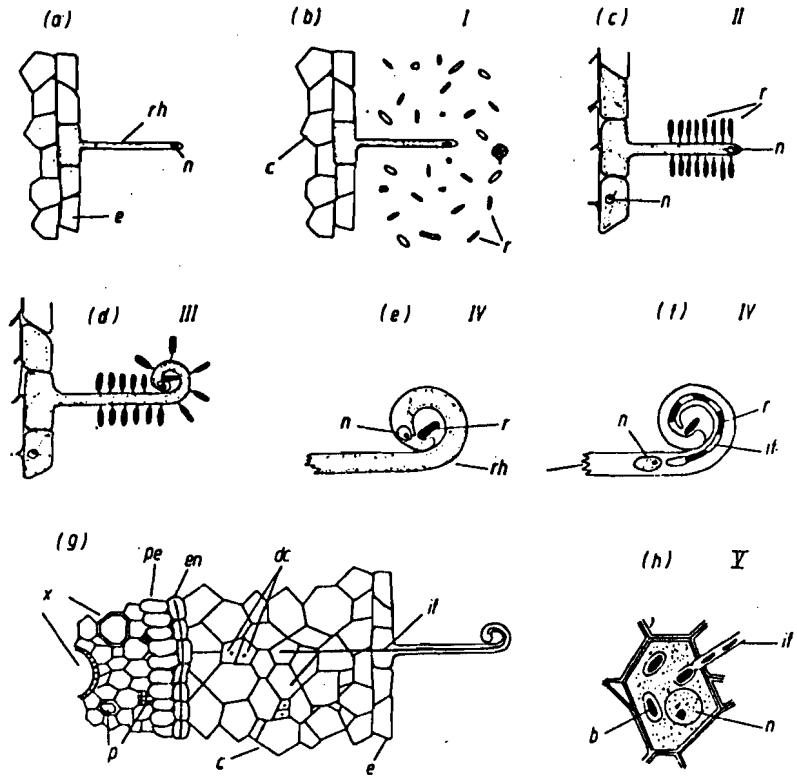


Fig. II.1.2 Etapes de la nodulation par poils absorbants :

(a) Croissance d'un poil absorbant

(b) Rhizobium dans la rhizosphère

(c) Fixation polaire des Rhizobium sur le poil absorbant

(d) Courbure en crosse du poil absorbant

(e) Invagination de la paroi du poil absorbant et formation du cordon d'infection

(f) Croissance du cordon d'infection dans le poil absorbant

(g) Croissance du cordon d'infection dans le cortex de la racine

(h) Libération des bactéries dans une cellule végétale à partir du cordon d'infection

b, bactérie ou bactéroide; c, cortex; dc, cellule en cours de division; e, épiderme; en, endoderme; if, cordon d'infection; n, noyau; p, phloème; pe, péricycle; r, Rhizobium; rh, poil absorbant; x, xylème.

(Shaw et coll. 1982)

tématique qui en se développant donnera naissance aux trois zones typiques du nodule (Fig. II.1.3). Les cellules du méristème sont souvent polyploïdiques. L'organogenèse du nodule ainsi déclanchée est due à l'intervention d'un principe inducteur dont la nature chimique est inconnue (phytohormone, transfert d'un plasmide au génome de l'hôte comme chez Agrobactérium?).

3.2.1.4. Morphologie et structure du nodule

D'après Sprent (1980) on peut distinguer essentiellement deux types de structures :

- Structure des Phaséolées (Fig. II.1.4).

Forme sphéroide. A la base du nodule il y a en général un seul faisceau vasculaire qui part de la stèle racinaire. Ce faisceau se subdivise en de nombreuses branches partant du même point, ces branches s'anastomosant à l'apex du nodule dont la croissance est donc déterminée. Les Rhizobium (bactéroides) ont la forme de bâtonnets gonflés un peu plus grands que les Rhizobium à l'état libre (une exception à cette structure chez les Phaséolées: Cajanus).

- Structure des Viciées et Trifoliées

(Pisum, Vicia, Trifolium). Ces nodules comportent à la base deux faisceaux vasculaires qui se divisent ensuite dichotomiquement. Il y a un méristème apical qui peut se diviser dichotomiquement et donner des nodules fourchus. La croissance de tels nodules est indéterminée. Chez les Viciées et Trifoliées, les Rhizobium ont des formes bactéroides typiques en XYT. Chez Cicer la structure du nodule est conforme à celle des Viciées, mais l'aspect des bactéroides (sphériques) rappelle le cas de l'Arachide.

3.2.1.5. Libération du Rhizobium dans les cellules de la plante-hôte; bactéroides.

Dans les nodules à méristème apical (Pisum, Luzerne)

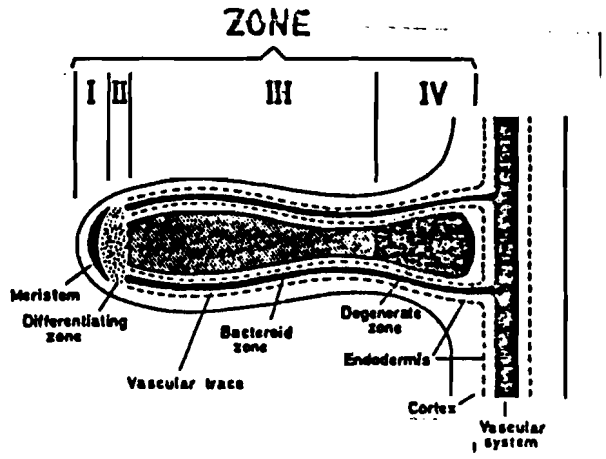


Fig. II.1.3. Coupe schématique d'un nodule à croissance indéterminée (Meijer et Broughton, 1982).

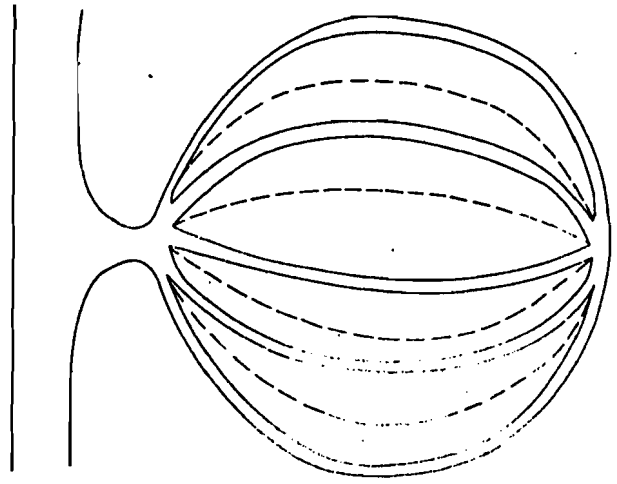


Fig. II.1.4. Schéma montrant l'arrangement des faisceaux vasculaires dans un nodule typique à croissance déterminée (Soja). Les nodules matures ont 2 à 8 mm de diamètre (Sprent,1980).

le tissu central du nodule comporte en trois zones (Fig.II.1.3):

- zone I: zone méristématique apicale
- zone II: zone riche en cordons d'infection qui déversent les Rhizobium à l'intérieur des cellules
- zone III: zone où les Rhizobium ont acquis le caractère de bactéroide dans des cellules de grande taille polyploides et contenant de la leghemoglobine.

Dans la zone II, la libération des bactéries dans les cellules de l'hôte a lieu après désagrégation de l'extrémité des cordons d'infection sous l'effet d'enzymes: pectinase bactérienne; cellulase végétale; chaque bactérie libérée est entourée d'une membrane-enveloppe. A l'intérieur de chaque membrane enveloppe :

- le Rhizobium ne se multiplie pas: il y a un seul bactéroide par membrane enveloppe, le bactéroide pouvant grossir considérablement par rapport à la bactérie libre (luzerne; trèfle);
- ou le Rhizobium se multiplie de sorte qu'il y a 6-12 ou plus bactéries par enveloppe (Soja; Vigna).

C'est au niveau des bactéroïdes que N_2 est fixé.

3.2.2. Infection au niveau du point d'émergence des racines secondaires; absence de cordon d'infection.

Chez un certain nombre de légumineuses tropicales appartenant aux genres Arachis, Aeschynomene, Stylosanthes, les nodules se forment au point d'émergence des racines secondaires et à partir de la base de ces racines.Il n'y a pas de cordons d'infection.

On peut distinguer deux cas :

3.2.2.1. Infection type Arachide

Dans le cas de l'Arachide les poils absorbants jouent un certain rôle, car l'infection démarre directement dans la cellule basale élargie du poil absorbant puis elle gagne la base du cortex

de la racine latérale pour donner naissance au nodule. Il n'y a pas cordon d'infection mais formation de poches intercellulaires remplies de Rhizobium.Ces derniers pénétrent dans les cellules où ils sont enfermés dans une membrane-enveloppe. Les cellules envahies subissent nombre de divisions,chaque cellule fille recevant des Rhizobium qui se transforment ensuite en bactéroides.

3.2.2.2. Infection type Stylosanthes

Les poils absorbants ne sont nullement impliqués: les Rhizobium envahissent directement les espaces entre les cellules épidermiques du cortex et pénétrent dans le cortex racinaire sans former des pochesintercellulaires typiques de l'arachide. Le développement du nodule se fait comme pour l'arachide par division des cellules envahies par les Rhizobium,chaque cellule fille renfermant les Rhizobium en cours de multiplication.

3.2.3. Infection des tiges de Sesbania rostrata (Fig. II.1.1).

Quelques légumineuses appartenant aux genres Sesbania et Aeschynomene ont une double nodulation: racinaire et caulinaire (nodulation de tige). Chez Sesbania rostrata l'infection des tiges se fait au niveau de sites de nodulation qui ressemblent à l'oeil nu à de petites pointes disposées régulièrement suivant trois ou quatre génératrices sur toute la longueur de la tige. Ils sont constitués par une ébauche de racine qui perce l'épiderme de la tige. Les sites de nodulation présentent deux caractéristiques remarquables:(1) ils sont préformés et l'on connait donc à l'avance l'emplacement précis où les nodules vont apparaître; (2) ils sont continuellement formés lors de la croissance de la tige, et restent sensibles à l'infection par les Rhizobium pendant toute la vie de la plante.

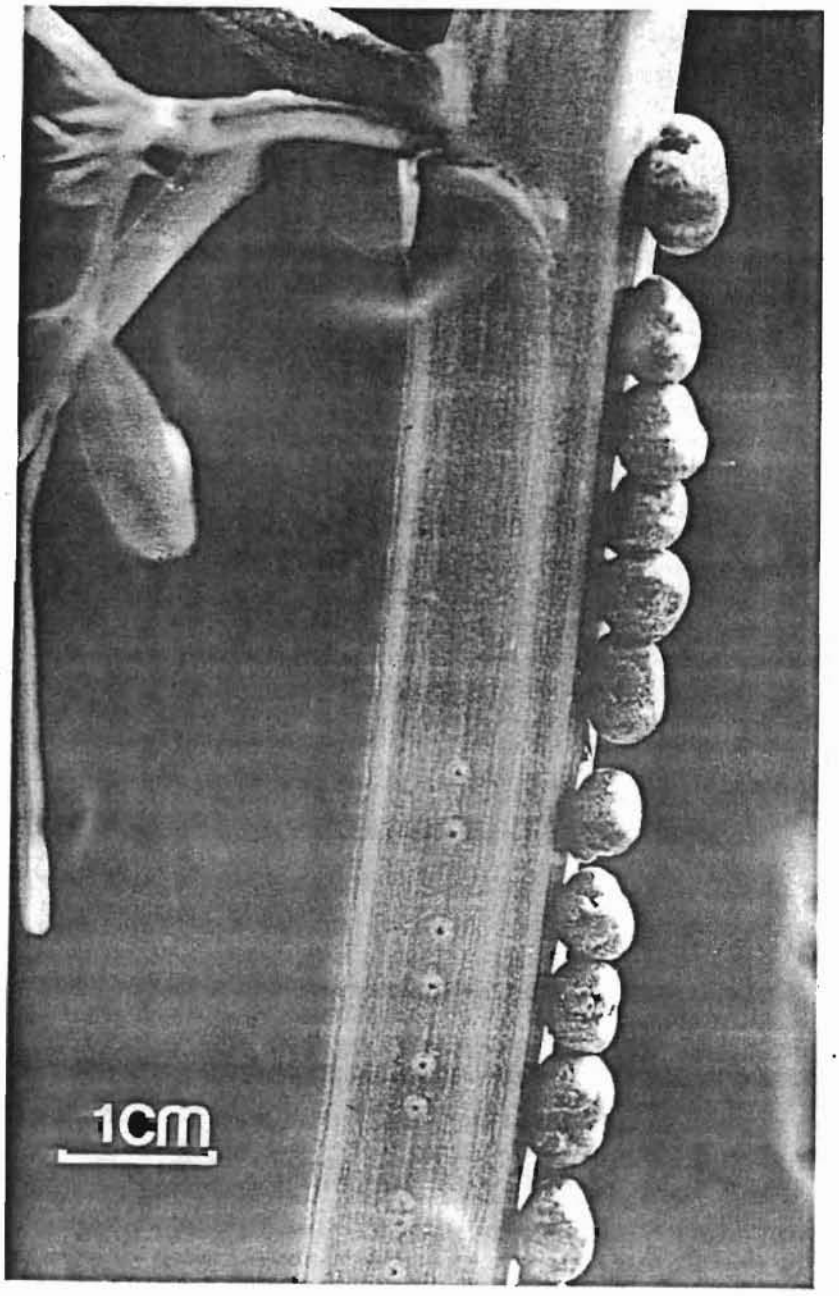


Fig. II.1.1. Tige de Sesbania rostrata. Sur la face antérieure on observe une rangée de sites de nodulation non infectés ressemblant à de petites pointes. Sur le côté, on observe une rangée de nodules provenant de l'infection des sites de nodulation inoculés par la souche de Rhizobium de tige ORS571.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

La génèse du nodule comporte trois phases principales distinctes.

(1) Formation de poches d'infection intercellulaires et de différenciation du méristème nodulaire. Après attachement des Rhizobium à la surface des cellules situées à la base de l'ébauche racinaire, dans la cavité annulaire, ceux-ci pénètrent dans l'espace intercellulaire où ils se multiplient en grand nombre, formant de véritables poches. Au même moment, on observe, sous l'effet d'un mécanisme d'activation qui reste inconnu, une de différenciation des cellules du cortex de l'ébauche racinaire. Ces cellules s'organisent alors en méristème (méristème nodulaire), avant d'être infectées par les Rhizobium.

(2) Formation des cordons d'infection. A partir des poches intercellulaires, des cordons d'infection se forment. Ils se divisent en de nombreuses branches qui pénètrent à l'intérieur des cellules du méristème nodulaire.

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

Le mode d'infection de la tige de Sesbania rostrata est donc unique parmi les légumineuses car on y trouve à la fois une invasion intercellulaire des Rhizobium, comme chez l'arachide et la formation de cordons d'infection, comme chez les légumineuses tempérées.

3.5. Processus de reconnaissance et mécanisme de la spécificité d'hôte.

"Depuis ces dernières années, de nombreuses recherches ont été menées sur la structure antigénique des Rhizobium dans le but

d'expliquer le mécanisme de la spécificité d'hôte. L'orientation de ces travaux a été, dès le début, influencée par les résultats relatifs au rôle des antigènes communs dans les associations parasitaires entre plantes et germes pathogènes. Chez les bactéries phytopathogènes, il existe en effet une spécificité d'infection car celles-ci ne colonisent qu'un éventail restreint de plantes se limitant parfois à une seule variété. Or, dans quelques-unes de ces associations spécifiques hôte-parasite, on a mis en évidence la présence d'anticorps de spécificité antigénique semblable. La bactérie pathogène donne une réation antigénique avec l'antisérum de la plante-hôte et vice versa. Comme l'augmentation de la tolérance du pathogène par l'hôte s'accompagne souvent d'une augmentation de l'affinité antigénique, cette hypothèse antigénique est fréquemment prise en considération pour expliquer la spécificité d'infection de ces bactéries et puisque le Rhizobium, par certaines de ses propriétés, peut être considéré comme une bactérie phytopathogène spécifique des légumineuses, il était tentant de rechercher comme base de leur spécificité d'hôte des propriétés antigéniques.

Dans la symbiose des légumineuses, les résultats les plus intéressants concernant la nature des déterminants possibles de la spécificité d'hôte portent sur les lectines: ce sont des glycoprotéines de poids moléculaire compris entre 40000 et 130000 qui ont la propriété de se fixer spécifiquement aux sucres présents à la surface des cellules, formant des réactions de type antigène-anticorps. Elles sont aussi appelées phytohémagglutinines ou phytoagglutinines à cause de leur combinaison spécifique avec les erythrocytes provoquant leur agglutination (en réalité, on considère maintenant que ces phytohémagglutinines ne représentent pas toutes les lectines, certaines ne comportant pas de site de fixation pour les érythrocytes)

Les légumineuses sont particulièrement riches en lectines et chez le soja par exemple, elles représentent jusqu'à 3% des protéines totales. La source principale est constituée par les cotylédons, mais tous les organes de la plante en possèdent.

Soja. Les premiers éléments d'un mécanisme de reconnaissance possible entre Rhizobium et légumineuses impliquant les lectines ont été découverts par Bohlool et Schmidt en 1974: par marquage avec l'isothiocyanate de fluorescéine, ils avaient constaté, à l'aide de la microscopie de fluorescence, que la lectine de soja se combine avec la plupart des R. japonicum compatibles testés mais jamais avec les souches non compatibles , ce qui les a amenés à penser que les lectines de la surface des racines pourraient présenter un site de reconnaissance spécifique capable de se combiner avec un polysaccharide particulier de la surface des Rhizobium compatibles. L'association bactérie-lectine est inhibée par l'addition d'un haptène comme le D-galactose ou la N-acétyl-D-galactosamine"(Dénarié et Truchet, 1979).

Trèfle. "Une glycoprotéine, la trifoliine, a été isolée à partir du Trèfle (Dazzo et al., 1978). Dans ce cas encore, les lectines isolées de graines de racines ont le même effet: elles agglutinent spécifiquement les souches virulentes de R. trifolii et l'agglutination est inhibée par un haptène, le 2-désoxyglucose" (Dénarié et Truchet, 1979).

Les récepteurs bactériens spécifiques des lectines semblent localisés dans le matériel capsulaire (CPS). Mais d'autres polysaccharides de la surface pourraient être impliqués : lipopolysaccharides (LPS), exopolysaccharides (EPS), glucanes y compris cellulose. Ces résultats montrent que le soja et la trèfle synthètisent des protéines (lectines) qui peuvent interagir spécifiquement avec les polysaccharides[1] de surface des cellules de leurs

Rhizobium spécifiques. Mais ceci ne prouve nullement que l'hypothèse de la reconnaissance par les lectines est correcte. Il serait nécessaire de prouver que "les lectines et les polysaccharides de la surface des cellules" interviennent effectivement dans le processus d'infection (Bauer, 1981).

4. Fonctionnement du nodule

4.1. La photosynthèse, source d'énergie

"L'énergie nécessaire à la formation et au fonctionnement des nodosités est évidemment fournie par la photosynthèse. Une augmentation de la teneur en CO_2 au niveau des feuilles diminue chez le Soja la photorespiration et provoque une stimulation de la croissance de la plante, une augmentation du nombre des nodules et de la fixation de N_2 (Hardy et Havelka, 1975). La proportion de produits de la photosynthèse transférée dans les nodosités varie de façon importante en fonction des espèces et du stade de développement des plantes; on peut cependant l'estimer à environ 8 à 15%" (Dénarié et Truchet, 1979). Cette consommation d'énergie due à la fixation de N_2, exprimée en fonction du C fixé par la plante, est de 1-20 g C/g N_2 fixé, les valeurs les plus fréquentes étant comprises entre 3 et 10 g. Ces données indiquent que le symbiote détourne à son profit une partie non négligeable des photosynthétats de la plante.

Pour améliorer le rendement (efficience) de la fixation de N_2 on a préconisé l'utilisation de souches de Rhizobium Hup^+ (cf p 15) qui possèdent la facilité de recycler H_2 produit au cours du processus de fixation. En fait on ne sait pas encore si ce recyclage de N_2 permet de réaliser une économie d'énergie.

Ce problème de l'efficience de la symbiose est compliqué par le fait que le Rhizobium (comme d'ailleurs Frankia ou Glomus) pourrait compenser le coût de la symbiose en améliorant la photosynthèse chez la plante (Tableau II.1.4). "Le produit de photosynthèse majeur transporté des feuilles vers les nodules par le phloème est le saccharose. Il pourrait être hydrolysé dans le nodule par une invertase d'origine végétale (Bergersen, 1974). L'accumulation de réserves carbonées dans les bactéroïdes s'effectue sous forme de poly-β-hydroxybutyrate; le rôle de ce polymère n'est pas clairement établi dans la fixation de N_2" (Dénarié et Truchet, 1979).

4.2. Enzymes impliquées dans la réduction de N_2 en ammonium

4.2.1. La nitrogénase

L'enzyme qui catalyse la réduction de N_2 chez tous les systèmes biologiques fixateurs de N_2 est appelée la nitrogénase. En réalité c'est un complexe enzymatique constitué de deux protéines distinctes, ni l'une ni l'autre n'étant active à l'état isolé:

- protéine I ou molybdoprotéine : grosse molécule tétramérique (PM $\geq$ 200.000) contenant du molybdène et du fer;
- protéine II ou ferroprotéine molécule plus petite (PM = 60.000 à 70.000) contenant seulement le fer et la fonction sulfure labile.

(1) In vitro La nitrogénase c'est-à-dire les protéines I et II, sont capables de réduire l'azote moléculaire (N_2) en ammoniac (c'est-à-dire de fixer N_2) lorsque les conditions suivantes sont réunies :

a) présence d'un donneur d'électrons, hydrosulfite de sodium ($S_2O_4Na_2$)

b) absence d'oxygène (qui altère les protéines)

c) présence d'une source d'énergie (ATP)

d) présende d'ions Mg^{++}.

La nitrogénase peut non seulement réduire N_2 mais toute une série de molécules à triple liaison, tels que l'azide (N_3^-)

Tableau II.1.4 Fixation de $^{14}CO_2$ (mg par gramme de carbone dans les tiges par heure) et fixation de $^{15}N_2$ (mg par g de nodule) par des fèves âgées de 4 semaines en symbiose ou non avec des champignon VAM (mycorrhizal) ou un Rhizobium (Pang et Paul, 1980)

		N_2 fixed	
	$^{14}CO_2$ fixation (mg g^{-1} shoot carbon $hour^{-1}$)	Total (mg)	Rate (mg g^{-1} of nodule)
Control	17.4		
Mycorrhizal	18.8*		
Rhizobial	18.2†	0.78	16.2
Mycorrhizal-rhizobial	20.2*	1.06†	15.8

* P <.05 † P <.10

l'acide cyanhydrique (HCN) et l'acétylène (C_2H_2) (cf Fig II.1.5). C'est sur cette dernière propriété qu'est fondée la méthode indirecte de mesure de l'activité nitrogénasique, le dosage se ramenant au dosage de l'éthylène (C_2H_4) provenant de la réduction de C_2H_2 par la nitrogénase (cf p. 22). En l'absence d'autres substrats et sous atmosphère d'argon la nitrogénase catalyse aussi la réduction des ions H^+ en hydrogène gazeux H_2.

(2) In vivo (Fig. II.1.6) a) Les sources d'électrons nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase varient suivant les organismes fixateurs considérés: composés du cycle de Krebs dans le cas du Rhizobium, cycle photochimique ou produits de fermentation des sucres dans d'autres systèmes. Toutes ces sources d'électrons ont une propriété commune: ce sont de petites protéines fortement réductrices: flavodoxines ou ferrédoxines.

b) La protection de la nitrogénase contre l'oxygène est réalisée in vivo par l'intervention de différents processus: compartimentation cellulaire chez les cyanobactéries (hétérocystes) ou chez les non-légumineuses (algues); respiration active (Azotobacter); chez Rhizobium la protection respiratoire pourrait intervenir, ainsi que certaines enzymes: hydrogénase (celle-ci oxydant H_2, d'où flux important d'e^- qui maintient un pouvoir réducteur élevé), SOD.

c) L'énergie nécessaire (ATP) est produite chez le Rhizobium par oxydation des hydrates de carbone par le cycle de Krebs couplée à une phosphorylation oxydative au niveau de la chaine respiratoire.

4.2.2. Hydrogénase et nitrate-réductase

On a déjà signalé que la nitrogénase est capable de catalyser la réduction des cations H^+ en H_2. Il y a donc dégagement de H_2 pendant la fixation de N_2. Mais ce dégagement peut être faible ou nul si l'hydrogène (H_2) produit est recyclé par une autre enzyme, l'hydrogénase.

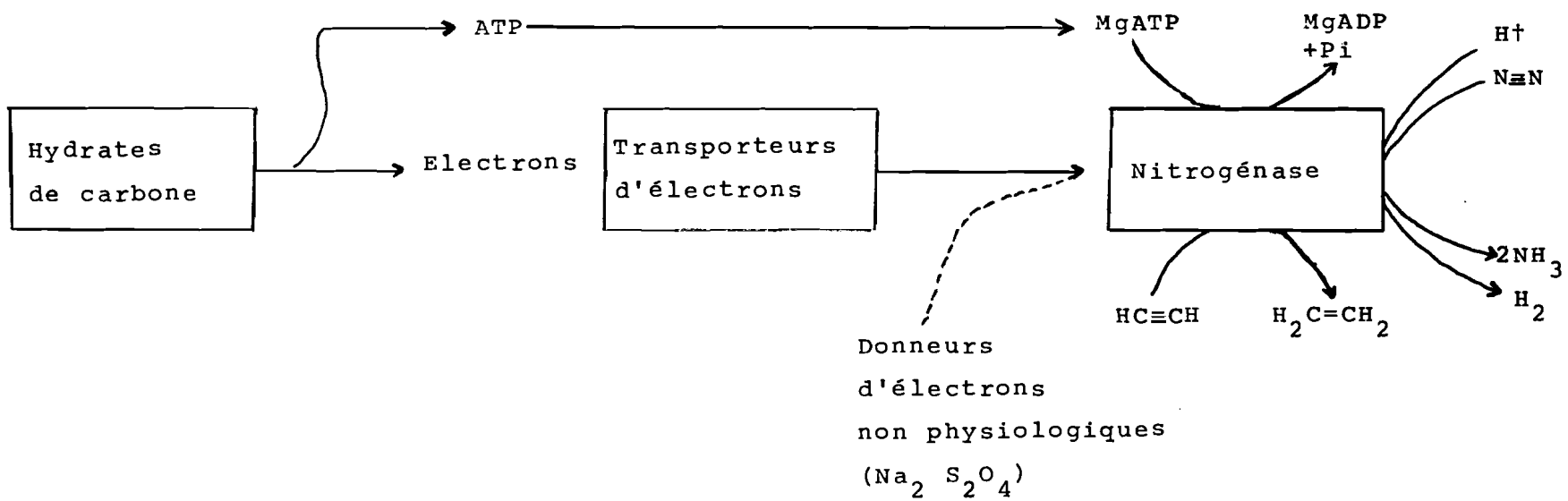


Fig. II.1.5 . Schéma du mécanisme de la fixation de N_2 par la nitrogénase (Evans et Barber, 1977)

(On a effectivement trouvé cette enzyme dans la membrane des bactéroides) :

$$H_2 \underset{}{\overset{\text{hydrogénase}}{\rightleftharpoons}} 2H^+ + 2e^-$$

On a émis l'hypothèse que les souches de Rhizobium qui possèdent une hydrogénase (souches Hup^+, pour hydrogène uptake) conféreraient aux systèmes fixateurs un meilleurs efficience (rendement énergétique plus élevé).

Une autre enzyme membranaire, la nitrate-réductase respiratoire, est fréquente chez les bactéroides: elle contribuerait à la fourniture d'ATP nécessaire à la fixation de N_2 dans certaines conditions.

Il faut noter que l'hydrogénase et nitrate réductase respiratoires ne sont pas indispensables à la fixation de N_2.

4.3. L'assimilation de l'ammonium

Chez les procaryotes et les plantes les voies principales de l'assimilation de l'ammonium sont les suivantes :

1) Si l'ammonium est abondant le microorganisme fabrique de la glutamate deshydrogénase (GDH) et l'utilise pour fabriquer du glutamate à partir d'α-cétoglutarate:

α-cétoglutarate + NH_4^+ + NAD(P)H $\xrightarrow{GDH}$ glutamate + NAD(P) (NADPH représente la forme réduite d'un reducteur biologique important: NADP)

2) Si la concentration en ammonium est faible, une autre voie, plus compliquée, est utilisée. Tout d'abord une partie du glutamate préexistant est converti au glutamine par une enzyme, la glutamine synthétase (GS) qui requiert pour fonctionner de l'ATP

glutamate + NH_4^+ + ATP $\xrightarrow{GS}$ glutamine + ADP + Pi.

En suite la glutamine formée réagit avec l'α-cétoglutarate, grâce à une autre enzyme, la glutamate synthétase (GOGAT)

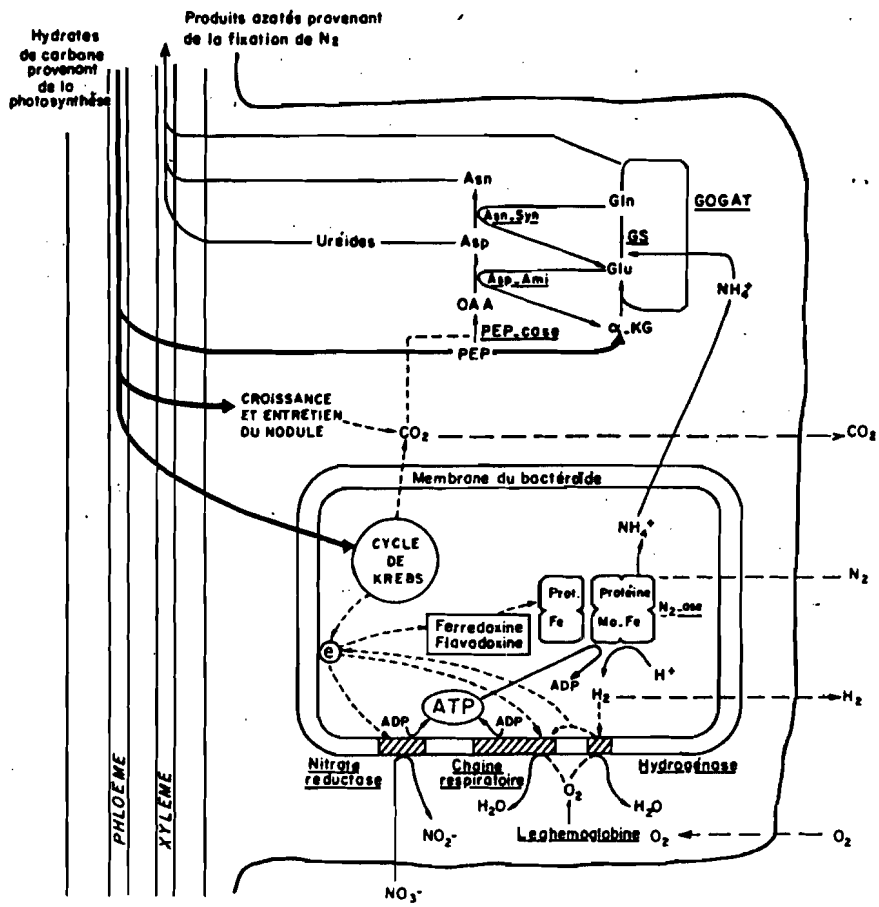


Fig. II.1.6 – Schéma représentant le fonctionnement d'une nodosité (Dénarié et Truchet, 1979).

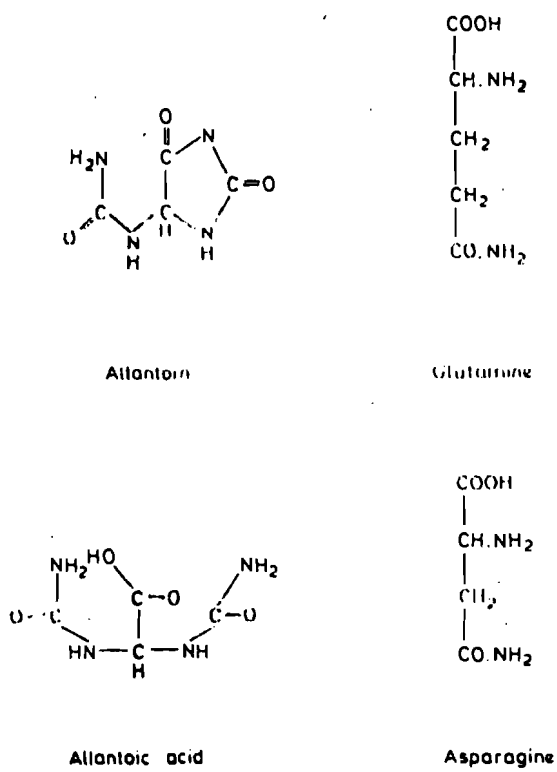


Fig. II.1.7. Principaux produits exportés par les nodules des légumineuses.

glutamine + α-cétoglutarate + NAD(P)H+ $\xrightarrow{\text{GOGAT}}$

2 glutamates + NAD(P)

In vitro. Chez Rhizobium, seule la voie GS-GOGAT intervient dans l'assimilation de l'ammonium.

In vivo (bactéroides) l'activité GS-GOGAT devient très faible. On admet que l'assimilation de l'ammonium est réalisée par la plante-hôte.

Cette assimilation a lieu au niveau des nodules. L'azote en est exporté (séve brute) sous forme d'amides, d'uréides et d'acides aminés en proportion variables selon les espèces de légumineuses.

(1) Légumineuses à uréides (allantoine et acide allantoique): légumineuses chez lesquelles la majeure partie des produits de fixation de N qui sortent du nodule par le xylème sont sous forme d'uréides; ex: Soja, cowpea (Vigna unguiculata), Vigna mungo, Vigna radiata, Cajanus cajan, Phaseolus vulgaris.

(2) Légumineuses à amides (la plupart des légumineuses tempérées) chez lesquelles l'azote est exporté des nodules sous forme d'aspartate,asparagine ; ex : Viciées; Trifoliées.

La structure de ces composés est donnée à la Fig.II.1.7. Dans la sève brute (xylème) des légumineuses on trouve à la fois de l'azote sous forme de nitrate (azote du sol) et de l'azote sous forme d'ureides (légumineuses à uréides) ou de l'azote aminé (légumineuses à amides et acides aminés). La quantité d'uréides dans la sève brute étant proportionnelle à l'activité fixatrice d'azote,on a chez les plantes à ureides, cherché à utiliser cette propriété pour évaluer indirectement la fixation de N_2 (Herridge).

4.4. La leghémoglobine

L'infection des légumineuses par les Rhizobium entraine l'apparition de deux autres substances qui n'existent pas dans les tissus non infectés: la vitamine B12 et la leghémoglobine.
Le rôle de la vitamine B12 semble sans relation avec la fixation de N_2.

La leghémoglobine est une chromoprotéine qui n'a pu être détectée dans les organes végétaux autres que des nodules. Elle est responsable de la coloration en rouge du contenu nodulaire.
Contrairement à la vitamine B12, la leghémoglobine n'est présente que dans les nodules fixateurs d'azote. Sa concentration varie au cours du stade végétatif de la plante; elle peut atteindre de 40% des protéines solubles des nodules. La leghémoglobine comprend :

- un groupement prosthétique(hème): la protoporphyrine formée de quatre cycles pyrrole avec un atome de fer; (l'hème est synthétisé par le Rhizobium);
- un composant protéique, la globine (cette partie de la molécule est codée et synthétisée par la plante).

La leghémoglobine comporte plusieurs composants de poids moléculaire voisin qui pourraient avoir des fonctions différentes car ils présentent des variations quantitatives spécifiques au cours des différents stades végétatifs de la plante.
La localisation intracellulaire de la leghémoglobine est discutée: pour certains , elle serait localisée entre la paroi du Rhizobium et la membrane enveloppe, pour d'autres, elle serait localisée dans le cytoplasme de la cellule-hôte.
Le rôle essentiel de la leghémoglobine est d'approvisionner l'oxygène les bactéroides dans les conditions optimales pour la fixation de N_2.

On a souvent suggéré que la leghémoglobine jouait aussi un rôle de protection de la nitrogénase contre l'oxygène; mais ce r rôle est refuté par certains auteurs (J. Rigaud).

4.5. Effectivité de la symbiose

On désigne sous le terme d'effectivité (ou efficacité)[1] l'aptitude d'un système symbiotique (Légumineuse et son Rhizobium) à fixer l'azote. Il existe divers degrés dans l'effectivité. L'effectivité dépend à la fois de déterminants appartenant à la plante-hôte et de déterminants appartenant à la souche de Rhizobium.

4.5.1. Si l'on se place sous l'optique du microbiologiste, il est nécessaire de préciser la nature de l'hôte (cultivar). Soit une plante-hôte donnée; celle-ci peut s'associer à des souches de Rhizobium dont l'efficience peut couvrir une gamme allant de l'efficience maximum à une efficience nulle. Une souche non efficiente (= inefficiente) peut noduler la plante-hôte mais ne fixe pas N_2.

Le criblage de souches de Rhizobium en fonction de leur efficience se fait en comparant le poids des plantes-hôtes inoculées avec ces différentes souches et cultivées sur un milieu sans azote (Fig. II.1.9). Le dispositif de Gibson (Fig. II.1.8) est souvent utilisé pour ce type de criblage.

4.5.2. Il est possible par sélection de la plante-hôte de trouver des combinaisons "cultivars x souches de Rhizobium" hautement efficientes.

5. Fixation de N_2 au champ (LaRue et Patterson, 1981)

Alors que des progrès considérables ont été accomplis au cours des dernières années dans le domaine de la physiologie et plus

[1] Certains auteurs utilisent à tort le terme d'efficience qui implique une idée de rendement énergétique.

récemment de la génétique des Rhizobium, nous ne connaissons que rarement avec précision la quantité d'azote fixée par une récolte donnée.

5.1. Méthodes d'estimation

5.1.1. Bilan de l'azote

Pour effectuer un bilan d'azote précis, il est nécessaire de mesurer tous les intrants (inputs) et les extrants(ouputs) ainsi que les accroissements (ou diminutions)de teneur en azote du système considéré.

- Les intrants (I) autre que la fixation de N_2 sont :
les précipitations, l'adsorption de NH_3, la poussière les déjections des animaux, l'altération des minéraux, les engrais.
- Les extrants(S)sont:la dénitrification, la volatisation de NH_3, les feux (N_2, NO, N_2O), le lessivage, l'érosion, les récoltes, les animaux.
- Les accroissements ΔN de la teneur en N du système considéré doivent porter sur le sol (y compris la litière) et la biomasse végétale (plantes de toutes tailles) et animale.

Si l'on désigne par F la fixation de N_2,on peut écrire:

$$\Delta N = F + I - S$$

$$\text{d'où } F = \Delta N + S - I$$

Une telle approche ne peut être pratiquée que si ΔN porte sur des longues périodes de temps ou sur la comparaison de système d'âges très différents placés dans les mêmes conditions.
La méthode des bilans a été aussi été utilisée pour les expériences faites en lysimètres (voir exemple figurant au Tableau II.1.5).

5.1.2. Méthode "par différence"(Williams et al., 1977).

Principe. La quantité d'azote fixé est égale à la différence entre la quantité totale d'azote contenue dans la biomasse d'une plante fixatrice d'azote et la quantité totale d'azote contenue dans une plante non fixatrice d'azote (c'est une plante dont l'azote provient uniquement du sol).

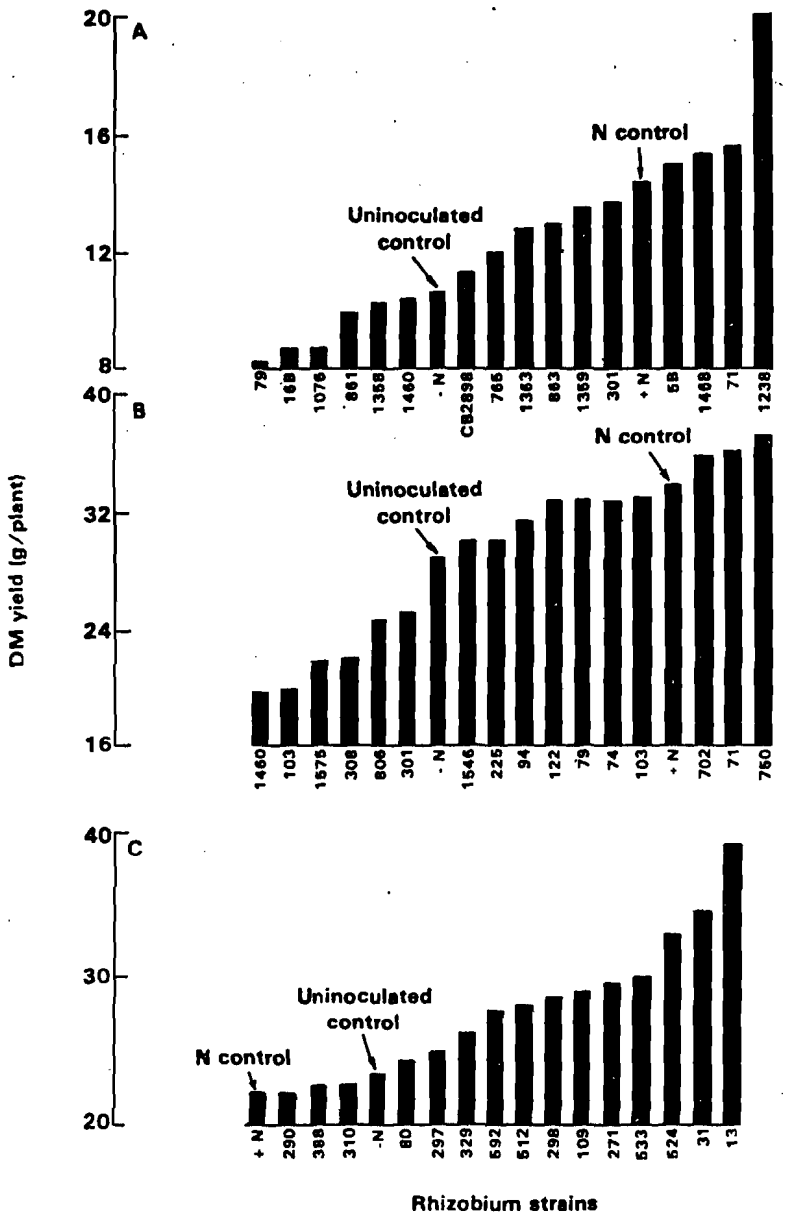


Fig. II.1.9. Sélection de Rhizobium: Comparaison du poids sec (DM yield) de différentes souches inoculées à trois plantes : (A) Stylosanthes capitata 1019; (B) Zornia sp. 728; and, (C) Desmodium distortum 335. (CIAT, 1978).

Il y a trois versions de la méthode par différence

5.1.2.1. Comparaison entre une légumineuse et une non légumineuse.

Ex: Si une parcelle de vesce renferme 149 kg N/ha et la parcelle contiguë de blé renferme 38 kg N/ha, la fixation d'azote par la vesce est de 111 kg N_2/ha. Une telle méthode suppose a priori :

(1) que l'azote de la non-légumineuse provient uniquement du sol;

(2) que la légumineuse et la non-légumineuse absorbent l'azote du sol dans les mêmes proportions et que les différences liées aux caractéristiques des systèmes racinaires(morphologie, distribution des racines) sont négligeables.

La validité de la deuxième hypothèse est discutable. L'expérience montre que la fixation d'azote ainsi évaluée dépend de la non-légumineuse.

5.1.2.2. Comparaison entre une légumineuse et la même légumineuse non nodulante.

On sait qu'il existe des génotypes de légumineuses non nodulantes. L'avantage de l'utilisation d'un tel génotype est que l'on peut a priori admettre que le mode de croissance, la morphologie des racines et les modalités d'absorption de l'azote du sol sont identiques. Cependant on a remarqué que la lignée nodulante pouvait absorber plus d'azote du sol que la lignée non nodulante (effet synergique).

Exemple: on a aussi estimé que la fixation de N_2 par le soja était de 14,7 - 84 kg N_2/ha (cf Tableau II.1.7). Malheureusement il existe des lignées non nodulantes seulement pour quelques cultivars de soja.

5.1.2.3. Comparaison de légumineuses inoculées et non inoculées

(On peut aussi utiliser comme témoin l'inoculation avec une souche ineffective).

Cette méthode requiert une sol dépourvu de toute souche de Rhizobium natif spécifique.

Exemple: des sojas non inoculés ont accumulé 76 kg N/ha alors que des

Tableau II.1.5. Exemple de bilan de N exprimé en g N/m^2 effectué dans des lysimètres de $1/2\ m^3$. La comparaison des colonnes (1) et (3) permet d'évaluer la fixation de N_2 par *Sesbania rostrata* (Rinaudo *et al.*, 1982).

	Traitements		
	Engrais vert *S. rostrata*	Engrais azoté (60 kg N/ha)	Témoin
	(1)	(2)	(3)
N exporté par le riz			
grain	10.3 ± 2.1	4.8 ± 0.4	2.4 ± 0.5
paille	7.2 ± 1.8	2.4 ± 0.4	1.6 ± 0.5
total partiel	17.5 ± 3.8	7.2 ± 0.6	4.0 ± 0.8
Pool d'azote du sol après la récolte			
fraction 2 mm	148.3 ± 11.7	135.5 ± 6.6	128.8 ± 11.6
fraction 2 mm	28.6 ± 8.4	3.1 ± 1.3	3.6 ± 0.7
total partiel	176.9 ± 14.4	138.6 ± 5.3	132.4 ± 12.2
Total général	194.4 ± 17.1	145.8 ± 4.9	136.4 ± 12.2

sojas inoculés ont accumulé 387 kg N/ha; la fixation de N_2 a donc été de 311 kg N_2 fixé/ha. La difficulté majeure que soulève cette méthode est d'éviter la contamination des parcelles témoin.
On notera en outre que la méthode n'est valable que si la nodulation n'altère ni la structure des racines ni l'absorbtion d'azote du sol, ce qui n'est pas prouvé.

5.1.3. Méthode de "l'équivalent engrais"

Cette méthode peut présenter plusieurs variations.

5.1.3.1. Cas d'un mélange d'une légumineuse et d'une graminée (étude de prairies)

On compare la production de la graminée en mélange avec une légumineuse avec la production de la graminée en peuplement pur ayant reçu différents niveaux d'engrais azoté.

5.1.3.2. Effet de la légumineuse sur la culture suivante (étude de l'engrais vert).

On compare l'effet sur le rendement de la culture suivante de l'azote apporté au sol par les légumineuses engrais vert et de différentes doses d'azote engrais.
Exemple: l'étude de l'effet de la vesce-engrais vert sur une culture d'orge a montré que la vesce apportait au sol 107 kg N/ha.

5.1.3.3. Comparaison de la légumineuse inoculée avec la légumineuse non inoculée ayant reçu différents apports d'engrais N

Cette méthode est en fait une variante de la méthode décrite au paragraphe 5.1.2.3. Elle présente l'avantage sur cette dernière (avec laquelle elle peut être combinée) de permettre la comparaison de plantes ayant pratiquement le même développement racinaire, donc ayant exploité pratiquement les mêmes horizons et le même volume de sol.

Les méthodes de l'équivalent engrais requièrent les deux précautions suivantes :

1) l'engrais utilisé ne doit pas apporter au sol un autre élément que N : il faut donc utiliser l'urée;

2) les doses d'urée doivent être telles qu'elles correspondent à la zone où la réponse de la plante à l'apport N est linéaire.

Les méthodes de l'équivalent engrais présentent l'inconvénient de surestimer la fixation de N_2 car, dans le sol, l'engrais azoté est soumis au lessivage et à la dénitrification (leur rendement est souvent seulement de 40 - 60%).

Un autre inconvénient des méthodes équivalent engrais réside dans le fait que, contrairement aux méthodes isotopiques, elles ne permettent pas de connaître le % de N fixé par rapport à l'azote total de la plante. La connaissance de ce pourcentage est essentielle lorsque les plantes témoin et les plantes fixatrices de N_2 ont le même rendement. Cependant ces méthodes présentent l'intérêt de fournir une indication de la valeur économique de la fixation de N_2.

5.1.3. Méthode indirecte de la réduction d'acétylène

Pratiquement on met l'échantillon à incuber (nodule, système racinaire ou plante entière) dans une enceinte renfermant 1-20% d'acétylène pendant 30-120 min. On prélève un échantillon de gaz et la quantité d'éthylène formé est déterminé par chromatographie en phase gazeuse. Il existe de nombreux dispositifs pour effectuer cette mesure.

La nitrogénase réduit l'acétylène en éthylène (cf p.13) suivant la réaction :

$$C_2H_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow C_2H_4$$

$$\text{ou } 3C_2H_2 + 6H^+ + 6e^- \longrightarrow 3\ C_2H_4$$

alors que la réduction de N_2 (fixation de N_2) se fait suivant la réaction

$$N_2 + 6H^+ + 6e^- \longrightarrow 2\ NH_3$$

La principale hypothèse sur laquelle est fondée la méthode à l'acétylène concerne le rapport (dit facteur de conversion) C_2H_4/N_2 fixé. Pendant longtemps, on a admis qu'à 1 mole de N_2 réduit correspondait 3 moles d'éthylène, le rapport de conversion étant de 3:1.

On pense actuellement que la réaction globale se rapproche plus de la suivante :

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- \longrightarrow 2NH_3 + H_2$$

car les protons (H^+) entrent en compétition pour les électrons (cf Fig. II.1.5).
(Dans le cas de l'incubation sous acétylène, la production de H_2 est inhibée). Dans les nodules intacts H_2 formé peut être recyclé par une hydrogénase et n'est pas détectable.

Théoriquement le rapport C_2H_4/N_2 fixé devrait donc être $\geq$ 4:1. Mais il varie beaucoup suivant les systèmes et les conditions d'incubation et l'expérience montre qu'il peut être compris entre 0,6 et 6,2 sans que l'on puisse l'expliquer.

Avantages de la méthode à l'acétylène

- méthode simple, rapide économique
- méthode très sensible

Inconvénients

- nécessité de déterminer expérimentalement le rapport C_2H_4/N_2 fixé
- nécessité d'effectuer de nombreuses mesures (variations journalières) car les données ne sont pas cumulatives
- mesure destructive
- grande variabilité.

5.1.4. Méthodes isotopiques

"L'abondance en ^{15}N, exprimée en atome ^{15}N % est définie par :

$$A = \frac{\text{nombre d'atomes } ^{15}N}{\text{nombre d'atomes } ^{14}N + \text{nombre d'atomes } ^{15}N} \cdot 100 \quad (1)$$

L'abondance isotopique de l'azote de l'air est de 0,3663 $\pm$ 0,0004 atome ^{15}N%.

Les techniques du marquage isotopique artificiel par ^{15}N conduisent à l'expression des compositions isotopiques en abondance

absolue ou en excès isotopique, cet excès se définissant comme la différence entre l'abondance isotopique de l'échantillon mesuré et celle de l'azote de l'air

$$e\% = A \text{ échantillon} - A \text{ air}$$

Le spectromètre de masse mesure le rapport des intensités de courants d'ions produits par les deux faisceaux d'ions correspondants aux deux isotopes: il mesure donc un rapport isotopique R qui est celui de M/e = 29 ($^{14}N^{15}N^{+}$) à M/e = 28 ($^{14}N^{14}N^{+}$).

$$R = \frac{[^{14}N^{15}N]}{[^{14}N^{14}N]}$$

On trouvera très fréquemment dans la littérature une expression de ce rapport isotopique sous la forme $^{15}N/^{14}N$, qui ne peut être qu'une simplification d'écriture" (Mariotti, 1982).

L'inconvénient majeur des méthodes isotopiques réside dans ce fait que le dosage de l'azote isotopique (^{15}N) exige le recours à un appareillage coûteux: le spectromètre de masse. Toutefois l'apparition récente sur le marché de spectromètres à émission permet d'espérer une diffusion plus grande de certaines méthodes isotopiques. Rappelons que, dans le spectromètre à émission, l'azote gazeux est excité par un oscillateur à haute fréquence et que les longueurs d'onde de la lumière émise dépend de la composition isotopiques du gaz. Les spectromètres à émission sont moins précis que les spectromètres de masse mais ils sont moins coûteux et plus faciles à manipuler.

5.1.4.1. Dilution isotopique

On cultive simultanément dans deux parcelles distinctes une plante fixatrice (légumineuse) et une plante témoin (non fixatrice), le sol ayant reçu dans les deux cas une même quantité d'engrais azoté ^{15}N (jusqu'à 30 atome % de ^{15}N). On apportera moins de 30 kg N/ha pour éviter l'effet inhibiteur sur la fixation de N_2.

Le postulat sur lequel est fondé cette méthode est que la plante témoin et la légumineuse utilisent dans les mêmes proportions l'azote du sol et l'azote de l'engrais azoté. Si l'on désigne par s_1 le pourcentage de l'azote du sol et f_1 le pourcentage de l'azote dérivé de l'engrais chez la plante non fixatrice de N_2 et par s_2 le pourcentage de l'azote dérivé du sol et f_2 le pourcentage de l'azote dérivé de l'engrais chez la plante fixatrice de N_2, on peut écrire :

$$\frac{f_1}{s_1} = \frac{f_2}{s_2} \quad (1)$$

En outre, si l'on désigne par y le pourcentage d'azote fixé dans la légumineuse, on peut écrire (Fig. II.1.10)

$$s_1 + f_1 = 1 \quad (2)$$

$$s_2 + f_2 + y = 1 \quad (3)$$

On tire des trois équations :

$$y = 1 - \frac{f_2}{f_1}$$

En pratique comme les mêmes quantités d'engrais marqué de façon identique (e% étant l'excès isotopique) ont été appliqués aux plantes non fixatrices et fixatrices d'azote on peut écrire :

$$y = 1 \frac{\text{e\% dans la plante fixatrice}}{\text{e\% dans la plante témoin}}$$

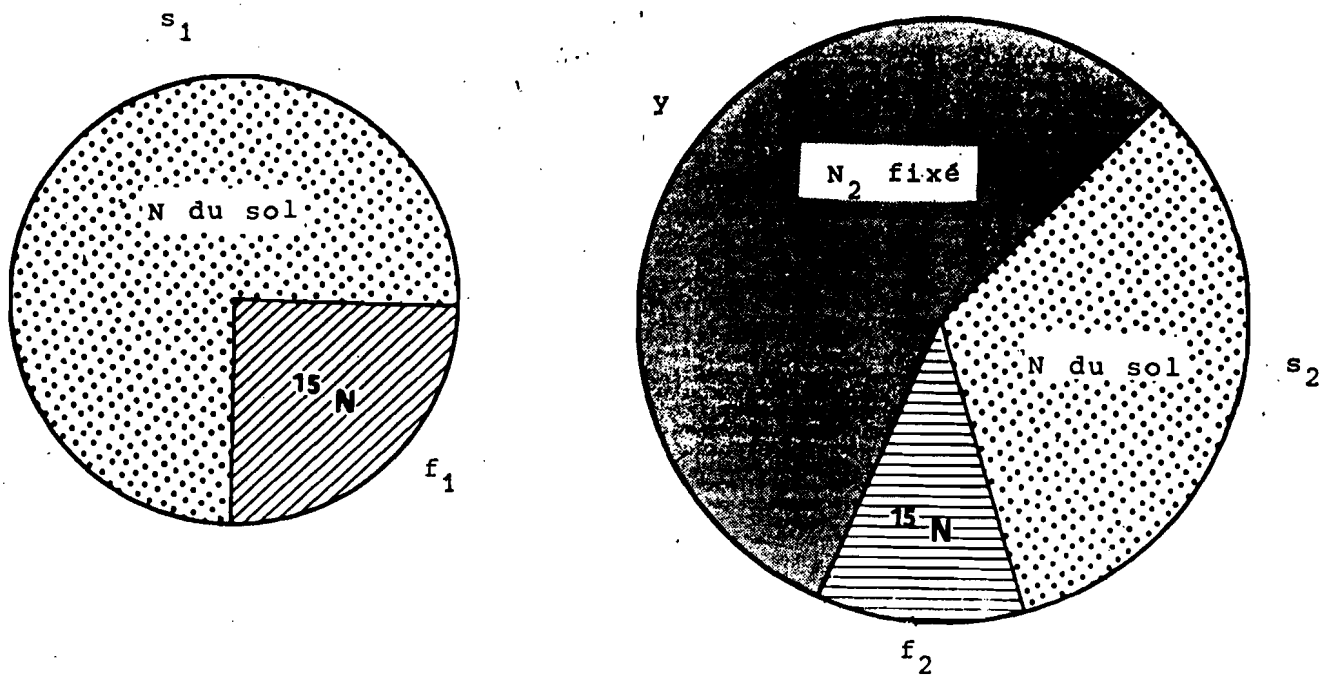
La plante qui fixe l'azote a une teneur moindre en ^{15}N que la plante témoin. Si l'on connait la teneur en azote total des plantes (ΣN) fixatrices de N_2, la fixation d'azote Y se calcule comme suit :

$$Y = y \times \Sigma N$$

L'inconvénient de la méthode réside dans le fait que la plante non fixatrice peut croître beaucoup moins bien que la plante fixatrice de N_2 et ne pas constituer un bon témoin.

5.1.4.2. Valeur A

Lorsque la dose d'azote engrais est différente dans le cas de la plante non fixatrice et dans le cas de la plante fixatrice,



Plante non fixatrice de N_2 (témoin)

Plante fixatrice de N_2

Fig. II.1.10 Principe de l'évaluation de la fixation de N_2 par la méthode de dilution isotopique.

L'analyse isotopique des plantes ayant donné les valeurs suivantes (%) : $f_1 = 0,25$

$f_2 = 0,111$

il en résulte que :

$$y = 1 - \frac{0,111}{0,25} = 1 - 0,444 = 0,555$$

Un peu plus de la moitié de l'azote de la plante provient de la fixation de N_2.

le raisonnement est le même, mais on doit faire appel à la transformation proposée par Fried et Broeschart (Valeur "A"). L'approche de la valeur A a l'avantage d'être indépendante de la dose d'azote apportée.

On postule encore ici que l'absorption de N à partir des différentes sources (N du sol N de l'air, N de l'engrais) est directement proportionnelle à la quantité d'azote disponible dans chaque source, cette quantité étant mesurée avec la même unité:

$$\frac{\%\ N \text{ dérivé de l'engrais}}{\text{Valeur "A" de l'engrais}} = \frac{\%N \text{ dérivé de fixation de } N_2}{\text{Valeur "A" de la fixation}} = \frac{\%N \text{ dérivé du sol}}{\text{Valeur "A" du sol}}$$

La valeur "A" de l'engrais est la quantité d'engrais apportée. A partir de ces équations on peut calculer facilement la valeur "A" de la fixation de N_2 qui est :

Valeur"A"plante fixatrice-Valeur"A"plante non fixatrice.

Dans l'exemple figurant au tableau II.1.6 c'est 875.

Pour avoir la quantité d'azote fixé, il faut multiplier ce chiffre par le pourcentage d'utilisation de l'engrais calculé comme suit :

$$\frac{\text{N engrais dans la plante}}{\text{N engrais appliqué au sol}} \times 100$$

Dans l'exemple donné, la fixation de N_2 est donc :

$$875 \times \frac{1,81}{20} = 79 \text{ kg } N_2/\text{ha}$$

La Fig. II.I.II. montre un exemple d'utilisation de la méthode de la valeur"A"pour l'étude de la fixation de N_2 chez la fève et le soja.

5.1.4.3. Abondance isotopique naturelle

"La précision requise pour mesurer et interpréter les faibles variations d'abondance isotopique a rendu nécessaire la mise au point de techniques analytiques, faisant appel à une mesure relative de ces abondances isotopiques.

Tableau II. 1.6. Détermination de la valeur "A" de la fixation de N_2 par la fève (Broad bean), le blé (wheat) étant utilisé comme plante témoin non fixatrice de N_2 (Zapata, 1982).

Crop used for determining "A" values	^{15}N-labelled fertilizer applied kg/ha	Nitrogen derived from the labelled fertilizer %	"A" VALUES	
			Components	Fertilizer equivalent units kg/ha
ROAD BEAN egume fixing crop	20	1.81	Soil + fixation	1085
HEAT tandard non-fixing rop	100	32.3	Soil	210
			Fixation	875 (by difference)

Tableau II.1.7 Estimations de la fixation de N_2 au champ par le soja (LaRue et Patterson, 1981)

Location	Estimate (kg N/ha)	Method	Remarks	References
Egypt	39.7	Difference	Sesame	Rizk (1966)
Iowa	14.7-84	Difference	Nonnodulating isoline, soil low in N	Weber (1966)
Delaware	33-42 80-120	C_2H_2 reduction	Fertile soil	Hardy *et al.* (1973)
Illinois	103	"*A*" value		Johnson *et al.* (1975)
Arkansas	56-161	Difference	Nonnodulating isoline	Bhangoo and Albritton (1976)
Washington	263 105	Difference C_2H_2 reduction	Uninoculated Soil low in N	Bezdicek *et al.* (1978)
Minnesota	76-152	"*A*" value	Nonnodulating isoline	Ham and Caldwell (1978)
Nebraska	43-146	"*A*" value	Nonnodulating isoline	Deibert *et al.* (1979)
Southern Ontario	78-161	C_2H_2 reduction	Inoculant trial	Muldoon *et al.* (1980)

On est ainsi conduit à l'utilisation d'une unité relative d'expression de la composition isotopique: l'unité δ.

Cette unité, s'écrit, pour l'azote :

$$\delta^{15}N = \frac{R_{échantillon} - R_{air}}{R_{air}}$$

Compte tenu des faibles variations d'abondance isotopique δ sera petit, ce qui conduit à l'utilisation pratique d'une expression en parts pour mille :

$$\delta^{15}N‰ = \left[\frac{R_{échantillon}}{R_{air}} - 1\right] . 1000$$

C'est cette dernière expression qui est utilisée en général, l'étalon choisi étant l'azote atmosphérique" (Mariotti, 1979).

D'une part l'azote du sol renferme souvent un pourcentage de ^{15}N légèrement plus élevé que l'azote de l'air. D'autre part, comme dans la plupart des réactions biochimiques, il y a, dans le processus de fixation de N_2, discrimination entre les isotopes ^{14}N et ^{15}N, le plus léger circulant plus vite dans les chaines métaboliques: il y a enrichissement en ^{14}N. Il résulte de ces deux phénomènes que le $\delta^{15}N$ de la plante fixatrice de N_2 est plus faible (par exemple 1,0 - 1,6 pour la fève) que le $\delta^{15}N$ du sol (par ex. 7,4).

Le principe du calcul permettant de déterminer la fixation de N_2 est identique à celui qui concerne la dilution isotopique. Ainsi si δF est le $\delta^{15}N$ de la plante fixatrice de N_2 et δT celui de la plante non fixatrice (en admettant que δT est identique au $\delta^{15}N$ de la fraction azotée du sol assimilable par les deux plantes) on peut écrire que le pourcentage de N_2 fixé y est :

$$y = \frac{\delta T - \delta F}{\delta T} = 1 - \frac{\delta F}{\delta T}$$

et si ΣN est la teneur en azote total de la plante fixatrice, la fixation totale de N_2 est :

$$Y = \Sigma N \left[1 - \frac{\delta F}{\delta T}\right]$$

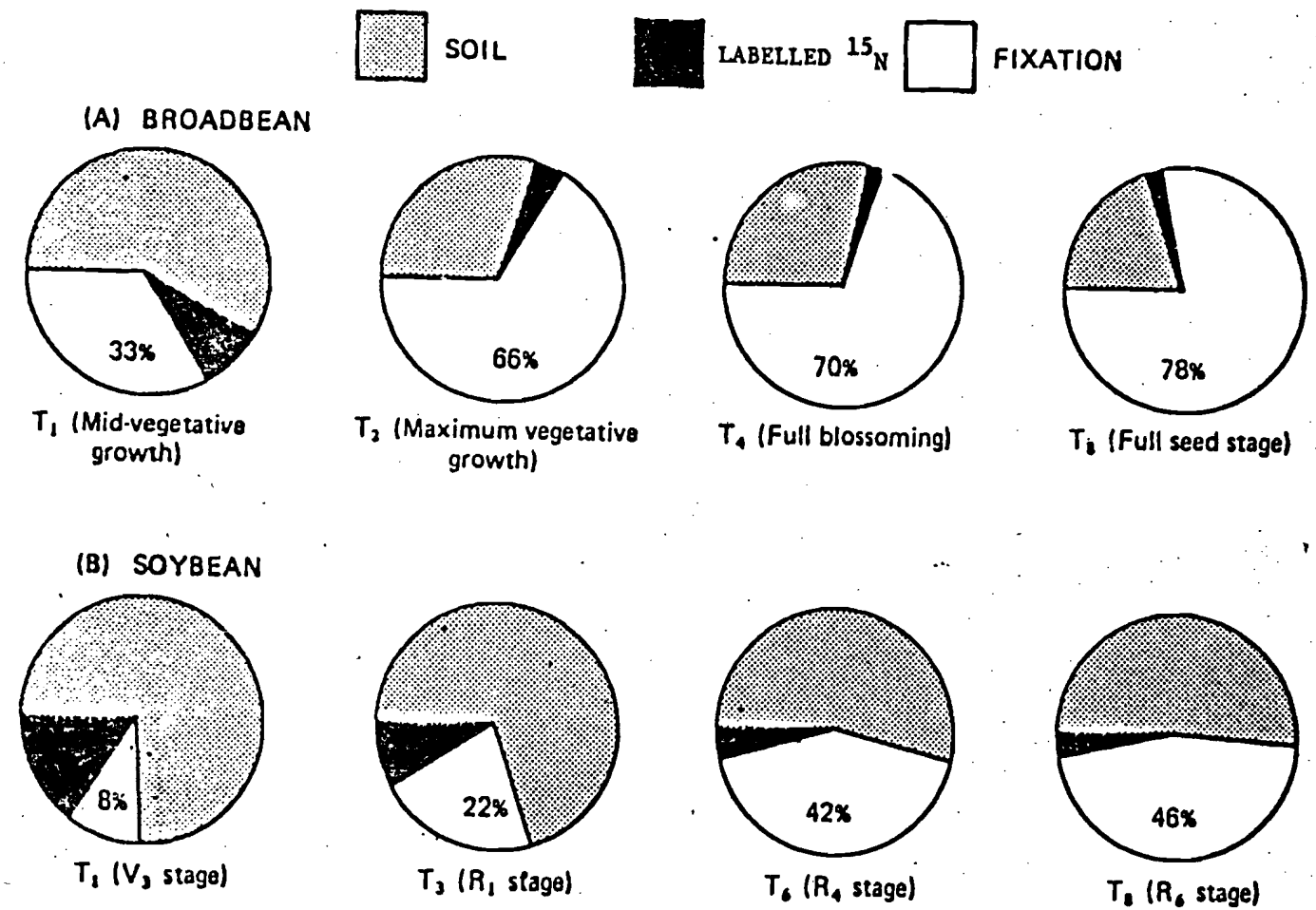


Fig. II.1.11. Exemple d'utilisation de la méthode de la valeur A dans le cas de la fève (broadbean) et du soja.
Dans chaque cercle on a porté les pourcentages d'azote provenant du sol (pointillé), de l'engrais marqué ^{15}N (no) et de l'azote fixé (blanc). (Zapata, 1982)

L'avantage de cette méthode réside dans le fait qu'il est inutile d'utiliser de l'azote ^{15}N. Mais les inconvénients ne sont pas négligeables: non uniformité du $\delta^{15}N$ naturel du sol (défaut existant dans le cas de l'enrichissement); difficulté du choix de la plante témoin; précision insuffisante.

Une amélioration de la méthode consiste à effectuer un léger enrichissement du sol en ^{15}N (A et F, Mariotti et N, Amarger).

5.1.6. Autres méthodes

D'autres méthodes ont été proposées pour évaluer la fixation de N_2 :

- l'une fondée sur le dosage de la leghémoglobine dans les nodules;
- l'autre sur la concentration des uréides dans les parties aériennes.

La première méthode ne peut avoir qu'un intérêt limité (comparaison de l'effectivité de souches associées à un cultivar).

La deuxième est applicable seulement aux légumineuses à uréides (cf p.16)

5.2. Résultats

Le tableau II.1.7 bis donne une indication des ordres de grandeur de la quantité de N_2 fixé par différentes légumineuses. On constate ainsi que la luzerne (*Medicago sativa*) fixe N_2 plus activement que l'arachide ou *Vigna radiata*. Mais il faut se garder d'extrapoler ces résultats à des sols, des climats et des années autres que celles où les mesures ont été effectuées.

Il existe en effet des variations considérables dans la fixation effective de N_2. Le tableau II.1.7 montre ainsi clairement que la fixation de N_2 par le soja peut varier considérablement suivant les sites et à l'intérieur d'un même site.

Ces variations sont attribuables à l'interférence de facteurs limitants.

Tableau II.1.7.bis. Fixation de N_2 par différentes légumineuses (NAS, 1979).

Plant	Approximate Ranges of Nitrogen Fixed (kg/ha/yr)
Alfalfa, *Medicago sativa*	100-300
Sweet Clover, *Melilotus* sp.	125
Clover, *Trifolium* sp.	100-150
Cowpea, *Vigna unguiculata*	85
Faba bean, *Vicia faba*	240-325
Lentils, *Lens* sp.	100
Lupines, *Lupinus* sp.	150-200
Peanuts, *Arachis hypogaea*	50
Soybeans, *Glycine max*	60-80
Mung bean, *Vigna radiata*	55
Velvet bean, *Mucuna pruriens*	115
Pasture legumes, *Desmodium* sp., *Lespedeza* sp.	100-400

Sources: Adapted from R. C. Burns, and R. W. F. Hardy, 1975. *Nitrogen fixation in bacteria and higher plants.* Berlin: Springer-Verlag; and W. S. Silver, and R. W. F. Hardy, 1976. *Biological nitrogen fixation in forage and livestock systems.* American Society of Agronomy Special Publication No. 28. pp. 1-34.

6. FACTEURS LIMITANTS

Règle : la potentialité fixatrice de N_2 d'un système fixateur de N_2 ne peut s'exprimer dans son intégralité que si ce système est totalement préservé de l'intervention de facteurs limitants. On conçoit facilement que l'identification de ces facteurs limitants doit constituer un des objectifs de biologiste du sol et de l'agronome.

6.1. Facteurs édaphiques

6.1.1. Eau du sol

Une humidité excessive du sol (en particulier l'engorgement) est défavorable à la symbiose Rhizobium-légumineuse. L'excès d'eau agit en réduisant la diffusion de l'oxygène ce qui limite(1) la production des poils absorbants (sites de l'infection) donc handicape la nodulation (2) la respiration des nodules d'où réduction de l'activité réductrice d'azote. Il existe toutefois des exceptions. Les sojas peuvent être cultivés dans des rizières où la nappe d'eau a 15 cm d'épaisseur (on notera toutefois que cette nappe d'eau est relativement oxygénée). De même les légumineuses à nodules caulinaires (Sesbania rostrata, Aeschynomene divers, Neptunia sp) fixent l'azote activement dans les sols inondés grâce à leurs nodules aériens.

La sécheresse, inhibe la nodulation et réduit la fixation de N_2. Une sécheresse prolongée aboutit à la perte de nodules. Toutefois si les racines de la légumineuses sont assez développées pour puiser l'eau dans les horizons inférieurs, les nodules situés dans les horizons de surface(où la tension de l'eau est élevée) peuvent continuer à fixer N_2.

6.1.2. Acidité

De nombreuses légumineuses ne tolèrent pas l'acidité; ex:

luzerne, Leucaena leucocephala. Quelques létumineuses tropicales tolèrent l'acidité (pH = 4-5), ex. : Arachide, Vigna unguiculata. On sait en outre qu'il existe des variations entre les cultivars. L'acidité, la déficience en calcium, la toxicité Al et Mn apparaissant simultanément, il est souvent difficile de préciser la nature du facteur limitant qui intervient. On admet en général que les toxicités Al et Mn affectent la croissance de la plante et que l'effet sur la nodulation est indirect alors que l'activité et la déficience en calcium affectent plus directement les performances symbiotiques.

6.1.3. Phosphore

Dans de nombreux sols, surtout sous les tropiques, le phosphore assimilable est le facteur majeur qui limite la croissance de la plante, la nodulation et la fixation de N_2. Une fertilisation phosphatée convenable améliore la nodulation et la fixation de N_2. Les effets favorables de la mycorhization sur l'absorption de P par la légumineuse sont examinés p. 69.

6.1.4. Azote combiné

On connait depuis longtemps l'effet inhibiteur de l'azote combiné du sol (azote nitrique et ammoniacal) sur la symbiose Rhizobium-légumineuse (voir l'exemple figurant au tableau II.I.8). Cette intolérance à l'azote combiné est le talon d'Achille des légumineuses. L'azote combiné peut intervenir à trois stades infection; croissance du nodule; fixation de N_2 . Le blocage de l'infection a été attribué à l'effet du nitrate sur les lectines, la diminution de la fixation à une diminution de l'approvisionnement des nodules en photosynthétats (détournement des photosynthétats vers l'assimilation de l'azote combiné). Il semble que certaines souches de Rhizobium (et peut être certains cultivars) soient plus tolérants à l'azote combiné (voie de recherche en cours d'exploitation)

Tableau II.1.8. Bilan net de l'azote dans le cas de deux cultivars de cowpea à deux niveaux de fertilisation azotée (Eaglesham et al., non publié)

Engrais azoté	Cultivar	Absorption de N minéral	N_2 fixé	N des grains exporté	N des résidus restitué	Bilan N
25	ER-1	32	50	48	34	+ 2
	TVu 1190	33	101	49	85	+52
	IFe Brown	25	81	57	49	+24
	TVu 4552	27	49	46	30	+ 3
100	ER-1	66	28	54	40	-26
	TVu 1190	69	49	49	69	0
	IFe Brown	64	44	52	56	- 8
	TVu 4552	54	19	53	20	-34

(1) Les résultats sont exprimés en kg N/ha .

Sesbania rostrata, légumineuse à nodules caulinaires, est beaucoup plus tolérante, car cette plante nodule et fixe N_2 encore activement même en présence de doses élevées l'azote dans le sol (200 kg N/ha). Cette aptitude à assimiler simultanément l'azote du sol et l'azote de l'air confère à Sesbania rostrata une supériorité agronomique considérable. Cette supériorité semble liée à la nodulation caulinaire.

6.1.5. Microéléments

Divers microéléments sont indispensables à la nodulation et à la fixation de N_2, notamment B , Cu, Mo, Co.

6.2. Facteurs climatiques

6.2.1. Température

Les températures élevées sont défavorables à la nodulation et à la fixation de N_2. Mais il existe des différences suivant les systèmes considérés. Si, en général les températures supérieures à 30°C sont défavorables, Stylosanthes gracilis et Pueraria javanica nodulant bien à 35°C. La fixation de N_2 chez le soja, le trèfle et le pois chiche est plus tolérante aux températures élevées que nombre d'autres légumineuses.

6.2.2. Intensité lumineuse et photopériode

Il ne faut pas négliger ces facteurs dans le cas de plantes installées sous couvert des arbres: ex.: trèfle sous chêne; légumineuses sous hévéa. Si la densité des plantes est élevée, il y a diminution de la fixation de N_2 (exprimée par plante) mais augmentation si les résultats sont exprimés en fonction de la surface plantée.

6.3. Facteurs biotiques

6.3.1. Présence dans le sol du Rhizobium spécifique et effectif

Si dans un sol considéré la microflore rhizobienne ne comporte aucune souche de Rhizobium spécifique et effective, il est nécessaire

d'introduire cette souche (on dit qu'il est nécessaire d'inoculer). Si, par contre, le sol comporte déjà une population de souche(s) de Rhizobium spécifique(s) et effective(s), il est inutile de procéder à l'inoculation.

Une des premières questions qui se pose donc est de savoir s'il est nécessaire d'inoculer.

Différentes approches ont été proposées pour répondre à cette question. En voici deux :

(1) Observations de la nodulation chez la légumineuse non inoculée poussant déjà dans le sol considéré

Déterminer :

- la proportion de plantes nodulées
- l'abondance ou la rareté des nodules sur les plantes nodulées (poids, nombre)
- la localisation des nodules sur le système racinaire (couronne, extrémité, racine principale, racines latérales)
- la taille et la couleur des nodules en section: blanche (pas fixation); rose, indiquant la présence de leghémoglobine (fixation active); avec une surface verte à la base d'une zone rose réduite (activité fixatrice partielle). Ces résultats devront être interprétées en fonction de l'âge de la plante.

(2) Essais d'inoculation

On effectuera trois traitements :

(1) Témoin non inoculé pour observer la présence de Rhizobium natifs

(2) Inoculation avec une souche connue pour son effectivité déterminée au laboratoire ou en serre

(3) Inoculation comme en(2) et apport d'azote combiné.

Cet essai permet :

- de savoir s'il est nécessaire d'inoculer

- de déterminer la compétitivité de la souche introduite;
- de vérifier si la souche introduite peut produire des nodules efficients en présence d'azote combiné.

6.3.2. Compétition entre souches de Rhizobium

La réussite d'une inoculation avec une souche hautement effective de Rhizobium dépend de son aptitude compétitive, celle-ci pouvant être déterminée au champ en utilisant l'une ou l'autre des différentes méthodes de marquage dont nous disposons (anticorps fluorescents, ELISA, marquage aux antibiotiques).

Les bases physiologiques de la compétitivité d'une souche de Rhizobium sont mal connues. Différentes hypothèses ont été avancées concernant notamment la production de bactériocines, et mobilité. Il ne semble pas quela compétitivité d'une souche soit obligatoirement liée à son effectivité, comme on l'a parfois prétendu.

6.3.3. Nématodes et autres parasites des racines

Les nématodes produisant des galles (Meloidogyne) interférant avec la nodulation de nombreuses légumineuses dont le soja, l'arachide Vigna. Ces nématodes tendent à infecter les nodules de préférence aux racines.

Les nématodes provoquant des lésions sur les racines (Pratylenchus) empêchent souvent la nodulation de l'arachide (G. Germani). En Inde on a souvent observé l'attaque des nodules par des insectes.

7. ACCROISSEMENT DE LA FIXATION DE N_2

On peut tenter d'accroître la fixation symbiotique chez les légumineuses en agissant sur l'un et l'autre des deux partenaires ou en agissant sur l'environnement.

7.1. Recherches sur la plante hôte

7.1.1. Inventaire et utilisation de systèmes symbiotiques fixateurs de N_2 non exploités

Jusqu'à présent, les possibilités offertes par la symbiose Légumineuse-*Rhizobium* ont été encore très peu exploitées. Sur les 17.600 espèces de légumineuses, une centaine seulement sont utilisées.

Progressivement on introduit en agriculture de nouvelles espèces :

- *Leucaena leucocephala*
- *Psophocarpus tetragonolobus* (pois ailé), légumineuse grimpante, fixatrice de N_2 active, dont les feuilles, fleurs, gousses, graines et tubercules ont une valeur nutritive élevée ((forte teneur en protéines et vitamines;
- Légumineuses à nodules caulinaires dont *Sesbania rostrata*, plante remarquable non seulement sur le plan fondamental mais aussi sur le plan appliqué en raison de son potentiel fixateur de N_2 très élevé (fixation de l'ordre de 200 kg N_2/ha en 50 jours) et de sa tolérance à l'azote combiné du sol. Utilisé comme engrais vert, *S. rostrata* double ou triple les rendements en riz.

Les essais conduits en microparcelles de $1m^2$ à la Station ORSTOM de Bel-Air à Dakar au cours de l'été 1980, ont montré que l'utilisation de *S. rostrata* comme engrais vert permettait de doubler les rendements en riz (Tableau II.1.9.).

Tableau II.1.9. Influence de l'engrais vert S. rostrata sur le rendement et la teneur en azote total du riz.

Traitements	Poids secs (g/m^2)		Teneur en azote (%)	
	Grains	Pailles	Grains	Pailles
PK + S. rostrata	584 a	767 a	1,74 a	0,96 a
PK + $(NH_4)_2SO_4$ (60 kg N/ha^{-1})	381 b	484 b	1,27 b	0,49 b
PK (Témoin)	212 c	276 c	1,14 b	0,58 b

N.B. Les résultats suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents (P = 0,05).

Des essais menés sur une plus grande échelle dans le Sud du Sénégal (Casamance) ont confirmé les résultats obtenus en micro-parcelle: l'utilisation de S. rostrata comme engrais vert a permis de doubler les rendements en grains, l'apport d'une fumure organique (compost + fumier) ayant un effet nettement moins marqué (Tableau II.1.10.).

Tableau II.1.10. Effets sur les rendements en riz de l'engrais vert S. rostrata et d'une fumure organique

Traitements	Rendement en grains ($kg/25m^2$)	
	1981	1982
PK + S. rostrata	7,30	11,25
PK + fumure organique	3,44	7,30
PK (Témoin)	2,99	5,75

N.B. Chaque résultat est la moyenne de 6 répétitions

7.1.2. Etude génétique de la plante-hôte

L'étude génétique de quelques légumineuses a mis en évidence le rôle de gènes de la plante dans la formation des nodosités, leur nombre et leur répartition sur le système radiculaire, dans la spécificité vis-à-vis des souches de Rhizobium et dans l'ef-

ficacité de l'association (voir les revues de Holl et La Rue, 1976; Caldwell et Vest, 1977).

Des résultats intéressants ont été obtenus dans le cas du soja par les chercheurs de l'IITA (Ibadan, Nigéria) qui sont parvenus à transférer l'aptitude des cultivars Asiatiques à noduler avec des Rhizobium du groupe cow-pea à des cultivars à haut rendement d'origine américaine qui ne possèdent pas cette aptitude.

Au CIAT (Cali, Colombie), on a sélectionné des lignées de Phaseolus vulgaris à floraison tardive qui fixent ainsi 2 à 3 fois plus de N_2 que les lignées à floraison précoce en raison de la compétition entre le développement des gousses et la fixation d'azote.

On a beaucoup parlé de la possibilité de transférer les gènes nif (fixation de N_2) des procaryotes au génome des plantes supérieures. Compte tenu de la complexité des problèmes impliqués -(en particulier en ce qui concerne la localisation des gènes qui controlent le fonctionnement de la nitrogénase) il apparaît qu'une telle approche serait hasardeuse.

Par contre il pourrait être plus facile de transférer à des plantes non fixatrices de N_2 les gènes responsables de l'établissement et du fonctionnement des associations symbiotiques avec Rhizobium (et avec Frankia).

Les méthodes modernes d'obtention d'hybrides interspécifiques (fécondation et développement d'embryons in vitro) ou de fusion de protoplastes pourraient,dans un proche avenir,permettre le transfert de l'aptitude à noduler et fixer N_2 de plantes fixatrices à des plantes non fixatrices de N_2.

7.2. Approche microbienne

7.2.1. Sélection de souches

Ainsi qu'on l'a déjà souligné antérieurement le succès d'une inoculation requiert deux qualités essentielles chez le Rhizobium spécifique: effectivité et compétitivité. L'aptitude à survivre le sol est aussi une qulité à rechercher. Les techniques de sélection au point depuis de nombreuses années ont permis de constituer des collections de souches performantes pour nombre de légumineuses. Mais il est nécessaire de poursuivre les recherches dans ce domaine.

7.2.2. Techniques d'inoculation

L'inoculum est habituellement préparé à partir d'une culture liquide de Rhizobium avec laquelle on imprégne un support, tourbe en général.

La méthode la plus simple est la suivante :

- cultiver la souche de Rhizobium en flacon de 0,5 à 2 l sur agitateur;
- injecter la culture obtenue à la fin de la phase exponentielle dans un sachet soudé de plastique stérilisable renfermant de la tourbe humide (stérilisée dans le sachet). On peut par exemple injecter 50ml de culture dans un sachet contenant 50g de tourbe stérile;
- incuber pendant quelques jours les sachets de tourbe imprégnés avec la culture de Rhizobium à 30°C;
- conserver l'inoculum ainsi préparé au réfrigérateur (50°C) jusqu'à l'emploi.

On peut utiliser des supports autres que la tourbe.

Récemment on a mis au point une technique originale consistant à inclure les Rhizobium dans un polymère (polyacrylamide; alginate) puis à dessécher le produit obtenu . La poudre ainsi préparée est utilisé telle quelle ou remise en suspension (Jung et al., 1978).

7.2.3. Analyse génétique des Rhizobium.

"Pour la recherche de mutations affectant les propriétés symbiotiques, deux approches ont été suivies 1° la détection directe de mutants non virulents ou non fixateurs après mutagenèse et inoculation sur la plante-hôte; 2° l'isolement de mutants affectés sur des fonctions connues et pouvant être détectés en boîtes de Petri, suivi d'une étude de leurs propriétés sur la plante.

L'isolement et la caractérisation cytologique et biochimique d'un grand nombre de mutants ponctuels de Rhizobium affectés sur des caractères symbiotiques permettra de déterminer une série d'étapes symbiotiques contrôlées chacune par une gène bactérien.

Dans le but d'étudier l'organisation des gènes de Rhizobium, différents outils génétiques ont été mis au point. Les plasmides du groupe P1 ont un large spectre d'hôte, c'est-à-dire qu'ils peuvent être transférés à la plupart des bactéries Gram-négatives. L'utilisation de ces facteurs sexuels chez Rhizobium a permis d'établir des cartes chromosomiques par mesure de cotransfert de marqueurs ou par transfert polarisé du chromosome et de construire des hybrides interspécifiques. Ces plasmides P1 ont également rendu possible l'introduction chez Rhizobium d'éléments génétiques transposables comme le bactériophage Mu et le transposon Tn5 qui sont des outils génétiques puissants.

Des plasmides de haut poids moléculaire (supérieur à 90.10^6) ont été mis en évidence chez différentes espèces de Rhizobium. Des expériences de transfert et d'élimination de tels plasmides indiquent qu'ils jouent un rôle dans le contrôle de la formation des nodules et la spécificité de l'hôte. En outre, des expériences d'hybridation entre l'ADN de ces plasmides et des gènes nif de K. pneumoniae indiquent que les gènes nif de Rhizobium sont extrachromosomiques.

Ces études préliminaires doivent être maintenant approfondies pour déterminer les rôles respectifs du chromosome et des plasmides dans le contrôle des propriétés symbiotiques de Rhizobium et la signification biologique et écologique de la localisation de tels gènes sur de l'ADN extrachromosomique probablement transférable. La génétique de Rhizobium, pour le moment encore très rudimentaire, devrait se développer dans les prochaines années. Elle constitue en effet un outil indispensable pour l'analyse en termes génétiques et moléculaires d'un système qui pose plusieurs problèmes biologiques d'un grand intérêt: la reconnaissance spécifique entre une bactérie et une plante, l'induction par un procaryote d'une organogenèse chez un organisme eucaryote, la différenciation réversible d'une bactérie pour s'adapter à une "niche" écologique très particulière et enfin les mécanismes de régulation de la fixation de N_2 propres à un organisme symbiotique. D'un point de vue agronomique elle est indispensable pour l'obtention de souches hybrides améliorées de Rhizobium pour l'inoculation des Légumineuses"(Dénarié et Truchet, 1979).

7.2.3. Champignons mycorhiziens vésiculo-arbusculaires (VAM)

Les légumineuses ont un système racinaire peu développé, d'où leur difficulté à absorber P du sol, lorsque celui y est présent en quantité insuffisante.

Dans ces conditions, il n'est pas surprenant que l'infection mycorhizienne (VAM) exerce un effet bénéfique sur la nodulation et la fixation de N_2 chez les légumineuses (l'effet de l'infection VAM étant comparable à l'effet d'une application de P assimilable).

Les champignons VAM peuvent ainsi favoriser la fixation symbiotique de N_2 en améliorant la résistance de la plante hôte à la sécheresse et en réduisant l'impact de certaines formes de toxicité du sol.

7.3. Pratiques culturales

Par des pratiques culturales appropriées (cf Tableau II.1.II.) il est possible de lever l'effet inhibiteur de certains facteurs limitants.

7.3.1. Le mulching (paille, bagasses....)

Les mulch conserve l'humidité du sol, réduit la température, diminue la concentration du sol en NO_3^- et réduit la compétition par les mauvaises herbes. C'est ce qui explique que par mulching on ait pu accroître notablement la fixation de N_2 par le soja et *Vigna*.

7.3.2. Irrigation et drainage

Lorsqu'elle est possible, la maîtrise du régime hydrique du sol permet d'améliorer la fixation symbiotique de N_2.
Lorsque l'eau d'irrigation renferme des teneurs trop élevées en sel, l'irrigation peut affecter la fixation de N_2 soit en modifiant le pH (alcalinisation), soit par un effet de toxicité.

7.3.3. Chaulage

Il faut toujours se montrer prudent pour chauler (danger d'induction de carences en Mg,Cu,Zn,B).Toutefois si le chaulage est bien exécuté, il peut donner d'excellents résultats, en éliminant les toxicités Al et Mn. Notons à ce propos qu'on a sélectionné des souches de *Rhizobium* tolérantes à l'acidité, ce qui peut éviter d'avoir recours au chaulage.

7.3.4. Engrais azoté

On a déjà vu que l'azote combiné inhibe la fixation de N_2 : il est donc recommandé de ne pas appliquer d'engrais azoté sur les légumineuses.

Toutefois certaines légumineuses peuvent bénéficier d'un apport très modéré d'azote (20 kg N/ha) en début de cycle (N starter).

Tableau II.1.11. Principaux facteurs limitant la fixation symbiotique de N_2 par les légumineuses. Moyens proposés pour lever les effets de ces facteurs.

Facteurs limitants	Moyens proposés pour lever les effets des facteurs limitants
. Stress hydrique	- irrigation ; - recherche de cultivars et de souches résistantes à la sécheresse ; - stimulation de l'infection par les endomycorhizes(VAM)
. Acidité du du sol et toxicité	- chaulage ; - addition de matière organique (fumier, engrais vert ; compost) ; - sélection de souches de Rhizobium résistant à l'acidité
. Déficiences minérales, notamment P	- addition de P - stimulation de l'infection par les endomycorhizes(VAM) - détermination des autres déficiences et correction
4. Inadéquation des populations natives de Rhizobium et compétition entre souches natives et introduites	- inoculation avec des souches de Rhizobium sélectionnées pour leur effectivité, leur compétition et leur persistance
5. Nématodes(1)	- traitements nématicides - lutte biologique - lutte intégrée

(1) certaines maladies ou parasites peuvent constituer également des facteurs limitants majeurs.

7.3.5. Phosphore et soufre

Le P est souvent un facteur limitant majeur pour les raisons déjà exposés en 7.2.3. Le soufre peut aussi être limitant.

7.3.6. Oligo-éléments

Les sols alcalins sont souvent carencés en Mn, Fe, B, Zn. Les sols acides sont carencés en Mo. Des apports d'oligo-éléments peuvent être nécessaires dans ces cas particuliers.

7.3.7. Fumure organique

Il semble qu'en général l'adjonction au sol de fumures organiques (fumiers, compost) favorisent le développement des légumineuses et leur activité fixatrice de N_2.

CHAPITRE 2. LES NON-LEGUMINEUSES FIXATRICES DE N_2

On désigne sous le terme de "non-légumineuses fixatrices de N_2" ou "plantes actinorhiziennes" (Torrey et Tjepkema, 1979) les plantes qui forment des nodules racinaires fixateurs d'azote à la suite de l'infection de leurs racines par un actinomycète fixateur de N_2 connu sous le nom de Frankia.

1. Les plantes-hôtes (Tableau II.2.1).

Les plantes actinorhiziennes sont réparties dans huit familles de dicotylédones, appartenant toutes au groupe des apétales et des dialypétales (Fig. II.2.1). Ces familles ne présentent apparemment aucun lien phylogénétique. On notera toutefois que l'ordre des Rosales (qui, on le sait, comprend l'importante famille des légumineuses) comprend également la famille des Rosacées dont nombre d'espèces sont associées symbiotiquement avec Frankia.

Les plantes actinorhiziennes sont parfois des plantes herbacées (ex. Dryas) mais elles sont plus généralement ligneuses et de morphologie variable; il s'agit alors de buissons (Colletia, Rubus), de petits arbres (Hippophaë) ou d'arbres pouvant atteindre de grandes dimensions (Aune; Casuarina). Ces plantes poussent dans des habitats très divers. On les rencontre aussi bien dans les régions tempérées froides (Alnus, Dryas, Myrica, Elaeagnus) et les régions méditerranéennes (Hippophaë, Elaeagnus, Coriara, Casuarina, Alnus) que dans les régions tropicales (Cercocarpus, Coriaria, Alnus, Myrica).

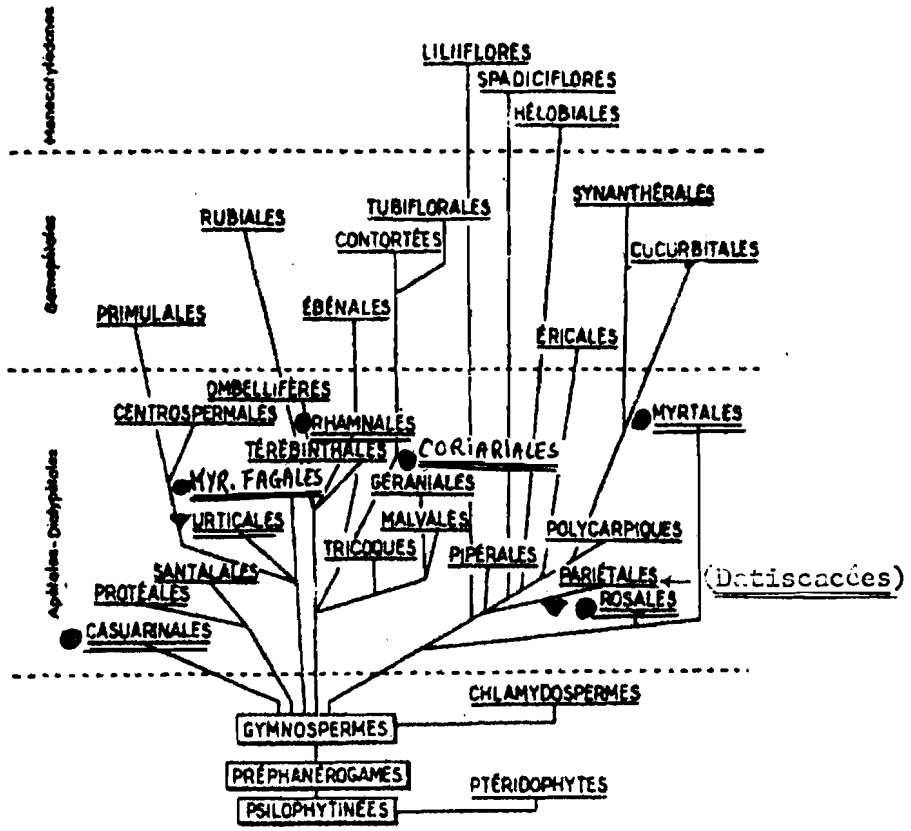


Fig. II.2.1. Arbre généalogique des plantes vasculaires (d'après L. Emberger) avec indication des ordres comportant des espèces susceptibles de s'associer symbiotiquement avec Rhizobium (▼) ou Frankia (●). L'ordre des Rosales comprend la grande famille des Légumineuses (dont un très grand nombre d'espèces est associé symbiotiquement avec Rhizobium) et la famille des Rosacées dont on connait cinq genres comportant des espèces associées symbiotiquement avec Frankia. Les Urticales comportent un seul genre, Parasponia (Ulmacée), connu pour s'associer symbiotiquement avec Rhizobium.

2. L'endophyte : Frankia[1]

Pendant de nombreuses années on a tenté d'isoler l'endophyte, Frankia des nodules de plantes actinorhiziennes. Mais contrairement à celui de Rhizobium, l'isolement de Frankia est très difficile en raison (1) de la croissance très lente de Frankia de l'interférence de nombreux contaminants (à croissance toujours plus rapide) (2) du fait que les Frankia se trouvent dans les nodules sous une forme qu'il est difficile (et parfois impossible) à multiplier in vitro.

Ce n'est qu'en 1978, qu'on a isolé pour la première fois l'endophyte d'une plante actinorhizienne. Il s'agissait de Comptonia peregrina, plante colonisatrice des sols dégradés par le feu ou par l'homme en Amérique du Nord. Ce succès obtenu par le groupe de J. Torrey (Université Harvard) a été le point de départ d'une série d'isolements de Frankia à partir d'autres plantes, notamment Alnus (1979) et Casuarina (1982).

En culture pure, en milieu liquide[2], Frankia forme des colonies floconneuses, de taille très variable , qui tendent à s'agréger. Sauf dans le cas de quelques souches, la croissance est très lente. Sous le microscope on distingue trois types de structures (Fig. II.2.2 AetB):
(1) les hyphes filamenteuses, septées, ramifiées de 0,5 à 1 µm de diamètre, mais pouvant être plus larges (jusqu'à 1,5 µm chez Frankia de Casuarina);
(2) les sporanges de 6 à 20µm en général, constitués par des amas de spores plus ou moins nombreuses et de 1,5 à 3 µm de diamètre.

---

(1) Le nom de Frankia a été adopté au 19ème siècle en l'honneur d'un botaniste allemand Frank pour désigner les organismes responsables de la nodulation chez les non-légumineuses.

(2) Le milieu de culture préconisé par H.G. Diem a la composition suivante (en gramme par litre) K_2HPO_4: 0,3; NaH_2PO_4: 0,2; $MgSO_4,7H_2O$:0,2; KCl: 0,2; peptone: 5,0; glucose: 20,0; extrait de levure: 0,5. Glucose et $MgSO_4,7H_2O$ sont stérilisés séparément.

Tableau II.2.1. Non-légumineuses fixatrices de N_2 associées à *Frankia*.

Ordre	Famille	Genre
Casuarinales	Casuarinacées	Casuarina
Myricales	Myricacées	Myrica Comptonia
Fagales	Bétulacées	Alnus
	Elaeagnacées	Elaeagnus Hippophaë Shepherdia
Rhamnales	Rhamnacées	Trevoa Ceanothus Colletia Discaria Kentrorhamnus Talguenea
Coriariales	Coriariacées	Coriaria
Rosales	Rosacées	Rubus Dryas Purshia Cercocarpus Cowania Chamaebatia
Pariétales	Datiscacées	Datisca

(3) des vésicules sphériques de 2 à 3 µm de diamètre ces vésicules n'apparaissant pas in vitro chez toutes les souches. Il faut noter que Frankia est un organisme très pléomorphique.

En l'absence d'azote combiné (a l'exception de faibles doses de glutamine ou d'extrait de levure), une culture de Frankia peut fixer N_2 à condition qu'elle comporte des vésicules, ce qui suggère que ces vésicules sont le siège de la fixation de N_2 aussi bien in vitro, qu'in planta (cf infra).

Le fait que nous disposions désormais de souches pures de Frankia permet d'envisager l'étude de la génétique de ces microorganismes. De telles études, encore à peine ébauchées, devraient permettre d'améliorer les potentialités symbiotiques de Frankia (par ex. en accroissant la fixation de N_2 ou en modifiant le spectre d'hôte des souches à potentiel fixateur élevé). Les premiers essais d'isolement de plasmides chez Frankia ont montré que ces structures génétiques extrachromosomiques étaient assez peu fréquentes (3 souches sur une quarantaine).

3. Infection de la plante hôte: genèse du nodule; spécificité

3.1. Les différentes étapes de l'infection sont les suivantes :

3.1.1. Invasion des poils absorbants par Frankia

L'infection, comme chez la plupart des légumineuses, se fait par l'intermédiaire des poils absorbants racinaires. Après courbure en crosse du poil absorbant, Frankia pénétre dans le poil et forme une ou plusieurs hyphes infectieuses (équivalent du cordon d'infection des légumineuses) qui envahit les cellules corticales de la racine en s'y ramifiant. Chaque poil absorbant peut renfermer plusieurs hyphes infectieuses.

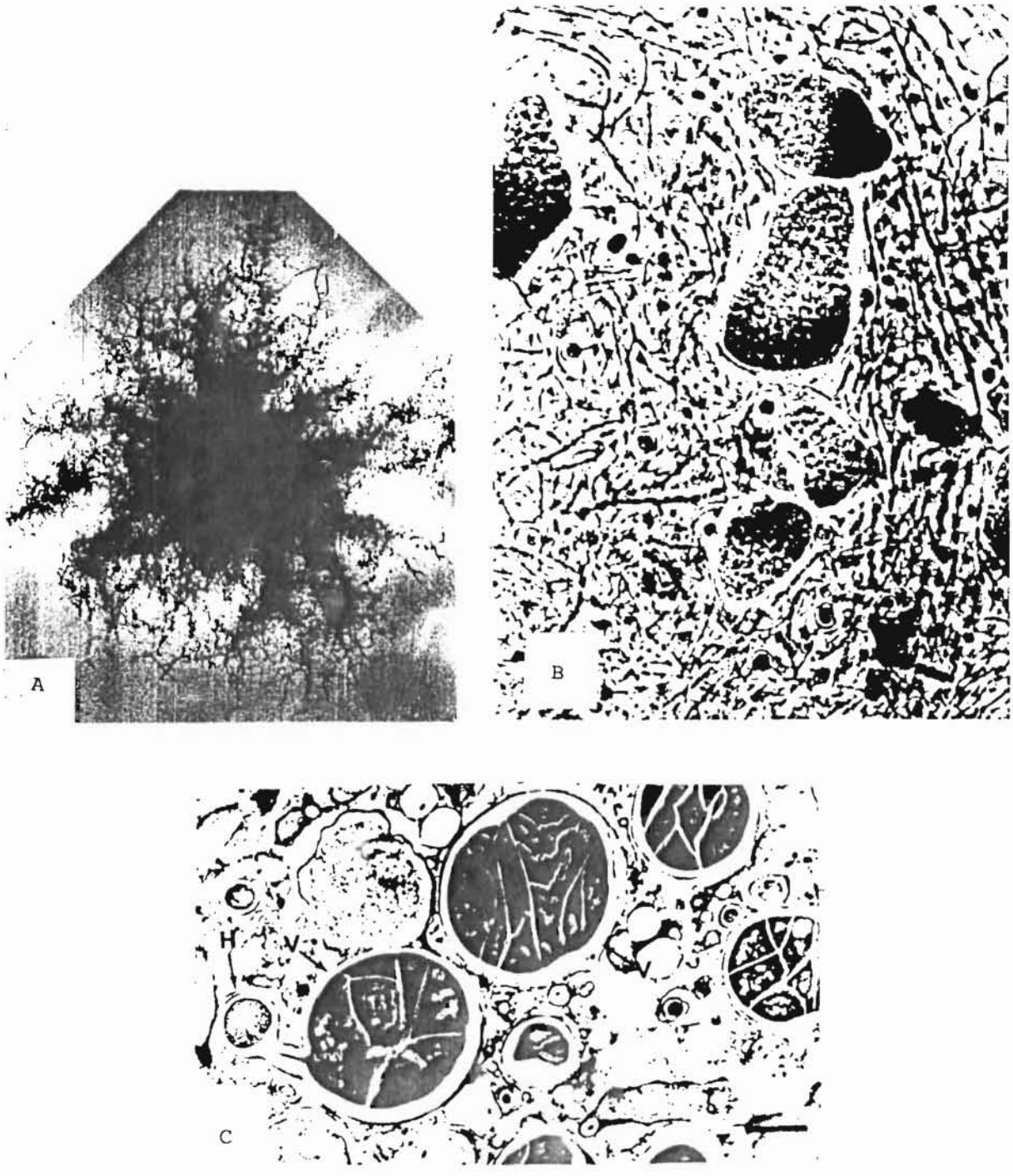


Fig. II.2.2. A. Colonie de Frankia sur gélose (diamètre 0,5mm)

B. Culture de Frankia typique avec les trois structures: hyphes, vésicules (diamètre 3µm) et sporanges en moyenne 20µm)

C. Vésicules sphériques (diamètre 3µm) dans un nodule d'Hippophaë rhamnoides. Noter la compartimentation des vésicules (vésicules septées) (Diem 1982; Gauthier, 1982)

3.1.2. Formation du nodule primaire (Fig. II.2.3)

Les cellules du cortex racinaire situées à la base du site d'infection se divisent activement et donnent naissance à un renflement appelé nodule primaire.

3.1.3. Formation des primordiums racinaires latéraux et des lobes

Simultanement la racine, au niveau du site d'infection, forme des primodiums racinaires latéraux. Ces primordiums racinaires sont infectés par Frankia et s'hypertrophient pour donner des lobes (cet amas de lobes a été appelé rhizothamnion). A chaque site d'infection il se forme donc un amas de lobes nodulaires gonflés dont chacun se termine (en général, mais pas toujours) par une racine nodulaire non infectée à géotropisme négatif. On pense que ce géotropisme négatif pourrait être dû au métabolisme anormal de la croissance de la plante hôte sous l'effet d'une phytohormone (acide indole-3-acétique) synthétisée dans l nodule en développement (Fig. 2.4 et II.2.5).

Il s'écoule 14 jours entre l'initiation de l'infection et l'apparition d'un nodule visible à l'oeil nu. Alors que chez les légumineuses le Rhizobium induit le nodule définitif, la nodulation, chez les plantes actinorhiziennes, se fait en deux étapes: la formation du prénodule, la formation des primordiums racinaires (racines latérales) qui donnent les lobes du nodules.

3.2. Morphologie et biomasse des nodules

Les racines latérales se ramifient pour donner un nodule de type coralloïde, qui est perenne. Les nodules peuvent atteindre un diamètre de 10 cm chez l'Aune ou le Casuarina. Le poids des nodules représente 1 à 3% de la biomasse des arbres. Dans un peupleument de 20 ans d'Alnus glutinosa le poids des nodules est compris entre 200 et 400 kg/ha (AKKERMANS, 1978). L'activité fixatrice d'azote (ARA) exprimée en fonction du poids du nodule décroit avec l'âge du nodule puisque les régions situées au centre du nodule cessent d'être fonctionnelles.

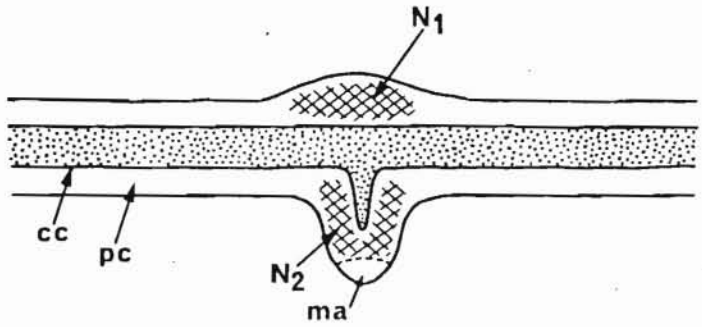


Fig. II.2.3.– Schéma de la formation des nodules chez les non-légumineuses (N_1 = nodule primaire ou prénodule; N_2 = nodule proprement dit; *cc* = cylindre central de la racine; *pc* = parenchyme cortical; *ma* = méristème apical. Les zones hachurées représentent les tissus infectés) (Blondeau 1980)

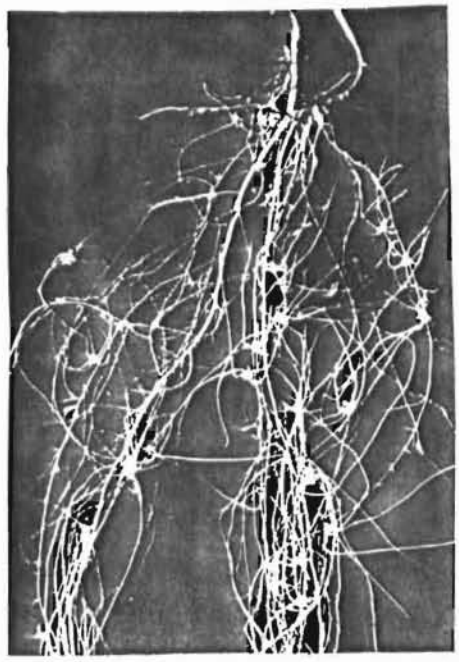


Fig. II.2.4. Nodules âges de 1 mois sur des racines de Casuarina equisetifolia inoculées avec une souche pure de Frankia (ORS 1106) (H.G. Diem, 1982).

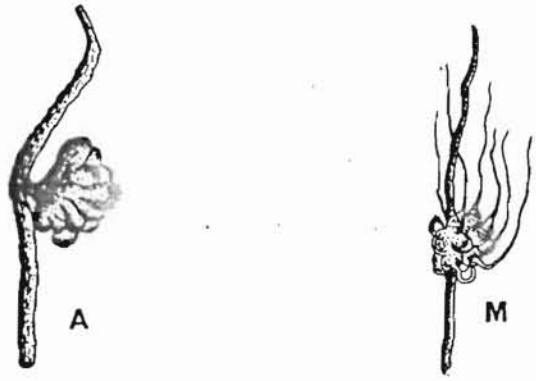


Fig. II.2.5. – Représentation schématique d'un nodule de type *Alnus* (à gauche) et de type *Myrica* (à droite). (Blondeau 1980)

ainsi un nodule de Casuarina equisetifolia de 4 mois a une ARA de 50-100 µmoles C_2H_2/g (poids sec) nodule/h alors qu'un nodule âgé de 1 an a seulement une activité de 10 µmoles.

3.3. Infection spontanée

Dans la nature l'infection des plantes à actinorhizes se fait par les Frankia qui se trouvent spontanément dans le sol. On ne connait pas bien la vie saprophytique de Frankia, mais on sait que cet actinomycète peut "s'échapper" du nodule vivant et se multiplier dans la "nodulosphère" et les racines avoisinantes formant des hyphes et des spores (Diem, 1982). Il est probable que l'infection "spontanée" puisse se faire par l'intermédiaire de ces formes saprophytiques de Frankia. Bien entendu elle pourrait avoir lieu par l'intermédiaire des résidus de nodules se décomposant dans le sol.

3.4. Spécificité

De même que dans le cas de la symbiose Légumineuse-Rhizobium, on a observé chez la symbiose plantes actinorhiziennes Frankia, une spécificité hôte-souche. Avant l'obtention de souches pures de Frankia cette spécificité a été étudiée en effectuant des inoculations avec des broyats de nodules, méthode critiquable en raison de la possibilité de contaminations diverses.

Les expériences conduites avec les cultures pures sont encore trop peu nombreuses pour tenter de dresser une classification des Frankia en des groupes d'inoculation croisée comme cela a été fait pour les Rhizobium. Un fait est certain: certaines souches ont un spectre d'hôte large; c'est le cas de la souche de Frankia isolée Comptonia peregrina (CpI1), qui peut infecter non seulement Comptonia mais nombre d'espèces de Myrica et Alnus. Par contre d'autres souches ont un spectre d'hôte restreint : c'est le cas de la souche ORS 1106 (ex. Cj1-82) isolée de Casuarina junghuhniana, qui nodule seulement les Casuarina appartenant au sous genre Casuarina sensu stricto (C. equisetifolia; C. glauca; C. cunninghamiana; C. obesa; C. junghuhniana).

4. Ultrastructure du nodule

Dans le nodule mature Frankia occupe un certain nombre (variable suivant les hôtes) de cellules du cortex du nodule situées à l'extérieur du cylindre vasculaire central. Cette localisation pourrait s'expliquer par le fait que Frankia exige une certaine tension d'oxygène (la localisation de l'endophyte est très différente de celle des Rhizobium qui, eux, sont localisés dans la partie centrale du nodule entre les faisceaux vasculaires).

On distingue dans le nodule les structures suivantes :

(1) Hyphes septées. Les hyphes sont pourvues d'une gaine (capsule) de polysaccharides synthétisée par le cytoplasme de l'hôte;

(2) Vésicules. Ces structures sont visibles chez de nombreuses espèces mais il y a des exceptions, par ex. Casuarina (cf tableau infra). Les vésicules sont souvent sphériques, d'un diamètre de 2-5µm et placées à l'extrémité d'hyphes ou de pelotons d'hyphes. Les vésicules sont septées (= cloisonnées), les cloisons pouvant être incomplètes, ou non septées. Chez certaines espèces les vésicules ont la forme de coupes (elles paraissent ovales en section) ou de poire.

Les vésicules intranodulaires seraient le siège de la fixation de N_2 comme le sont les vésicules apparaissant in vitro. Les vésicules joueraient, dans la protection de la nitrogénase contre l'O_2 un rôle comparable à celui des hétérocystes chez les cyanobactéries (Fig. II.2.2,C);

(3) Spores. Chez certaines plantes on peut distinguer des particules (granules) appelées parfois "bactéroides" ou "corps bactériformes". On considère actuellement que ce sont des spores. Ces structures sont absentes chez beaucoup d'espèces. Chez une espèce donnée elles peuvent être présentes ou absentes : on a alors des nodules spore + ou spore - (cas de l'Aune).

Le tableau ci-dessous résume quelques unes des variations

Tableau : II.2.2. Variations dans l'anatomie des nodules de trois plantes actinorhiziennes

	Alnus	Casuarina	Dryas
- Racines nodulaires	O ou +	+	O
- Vésicules	Sphériques et septées	O	Sphériques ou ovales; non septées
- Spores	O ou +	O	O

5. Particularités concernant la fixation de N_2 chez les plantes actinorhiziennes (Tableau II.2.3).

5.1. Localisation de l'activité fixatrice de N_2

On a vu antérieurement que l'activité fixatrice de N_2 était probablement localisée au niveau des vésicules, structures protégeant physiquement la nitrogénase contre l'oxygène. Un problème toutefois n'a pas été résolu, c'est celui des plantes, notamment Casuarina, qui ne présentent pas de vésicules visibles dans leurs nodules (Peut-être les vésicules ont-elles dans ce cas une morphologie particulière).

5.2. Leghémoglobine

Alors que la leghémoglobine est toujours présente dans les nodules des légumineuses, où l'on considère qu'elle joue un rôle important, ou n'a en général pas détecté de leghémoglobine chez les plantes actinorhiziennes. Toutefois deux auteurs (Davenport, 1960; Tjepkema, 1982) ont prétendu avoir décelé de leghémoglobine dans les nodules de certaines plantes actinorhiziennes.

Tleau II.2.3. Comparaison entre les symbioses Légumineuses-Rhizobium et les symbioses actinorhiziennes.

	LEGUMINEUSE	NON-LEGUMINEUSE
Endophyte	Rhizobium	Frankia
Plante-hôte	Légumineuses + Ulmacée (Parasponia)	8 familles de non-légumineuses
Infection		
- Site d'infection	Poil absorbant ou site spécialisé (légumineuses à nodules caulinaires)	Poil absorbant
- Etapes de nodulogénèse	Une seule étape	Deux étapes : (1) prénodule ; (2) primordium racinaires et lobes
- Localisation des cellules infectées	Entre les faisceaux vasculaires	A l'extérieur des faisceaux vasculaires
Fonctionnement de la symbiose		
- Léghémoglobine	+ (sauf Parasponia)	0
- Protection de la nitrogénase O_2	Enzymatique (hydrogénase, SOD)	Physique (vésicules)
- Facteurs limitants	Déficiences P ; excès d'azote combiné	Déficiences P; excès d'azote combiné
Fixation de N_2 au champ (kg N_2 fixé/ha/an)	Jusqu'à 300-400	Jusqu'à 200
Association avec les mycorhizes	Endomycorhizes (VAM)	Endomycorhizes (VAM) et ectomycorhizes

5.3. Quantité de N_2 fixé

Le tableau II.2.4 montre que les plantes actinorhiziennes peuvent fixer des quantités d'azote importantes et comparables à celles qui ont été mesurées dans le cas des légumineuses.

6. Facteurs limitant la nodulation et la fixation de N_2

6.1. Facteurs limitant la nodulation.

6.1.1. Quantité de particules infectives de Frankia dans le sol

On ne connait pas encore avec certitude la forme sous laquelle Frankia est infectif. C'est pourquoi nous emploirons l'expression "particules infectives" pour désigner la où les formes de Frankia capable d'induire la nodulation. Si le sol est pauvre en formes infectives la nodulation est médiocre. Il peut être alors nécessaire d'inoculer le sol soit en utilisant des broyats de nodules soit, mieux, en utilisant une culture pure du Frankia spécifique (cf infra).

6.1.2. Présence de poils absorbants

Puisque l'infection a lieu via les poils absorbants, il est nécessaire que la plante-hôte soit capable de former des poils absorbants en quantité suffisante et au moment voulu pour que la nodulation ait lieu. La formation de poils absorbant est un caractère propre à la plante hôte, mais c'est aussi un caractère dont l'expression dépend des conditions édaphiques; on sait que la formation de poils absorbants est fonction de l'aération du sol et de certains facteurs chimiques dont la teneur en Ca^{++} et la teneur en azote combiné. C'est ce qui explique que la nodulation soit, chez certaines espèces tout au moins, sous la dépendance du pH (Hippophaë tolère mal l'acidité), de l'azote combiné et de la tension d'O_2 dans le sol.

Tableau II.2.4. Fixation d'azote chez quelques plantes actinorhiziennes (Silvester, 1977).

Espèce	Fixation de N_2 kg N_2/ha/an	Méthode d'évaluation
Alnus glutinosa	56-130	ARA
Alnus rubra	130-325	B
Alnus rugosa		
Hippophaë rhamnoïdes	2-15	ARA
Hippophaë rhamnoïdes	69-179	B
Casuarina equisetifolia	58	B
Casuarina littoralis	218	L

Méthode d'évaluation ; ARA : réduction d'acétylène ; B:comparaison de la teneur en azote total de la biomasse et du sol dans des parcelles adjacentes avec et sans plante actinorhiziennes ; L : méthode fondée sur l'étude de la composition de la litière.

6.2. Facteurs limitant la fixation de N_2

6.2.1. Température

L'activité des nodules est optimale à certaines températures. Il y a des différences sensibles entre les plantes à actinorhizes. L'Aune fixe N_2 relativement bien à des températures basses alors qu'*Hippophaë* tolère les températures élevées.

6.2.2. Azote combiné

Son effet varie en fonction des conditions expérimentales. Il est probable que des doses relativement élevées ralentissent considérablement la fixation de N_2.

6.3. Interaction avec endo- et ectomycorhizes

De même que chez les légumineuses, l'association des plantes à actinorhizes avec des mycorhizes favorise la fixation de N_2 dans tous les sols où la teneur en phosphate assimilable est faible.

Les plantes actinorhiziennes étant capables d'entrer en symbiose non seulement avec *Frankia* (symbiote fixateur de N_2) mais aussi avec un ecto- ou un endomycorhize (symbiote améliorant très activement l'absorption de P), on comprend facilement que ces plantes puissent coloniser rapidement des sols marginaux (qui sont très généralement carencés en N et P).

7. Applications

De par leur adaptabilité remarquable, les plantes actinorhiziennes sont appelées à jouer un rôle important dans des domaines aussi divers que la production de biomasse (production forestière), la protection des sols (lutte contre l'érosion), la fertilisation des sols agricoles.

7.1. Production forestière

Alnus et Casuarina, sont deux genres comportant des arbres à croissance assez rapide ou rapide qui constituent d'excellents producteurs de bois d'oeuvre ou de chauffage. Ils peuvent être cultivés en peuplements purs ou associés à des arbres non fixateurs d'azote; dans ce cas, ils contribuent à leur nutrition azotée (ex: plantation mélangée de Aune-Peuplier, Aune-Pin ou Eucalyptus-Casuarina).

Des espèces buisonnantes peuvent être utilisées en sous-bois pour enrichir le sol des forêts en azote et favoriser la croissance des arbres. C'est aussi qu'en Espagne Coriaria myrtifolia contribue efficacement à la productivité des forêts de chêne vert (Silvester 1978).

7.2. Protection des sols

Hippophaë rhamnoides tend à produire des colonies végétales impénétrables,ce qui permet d'utiliser cette plante pour lutter contre l'érosion en montagne et fixer les torrents (Europe, Iran). Elaeagnus angustifolia, qui pousse en Europe et en bordure de la Méditerranée, est une espèce très résistante au sel et à la sécheresse. C'est pourquoi on la recommande pour la stabilisation des dunes en même temps que Hippophaë rhamnoides.

Casuarina est un des meilleurs brise-vent connus. Les Casuarina, en particulier C. equisetifolia, sont utilisés dans de nombreux pays tropicaux pour fixer les dunes et protéger aussi des cultures contre l'envahissement par le sable. En Chine on a planté depuis 1954 plus d'un million d'ha de Casuarina pour former une ceinture protectrice de 3000 km de long et de 500 m à 5 km de large. Des reboisement effectués sur une moindre échelle au Sénégal ont permis de fixer les dunes côtières. C'est également aux Casuarina qu'on a fait appel pour protéger la ville de Mexico contre les vents de poussière provenant du lac Texcoco (grand lac salé). En Tunisie on utilise également avec succès Casuarina comme brise-vent dans certaines régions du pays.

7.3. Fertilisation des sols agricoles

Coriaria sinica est cultivé comme engrais vert en rizière dans la province de Hunan. Il y joue le rôle d'une légumineuse.
En Nouvelle Guinée *Casuarina oligodon* est utilisé comme jachère forestière en vue de regénérer les sols cultivés.

8. Accroissement de la fixation de N_2

8.1. Exploitation et découverte de nouveaux systèmes fixateurs actinorhiziens.

Il est probable que l'on ne connait encore qu'une partie des espèces actinorhiziennes existentes. Des inventaires botaniques doivent être entrepris pour découvrir les espèces encore inconnues. La prospection sur le terrain ne saurait suffire; il est indispensable de tester les plantes en serre pour en vérifier l'aptitude à s'associer avec *Frankia*: C'est ainsi qu'on a pu découvrir tout récemment (1980) que *Cowania mexicana*, une Rosacée, pouvait fixer N_2 en association avec *Frankia*. Une autre approche pourrait consister à recherche les sols *Frankia* positifs puis à faire l'inventaire des espèces végétales présentes dans ces sols.

8.2. Sélection des plantes-hôtes

Il semble qu'il existe chez une même espèce de plante à actinorhize des variations génétiques considérables en ce qui concerne l'aptitude symbiotique. Certains individus nodulent et fixent N_2 médiocrement, alors que d'autres individus semblent constituer des systèmes fixateurs beaucoup plus actifs. La sélection et la multiplication végétative (*in vitro* notamment) des plantes-hôtes à potentiel fixateur élevé est incontestablement une voie prometteuse.

On peut aussi envisager l'obtention d'hybrides fixateurs d'azote en faisant appel à des méthodes telles que la fécondation *in vitro* ou la fusion de protoplastes.

8.3. Sélection des souches et techniques d'inoculation

On a évoqué antérieurement la possibilité de manipuler les souches de Frankia, cette approche impliquant évidemment des progrès dans la connaissance du support génétique des caractères symbiotiques chez Frankia.

Dans un avenir immédiat, on peut envisager le développement de la technique d'inoculation avec des cultures pures de Frankia, une telle technique s'imposant d'ailleurs au niveau des pépinières forestières où l'on pratique de plus en plus souvent la stérilisation du sol (bromure de méthyle ou VAPAM) pour éliminer les organismes pathogènes,notamment champignons et nématodes. Dans le cas des pépinières forestières, il est d'ailleurs indiqué de procéder simultanément à l'inoculation avec Frankia et des ecto- ou endomycorhizes (cf Chapitre 3).

8.4. Elimination de facteurs limitant la fixation de N_2

Rappelons ici la règle énoncée à propos de la fixation symbiotique chez les légumineuses à savoir que "l'expression du potentiel fixateur d'azote d'un système biologique requiert l'élimination de tous les facteurs limitants se manifestant in situ". Nous avons défini antérieurement ces limitations, qui sont pratiquement indentiques à celles que l'on connait chez les légumineuses (Tableau II.1.11). On peut supprimer l'effet des facteurs limitants en faisant appel à des méthodes culturales appropriées. C'est ainsi que l'aération du sol de pépinière ou l'élimination de certains pathogènes ou de carences minérales constituent des conditions sine qua non de l'établissement et du fonctionnement des symbioses actinorhiziennes.

9. La symbiose Parasponia-Rhizobium (Tableau II.2.5)

Une non-légumineuse tropicale, Parasponia rugosa (= Trema cannabina), Ulmacée, porte des nodules ayant la morphologie des nodules

bleau II.2.5. Comparaison entre les symbioses Légumineuses-*Rhizobium* et *Parasponia* *Rhizobium*

	LEGUMINEUSE	PARASPONIA
Endophyte	*Rhizobium*	*Rhizobium* cow-pea
Infection	A l'intérieur des faisceaux vasculaires	A l'extérieur des faisceaux vasculaires
Cordons d'infection	Ephémères	Persistent pour les 3/4 des *Rhizobium*
Léghémoglobine	+	O

d'Aune. L'infection est, comme chez les non-légumineuses, localisée dans des cellules corticales à l'extérieur des faisceaux vasculaires. En coupe on observe que les cellules infectées n'entourent pas complétement la stèle mais sont disposées en fer à cheval se qui est exceptionnel chez les non-légumineuses (sauf Coriaria).

Mais, contrairement au cas des non-légumineuses, l'endophyte est un Rhizobium. Fait curieux (et en contradiction avec la symbiose-légumineuse), trois quarts des Rhizobium chez Parasponia restent enfermés dans les cordons d'infection, le reste (1/4) des Rhizobium s'échappent dans les cellules où ils forment des bactéroides ramifiés. Les nodules de Parasponia ne contiennent pas de leghémoglobine. Il est facile d'isoler le Rhizobium qui est capable de noduler les légumineuses du type cow-pea. On a découvert deux autres espèces appartenant au genre Parasponia qui forment des nodules avec Rhizobium (P. parviflora; P. andersonii). Il n'est pas impossible que l'on découvre ultérieurement d'autres espèces.

D'après Trinick (1981), Parasponia est un excellent colonisateur (c'est pourquoi il ne supporte pas la concurrence des autres espèces). Il améliore la fertilité du sol et fournit un bois utile. Le potentiel fixateur de N_2 est estimé à 850 kg N_2/ha/an. Dans des conditions favorables, une plante peut produire en 6 mois 250 g (poids frais) de nodules.

10. Pseudo-nodules

Chez de nombreuses plantes on peut observer sur les racines des pseudo-nodules (nodules non fixateurs de N_2). Ces pseudo-nodules peuvent être induits par divers agents: nématodes, animaux déposant leurs oeufs dans les tissus racinaires, Agrobacter tumefaciens (tumeurs), champignon mycorhizien (Aesculus spp; Gymnostoma spp; Podocarpus sp.).

CHAPITRE 3. LES SYMBIOSES MYCORHIZIENNES

1. INTRODUCTION

Dans la nature les racines de la plupart des plantes sont envahies par des champignons et transformées en mycorhizes ou "racines-champignon". La morphologie de la racine est modifiée. La plante hôte et le champignon vivent en symbiose, les relations entre les deux partenaires étant bénéfiques pour l'un et l'autre. L'importance du bénéfice tiré de la symbiose par l'un ou l'autre partenaire est variable. Voici deux cas extrêmes: (1) les plantes sans chlorophylle dépendent complètement de l'association mycorhizienne pour leur approvisionnement en nutrients organiques et minéraux (2) les plantes poussant dans des sols fertiles peuvent fort bien se passer de mycorhizes. En fait la plupart des symbioses mycorhiziennes se situent entre ces deux extrêmes.

Il existe différentes catégories de mycorhizes (cf Tableau II.3.1.):

1. Ectomycorhizes : le champignon forme un manteau compact à la surface de la racine et pousse des hyphes intercellulaires dans le cortex.
2. Ectendomycorhizes: ils sont semblables aux ectomycorhizes mais diffèrent par le fait que les hyphes sont à la fois inter- et intracellulaires.
3. Endomycorhizes : le champignon forme un réseau d'hyphes très lâche dans le sol, mais se développe abondamment dans le cortex. Il y a deux sous groupes d'endomycorhizes:

   3.1. Endomycorhizes à mycelium septé. Endomycorhizes éricoides et endomycorhizes des orchidées

   3.2. Endomycorhizes à mycelium non septé: endomycorhizes à vésicules et arbuscules (VAM).

Tableau II.3.1 COMPARAISON DES DIVERS TYPES DE MYCORHIZES (Plenchette, 1982)

Type de mycorhizes	Symbiotes fongiques	Plantes vasculaires impliquées	Structures fongiques	Structure de l'hôte	Manifestations physiologiques
Endomycorhizes à vésicules et arbuscules	Endogonacées (excluant le genre *Endogone*) *Gigaspora*, *Glomus* *Acaulospora* *Sclerocystis*, etc.	Ptéridophytes Gymnospermes sauf Pinacées Angiospermes Environ 90% des plantes vasculaires	Mycélium inter et intracellulaire Arbuscules et vésicules dans les cellules	Peu ou pas de changement morphologique Racines quelquefois jaunes	Meilleur accès aux éléments peu mobiles P, Zn, Cu, (N et K) Résistances aux maladies? Meilleure absorption de l'eau Modifications morphogénétiques et phénologiques?
Endomycorhizes éricoïdes	*Pezizella ericeae* *Clavaria* spp.?	*Calluna*, *Erica* *Rhododendron* et *Vaccinium*	Pelotons d'hyphes dans les cellules	Rien d'apparent	Plante symbiotique, peut se nourrir d'azote organique et de phosphates organiques Mycorhize sert de réserve d'azote Exclusion d'éléments toxiques
	Mal connus	Plusieurs centaines d'espèces			
Ectendo-mycorhizes arbutoïdes (et monotropoïdes)	*Cortinarius* spp. Commun avec ectomycorhize Très mal connus	Pyrolacées, et *Arctostaphylos* *Arbutus* spp. Très mal connues	Manteau ± épais Réseau de Hartig Pénétration intracellulaire	Renflement des fines racines	Apparemment similaire aux ectomycorhizes Mal connues
Ectendo-mycorhizes "sensu" Wilcox, Danielson	"E strain" Fungi imperfecti *Complexipes moniliformis* Mal connus	Plantes ligneuses Pinacées	Identique aux mycorhizes arbutoïdes?	Renflement des racines Dichotomies	Apparemment similaires aux ectomycorhizes Mal connues
Ectomycorhizes	*Endogone* spp.? Ascomycètes Gastéromycètes Agaricales Quelques milliers d'espèces	Plantes ligneuses exclusivement, Tiliacées Pinacées, Bétulacées Fagacées, Juglandacées Salicacées, Ulmacées Rosacées, Légumineuses	Manteau Réseau de Hartig Pas de pénétration intracellulaire	Renflement des racines Dichotomies	Meilleure absorption de P (N et K) Réserve de P Protection contre maladies Eau Modifications morphogénétiques et phénologiques?
Endomycorhizes des orchidées	Basidiomycètes *Rhizoctonia* *Tulasnella* *Thanatephorus* *Ceratobasidium*	Orchidées Gentianacées?	Pelotons dans les cellules	En nature, conditionnent le développement de l'hôte	Permet le développement Le carbone provient en tout ou en partie par le champignon Protection contre les maladies

Nous traiterons ici uniquement des ectomycorhizes et des endomycorhizes VAM.

2. LES ECTOMYCORHIZES

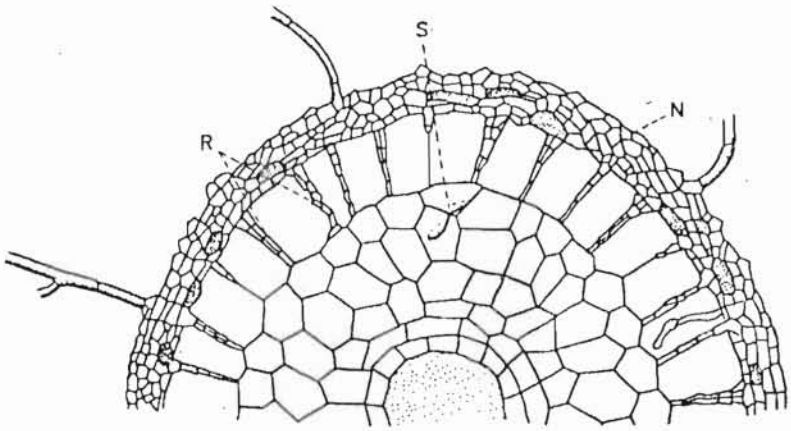
2.1. Les plantes-hôtes

Ce sont essentiellement des plantes appartenant aux familles des Pinacées, Bétulacées, Fagacées, Salicacées. On en trouve aussi,mais moins fréquement, chez les Diptérocarpacées, chez la plupart des Myrtacées. Chez les légumineuses on a rapporté la présence des ectomycorhizes dans la sous-famille des Césalpinacées (ex.: Afzelia, Brachystegia, Julbernardia, Macrolobium), chez quelques Mimosacées (ex.: Inga, Acacia). Un certain nombre d'autres plantes sont ectomycorhizées (ex. Casuarina distyla),mais les monocotylédones ne le sont jamais.

2.2. Morphologie et structure de l'ectomycorhize

On désigne sur le nom de mycorhize la racine infectée par le champignon ectomycorhizien. La morphologie de la racine est souvent, mais pas toujours modifiée, des structures fourchues et de type dichotomique étant fréquentes; il existe des mycorhizes coralloïdes. La morphologie de la mycorhize est fonction du genre de la plante -hôte . Les Pins forment des structures dichotomiques caractéristiques (Fig. II.3.1.) alors que d'autres sont ramiformes ou pennées (chêne). On a établi des classifications fondées sur la forme et la coloration des mycorhizes.

Une coupe à l'intérieur d'une mycorhize (Fig. II.3.1.) montre que l'infection est limitée au cortex: il n'y a jamais pénétration dans les tissus méristématiques ni dans la stèle. On distingue le manteau et le réseau de Hartig. Le manteau constitue une gaine (plus ou moins lâche) d'hyphes autour de la racine. Des hyphes partant du manteau pénètrent entre les cellules épidermiques et



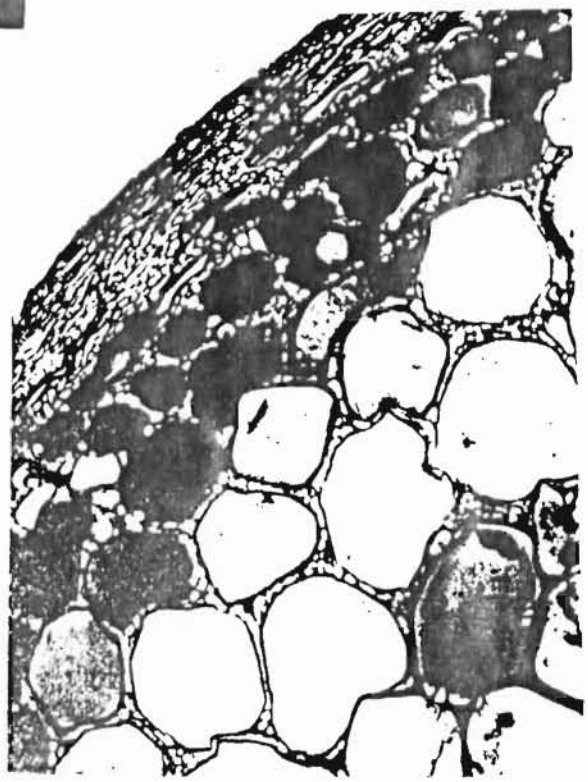


Fig. II.3.1. A. Mycorhize ectotrophe de Pin montrant la ramification dichotomique.(Hacskaylo, 1967)

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

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

corticales formant un réseau intercellulaire appelé le réseau de Hartig.

Des faisceaux d'hyphes poussent aussi à partir du manteau dans le sol, ces hyphes constituant le système d'absorption de la plante mycorhizée. Les échanges de nutrients ont lieu au niveau du réseau de Hartig où il y a le maximum de contact entre l'hôte et le champignon.

2.3. Les champignons ectomycorhiziens

De nombreux champignons sont ectomycorhiziens : ce sont en général des Basidiomycètes supérieurs et accessoirement des Ascomycètes :

- Basidiomycètes (plusieurs milliers d'espèces sont mycorhiziennes)
  - . Hyménomycètes, ex.: Boletus, Cortinarius, Suillus, Leccinum, Amanita, Tricholoma, Laccaria, Lactarius.
  - . Gastéromycètes, ex.: Rhizopogon, Pisolithus, Scleroderma
- Ascomycètes
  - . Tubérales, ex.: Truffes
  - . Pezizales.
- Champignons imparfaits ex.: Cenococcum graniforme

Un arbre, ou même un fragment de racine peut former des mycorhizes avec différentes espèces de champignon.

Inversement un champignon donné peut s'associer de nombreuses plantes-hôtes. C'est ainsi que Pisolithus tinctorius peut mycorhizer 73 espèces d'arbres (Abies, Betula, Carya, Eucalyptus, Quercus, Tsuga, Pinus). En général les champignons mycorhiziens sont acidiphiles et aérobies obligatoires. In vitro ils poussent bien sur des milieux contenant des hydrates de carbone simples comme le glucose ou le mannose. Certains peuvent utiliser des disaccharides (saccharose, cellobiose, maltose, tréhalose). Comme source azotée les champignons ectomycorhiziens utilisent volontiers les sels

d'ammonium, les acides aminés et des composés azotés plus complexes. Beaucoup ont besoins de certaines vitamines (thiamine et biotine, notamment). A titre d'exemple, voici la formule d'un milieu fréquemment utilisé pour la culture de Pisolithus tinctorius (Melin-Norkrans) $(NH_4)_2HPO_4$: 0,25 g; extrait de malt: 3,0 g; glucose: 3,0 g; $MgSO_4,7H_2O$: 0,15 g; KH_2PO_4: 0,50 g; NaCl: 0,025 g; $CaCl_2$: 0,05 g; thiamine HCl: 100 mg; citrate ferrique 1%: 1,2 ml; gélose: 15,0 g; eau distillée: 1000 ml.

Dans la nature, les champignons ectomycorhiziens obtiennent les vitamines et facteurs de croissance nécessaires de la plante-hôte. Il est peu probable qu'ils soient capables d'utiliser la lignine et qu'ils puissent croître beaucoup dans le sol hors des racines.

2.4. Fonctionnement de la symbiose (interactions entre le symbiote fongique et l'arbre-hôte).

2.4.1. Avantages pour la plante-hôte

L'infection ectomycorhizienne permet, lorsque les conditions sont favorables, d'obtenir une amélioration de la croissance de la plante-hôte qui peut être considérable (Fig. II.3.3.). Dans certains sols mêmes, la mycorhization est la condition sine qua non de l'établissement d'une plantation forestière, l'exemple classique étant celui de l'introduction du Pin des Caraibes (Pinus caribaea) dans nombre de pays tropicaux (cf.2.6.2).Ces résultats favorables s'expliquent par l'intervention de mécanismes suivants :

(1) accroissement de longévité des racines ayant pour fonction d'absorber les nutrients (feeder roots);

(2) accroissement de l'absorption des nutrients du sol.

On a démontré que des racines de hètre ou de pin absorbaient 2 à 9 fois plus de P que des racines non mycorhizées. Des ions tels que K, Na, Zn sont aussi absorbés plus rapidement par les mycorhizes.

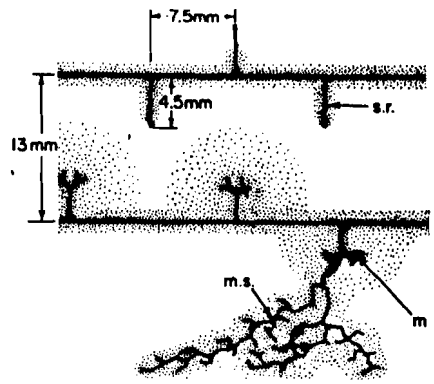


Fig. II.3.2. Comparaison du volume de sol exploré par une racine non mycorhizée (haut) et une racine mycorhizée (bas). L'intensité du grisé correspond à l'épuisement du phosphate autour des racines et des hyphes mycorhiziennes.

S.r. : racine secondaire non mycorhizienne

m : mycorhize

m.s. : cordon mycélien

(Bowen, 1973).

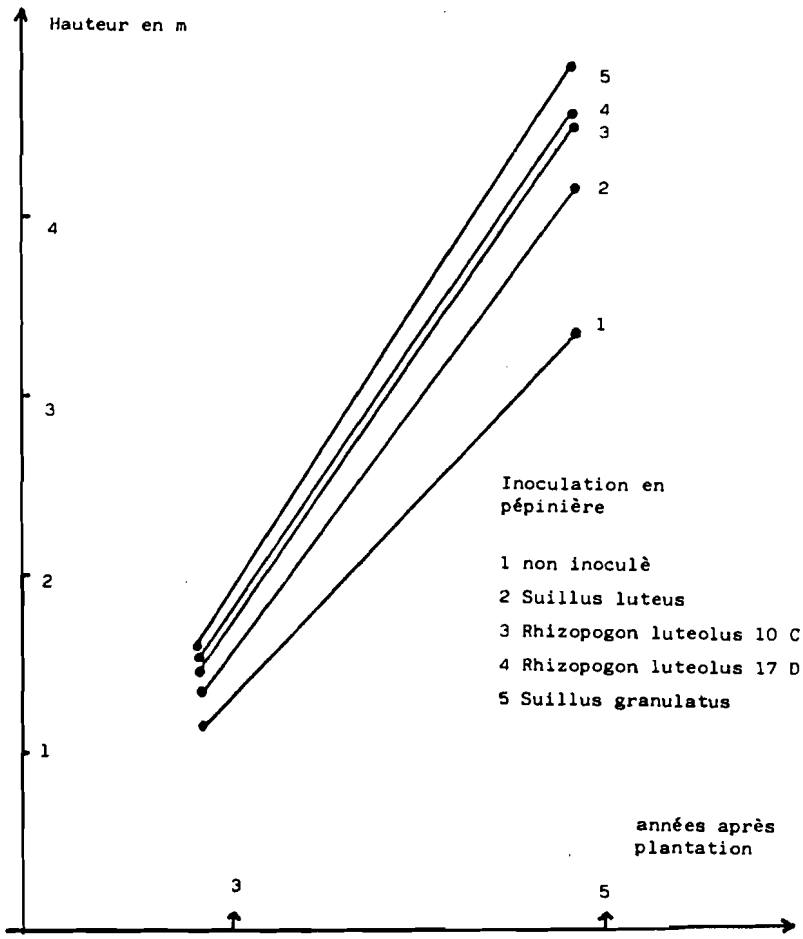


Fig. II.3.3 *Réponse en plantation de Pinus radiata à différents champignons inoculés en pépinière*
(THEODOROU, BOWEN, 1970)

Les hyphes mycorhiziens peuvent absorber des ions de solutions très diluées. De nombreux composés azotés sont absorbés par les mycorhizes (mais il n'y a pas fixation de N_2). Ces effets résultent d'une part l'accroissement du volume de sol exploré (Fig. II.3.2.) d'autre part d'une accélération de la vitesse d'absorption. Cette dernière propriété est importante dans tous les cas où le lessivage est intense et où la compétition pour les éléments nutritifs est vive.

(3) - amélioration de la résistance aux pathogènes: le manteau et le réseau de Hartig forment une barrière mécanique (racines de Pin protégées contre *Phytophthora cinnamomi*) ou produisent des antibiotiques

(4) - amélioration de la tolérance à des conditions édaphiques défavorables notamment :

- températures excessives (trop élevées ou trop basses)
- pH extrêmes
- concentrations ioniques excessives
- sécheresse.

2.4.1. Avantages pour le champignon mycorhizien

Il s'agit de la fourniture par les plantes-hôtes de substrats carbonés sous forme de sucres (par ex.: saccharose) acides aminés, acides organiques et divers métabolites qui stimulent la croissance des champignons mycorhiziens, thiamine notamment) (démonstration avec $^{14}CO_2$ appliqué aux feuilles).

2.5. Facteurs limitants l'établissement et le fonctionnement de la symbiose

2.5.1. Composition chimique du sol défavorable

L'intensité de l'infection mycorhizienne est optimale quand les plantes poussent dans des sols renfermant peu ou assez de nutrients. Mais l'infection est réduite dans des sols très pauvres ou lorsque le sol est bien pourvu en nutrients et que ceux-ci sont

bien équilibrés (les racines croissent alors trop vite pour être infectées). L'infection mycorhizienne est bien meilleure dans les sols à humus brut que dans les sols agricoles qui ont reçu de fortes fumures minérales.

2.5.2. Propriétés physiques du sol défavorables

Les champignons ectomycorhiziens étant des organismes strictement aérobies,la mauvaise aération du sol (due à une structure défectueuse ou à un mauvais drainage) peut inhiber la mycorhization et le fonctionnement de la symbiose.

2.5.3. Présence dans le sol d'antagonistes ou de pathogènes

Lorsque le sol de la pépinière est stérilisé (comme cela est conseillé, pour éliminer les pathogènes) le succès de la mycorhization est assuré à condition que les propriétés chimiques et physiques du sol soient favorables à la mycorhization (fumure minérale modérée; si possible adjonction de tourbe; bonne aération).

Lorsque le sol de pépinière n'est pas stérile, le succès de l'inoculation est assuré à condition que les propriétés chimiques et physiques du sol soient favorables et qu'aucun facteur biologique limitant n'intervient : par ex.: pathogènes, microorganismes antagonistes. C'est à ce dernier type de processus que l'on a attribué l'échec de la mycorhization de *Pinus caribaea* par *Pisolithus tinctorius* dans certains sols du Sénégal (A. Kabré, H.G. Diem).

2.5.4. Intensité lumineuse

Une forte intensité lumineuse (surtout si elle est associée à une fertilité plutôt faible du sol) favorise le développement des mycorhizes. Une diminution de l'intensité lumineuse (au dessous de 20% de l'intensité en pleine lumière) réduit ou même élimine la mycorhization. Ces effets résultent des modifications de la teneur en sucre des racines.

2.6. Applications

2.6.1. Les différentes méthodes d'inoculation en pépinière avec les champignons ectomycorhiziens

"Inoculation naturelle: nous la citons pour mémoire. L'inoculation naturelle aléatoire.

Inoculation par un sol concernant un inoculum naturel: c'est la méthode la plus simple pour inoculer une pépinière déficiente en champignons ectomycorhiziens. Cette pratique est connue depuis longtemps, en particulier pour la production de chênes truffiers, et était systématiquement pratiquée en France dès le 19è siècle. Elle a été, et est encore, très utilisée dans les pépinières des régions tropicales et équatoriales. Le plus souvent 10 à 20% du mélange servant au remplissage des conteneurs sont constitués par du sol provenant d'une plantation en bon état.
Sans cette pratique il aurait été impossible de réussir des reboisements résineux dans les zones tropicales, équatoriales ou steppiques. Cette méthode ne permet évidemment pas de contrôler l'inoculum. Elle a abouti en Afrique à l'introduction à grande échelle de champignons intéressants, mais aussi de champignons pathogènes ou de champignons dangereux comme l'amanite phalloïde.

Inoculation par plantules préalablement mycorhizées ou par racines excisées: cette méthode est encore appelée méthode indonésienne. La mycorhization s'effectue de proche en proche. Elle peut théoriquement permettre l'introduction d'un champignon bien déterminé, mais le contrôle est en réalité très difficile.

Inoculation par spores: il est possible d'utiliser soit des spores, soit les carpophores eux-mêmes. Cette méthode était utilisée pour la truffe dès le 18è siècle. Elle a été utilisée pour la première fois en pépinière par Levisohn et Rayner en Grande-Bretagne, en 1943.

Plus récemment, Marx aux Etats-Unis a utilisé des spores de Pisolithus tinctorius pour mycorhizer diverses espèces de pin du Sud-Est des Etats-Unis, à raison de 1,3 x 10^{10} spores/m2. Le succès est variable suivant les pépinières.

Cette technique n'est utilisable que dans le cas des espèces fournissant beaucoup de carpophores et de spores. Il est aussi indispensable de disposer de spores germant facilement, ce qui est loin d'être le cas général.

L'inoculation par spores peut également se faire par enrobage des graines. Cette méthode se développe actuellement aux Etats-Unis pour l'enrobage des graines de divers pins par Pisolithus tinctorius.

Inoculation par culture pure: si beaucoup de champignons ectomycorhiziens ne peuvent encore être cultivés en culture pure ou se cultivent très difficilement, un très grand nombre peuvent cependant se développer en l'absence d'un hôte en utilisant des milieux contenant des sucres simples, des vitamines et bien entendu tous les éléments minéraux.

Ces cultures pures peuvent être utilisées directement comme source d'inoculum. L'inoculation expérimentale par culture pure a été utilisée pour la première fois par Hatch aux Etats-Unis en 1936, à la suite des travaux de Melin qui, a partir de 1923, a été le premier à réussir des synthèses avec culture pure. Actuellement la plupart des chercheurs produisent de l'inoculum sur un mélange de tourbe et vermiculite saturé par une solution nutritive. Cet inoculum est ensuite incorporé au substrat de culture ou au sol.

Inoculation à grande échelle: l'inoculation à grande échelle des pépinières en vue d'une utilisation commerciale de la mycorhization contrôlée nécessite la mise au point de techniques de production d'inoculum en grande quantité et à faible prix. L'enrobage des graines par des spores est possible. Aux Etats-Unis une société

s'oriente vers la production de mycelium sur tourbe-vermiculite. De l'inoculum de Pisolithus tinctorius est actuellement commercialisé" (Le Tacon, 1982).

2.6.2. Résultats au champ

Lorsque des plants bien mycorhizés sont transplantés in situ, il importe que les mycorhizes introduits en pépinière puissent survivre et coloniser les racines des arbres. La Fig. II.3.3. illustre ce cas où la mycorhization continue à exercer un effet favorable sur la croissance des arbres après leur transplantation. Cette Fig. montre en outre que certaines souches peuvent être plus bénéfiques que d'autres (avec Suillus luteus le gain de croissance en hauteur et de 80%. L'introduction de Pinus caribaea à Puerto-Rico n'a été possible qu'après l'inoculation en pépinière par Pisolithus tinctorius. Des résultats spectaculaires ont été également obtenus par mycorhization pour la reforestation de sols dégradés par les exploitations minières en surface et des sols de terrils industriels (USA). Il en a été de même en Europe pour la reforestation de sols de montagne où la mycorhization est indispensable.

Toutefois à côté de ces résultats spectaculaires, il faut reconnaître qu'un certain nombre d'échecs ont été observés mais ces résultats négatifs n'ont pas fait l'objet de publication, ils n'ont pas non plus été à l'origine de recherches approfondies. Pourtant il est probable que des solutions existent pour résoudre le problème de du non-établisement de l'association mycorhizienne dans certains sols (cf cas de l'échec de l'introduction de Pinus caribaea dans les sols du Sud du Sénégal cité plus haut).

3. LES ENDOMYCORHIZES VESICULO-ARBUSCULAIRES (VAM)

3.1. Plantes-hôtes

Les champignons VAM peuvent s'associer à 4/5 des espèces végétales: bryophytes, ptéridophytes, certains gymnospermes et angiospermes. La plupart des plantes cultivées et de nombreux arbres peuvent être endomycorhizés. Il y a toutefois des plantes plus ou moins sensibles à l'infection. Des espèces appartenant aux familles suivantes ne sont pas ou sont rarement infectées par les VAM: Crucifères, Chénopodiacées, Juncacées, Cyperacées.

3.2. Morphologie de la racine endomycorhizée (VAM)

L'infection VAM produit peut de changement dans la morphologie externe de la racine, c'est pourquoi ce type d'association passe souvent inaperçue. Toutefois dans le cas de racines fines non subérisées, on peut déceler l'infection VAM car elle se manifeste par une coloration jaune paille de la racine, coloration qui disparait quand les racines sont exposées à une lumière brillante. Les mycorhizes VA sont aussi caractérisées par une polifération assez importante d'hyphes au voisinage de la racine, mais ces hyphes externes sont, la plupart du temps, perdues dans le sol lorsque l'on arrache les racines.

Nodules de Podocarpus (Silvester, 1977).

La majorité des Podocarpacées, Araucariacées et certaines Cupressassées présentent des nodules racinaires qui sont, en fait, des racines courtes envahies par un champignon VAM (Endogone). De tels nodules ont été décrits par B. Huguenin chez Gymnostoma deplancheana, sous genre de Casuarina.

3.3. Les champignons endomycorhiziens VAM

Ils ont été tous groupés dans la famille des Endogonacées qui comprend les genres Endogone, Glomus, Acaulospora, Gigaspora, Sclerocystis, Mordicella et Glaziella, mais dont seuls sont mycorhiziens les genres Glomus, Acaulospora, Gigaspora et Sclerocystis. La taxonomie, d'ailleurs, imparfaite (non présentée ici), des champignons VAM est fondée essentiellement sur la morphologie et la couleur des spores (cf infra). Les champignons VAM présentent quatre structures caractéristiques (Fig. II.3.4.):

3.3.1. Les hyphes

Le réseau d'hyphes à l'extérieur des racines s'étend jusqu'à 1 à 8 cm autour de la racine. Le diamètre de ces hyphes est variable (2 - 30µm). Ce mycélium externe pénètre dans la racine après avoir formé un appressorium qui s'applique à la surface. La méthode la plus commode pour diagnostiquer et observer les VA est celle de Phillips et Haymann (cf p 76).Après traitement des racines, on peut facilement voir les hyphes, vésicules et arbuscules son grossissement assez faible (x 65) (Fig. II.3.3; II.3.4.)

Les hyphes sont localisés à l'épiderme et au cortex de la racine: ils ne pénètrent ni dans l'endoderme ni dans la stèle ni dans le méristème racinaire. Le diamètre des hyphes internes est de 2-6µm. La croissance dans le cortex peut être soit inter- et intracellulaire soit entièrement intracellulaire suivant les hôtes. Les hyphes forment des pelotons plus ou moins complexes dans les cellules. Bien qu'ils ne soient pas septés quand ils sont jeunes et en bonne santé, des cloisons apparaissent lorsque les conditions de croissance se détériorent ou que le champignon meurt.

3.2.2. Les arbuscules

Lorsqu'un hyphe pénétre dans une cellule corticale il peut former un tronc arbusculaire d'où partent de très nombreuses de

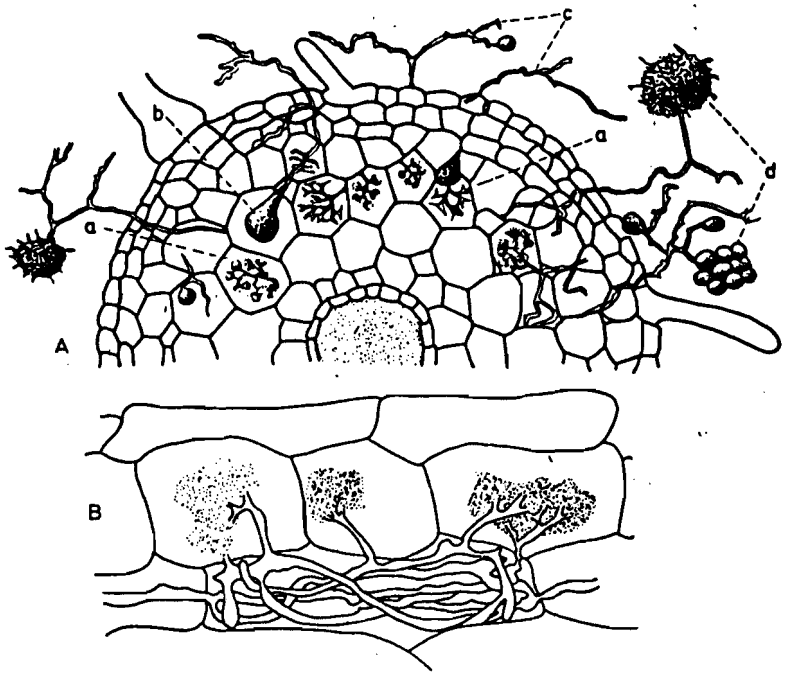


Fig. II.3.4 — *Mycorrhize endotrophe à mycélium vésiculo-arbusculaire.* *A*, coupe schématique : *a*, arbuscules ; *b*, vésicules ; *c*, hyphes pénétrantes ; *d*, fructifications externes ; *B*, arbuscules en cours de digestion (*Endogone fasciculata*) (Harley, 1965; Gerdeman, 1965)

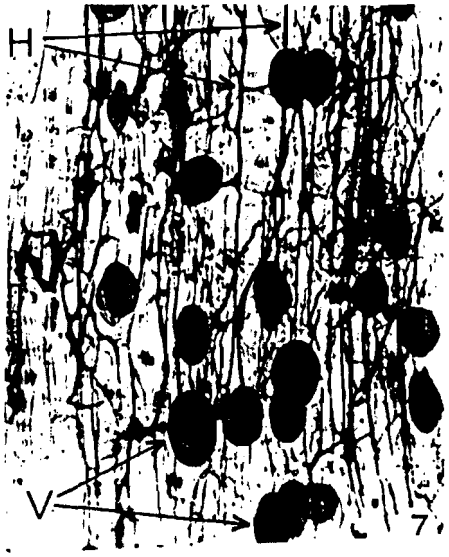


Fig. II.3.5

Cortex d'oignon inoculé avec un champignon endomycorhizien VAM. On distingue les vésicules (V) et les hyphes (H) . grossissement 200 fois.(Hayman, 1978)

ramifications dicotomiques dénommées arbuscules; le noyau de la cellule hôte envahi par l'arbuscule s'agrandit.

Les arbuscules sont le site des échanges de nutrients entre la plante-hôte et le champignon VAM. Les arbuscules ont une durée de vie limitée (4-10 jours); peu de temps après leur formation, ils sont digérés par la plante-hôte et les noyaux des cellules envahies reprennent leur taille normale.

3.3.3. Vésicules (Fig. II.3.5.)

Ce sont des structures globuleuses ovales ou sphériques en position intercalaire ou apicale sur l'hyphe principal. Les vésicules sont intra- ou intercellulaires(suivant l'hôte). Elles renferment des gouttelettes huileuses jaunes.
Si leur paroi est fine, les vésicules jouent le rôle d'organes de réserve, mais lorsque la paroi s'épaissit les vésicules peuvent jouer le rôle de spores dormantes. Quelquefois les vésicules sont si nombreuses que le tissus cortical de l'hôte éclate.

3.3.4. Spores

Les hyphes externes portent de grandes spores que l'on peut extraire du sol par tamisage sous eau. Ces spores sont soit isolées, soit groupées en sporocarpes hypogées (ou parfois épigées). Parfois de véritables spores se forment dans le cortex de l'hôte.

L'isolement des champignons VAM se fait à partir des spores ou des sporocarpes (cf Fig. II.3.4.).

La morphologie et la couleur des spores ont été utilisées pour définir une classification des champignons VAM.
Parmi les types de spores les plus communes citons les cinq suivantes:

- Spores laminées rouge brun
- Spores vacuolées jaunes
- Spores bulbeuses réticulées

- Spores couleur miel sessiles
- Spores réticulées blanches

3.4. Effet de la plante sur le champignon VAM

Les champignons VAM sont des symbiotes obligatoires (on ne sait pas encore les cultiver *in vitro*), ce qui souligne que la plante-hôte joue un rôle essentiel en fournissant au champignon la niche qui lui est indispensable. Les composés carbonés photosynthétisés sont transférés de l'hôte à la plante comme chez les ectomycorhizes mais le métabolisme du C semble être très différent chez les deux groupes de mycorhizes.

D'après les derniers travaux de Paul (1980) et Tinker (1983), il semble que les mycorhizes détournent à leur profit environ 10% du carbone photosynthétisé par la plante. On a discuté antérieurement à propos de la symbiose avec *Rhizobium*, les conséquences de ce prélèvement de photosynthétats par l'endophyte.

3.5. Effet du champignon VAM sur la plante

L'infection endomycorhizienne VAM produit un effet marqué sur la croissance de la plante hôte dans une gamme assez large de conditions. On obtient en général une stimulation de la croissance dans des sols pauvres en phosphore.

On a déjà indiqué que le spectre d'hôte des champignons VAM était très large: en d'autres termes les champignons VAM sont capables d'infecter de très nombreuses plantes. Mais il existe des variations d'une part dans le pourcentage d'infection d'une même plante en fonction des souches considérées (Tableau III.3.2.) d'autre part dans la réponse des plantes à l'infection par une souche de champignon VAM donné, ces variations étant liées à l'espèce végétale ou au cultivar.

Tableau II.3.2 . Poids sec, infection des racines, concentration en P et Zn des parties aériennes de *Vigna unguiculata* (cv. 58-185) inoculé avec différentes souches de champignon VA et cultivé dans le sol Dek stérile.(1). (Ollivier et coll., 1982)

Traitements	Poids sec des parties aériennes (g/plante)	Infection % Fréquence	Infection % Intensité	Concentration des parties aériennes en : P %	Concentration des parties aériennes en : Zn (ppm)
Témoin (sans VA)	1.50 a	0	0	0.053 a	16 a
Gigaspora margarita	2.28 ed	11 a	0	0.069 ab	12 a
Acaulospora laevis	2.20 ed	25 a	0 a	0.073 b	13 a
Glomus fasciculatus (E_3)	2.80 d	90 b	57 c	0.095 cd	18 ab
Glomus macrocarpus	4.20 c	91 b	48 c	0.088 bd	17 ab
Glomus mosseae	5.26 b	100 b	87 b	0.108 c	25 b
Glomus epigaeus	1.84 ae	23 a	5 a	0.063 a	13 a
Témoin (sans VA) + P20 (2)	4.70 bc	0	0	0.138 e	10 a

(1) Les nombres dans les colonnes non suivis de la même lettre diffèrent significativement P = 0.05 (Duncan, 1955).

(2) Addition de P à la dose de 20 ppm.

ableau II.3.3 *Inoculation de jeunes plants de* Casuarina equisetifolia *par un broyat de nodules (apportant* Frankia *sp.) et par un Champignon endomycorhizien* (Glomus mosseae). (Diem et Gauthier, 1982)

Traitements	Nodules poids sec (mg/plante)	Infection par *G. mosseae* (%)	Parties aériennes: Poids sec (g/plante)	Parties aériennes: Azote total (mg/plante)	Parties aériennes: Phosphore total (mg/plante)
(1) Témoin	0 *a*	0	2,69 *a*	22,0 *a*	2,6 *a*
(2) Inoculation avec broyat de nodules	57 *b*	0	4,23 *b*	50,7 *b*	2,1 *a*
(3) Inoculation avec *G. mosseae*	0 *a*	39 *a*	2,32 *a*	19,7 *a*	5,1 *b*
(4) Inoculation avec broyat de nodules et *G. mosseae*	132 *c*	47 *a*	7,69 *c*	96,1 *c*	3,9 *b*
(5) Inoculation avec broyat de nodules et apport de phosphore	107 *c*	0	7,49 *c*	120,5 *c*	3,0 *b*

Caractéristiques du sol utilisé (sol stérile) : pH (KCl), 6,2; phosphore total, 79.10^{-6}; phosphore assimilable (Olsen [10]), 10.10^{-6}; N total, 300.10^{-6}; argile, 8,5 ‰; limon, 3,3 ‰; sables, 94,7 ‰. Le phosphore a été apporté à la dose de 90.10^{-6} sous forme de K_2HPO_4. Les déterminations ont été effectuées lorsque les plantes étaient âgées de 6 mois. Dans chaque colonne ne sont pas significativement différentes (P = 0,05) les moyennes suivies de la même lettre (test de Duncan [12]).

Lorsqu'il se manifeste, l'effet favorable du champignon endomycorhizien sur la croissance de la plante a des origines multiples.

3.5.1. Effet trophique: (P et autres éléments)

L'effet principal des mycorhizes sur la croissance de la plante-hôte est dû à l'accroissement de la capacité de capter et de transporter les éléments immobiles ou presqu'immobiles notamment P, accessoirement Zn et Cu (Tableau II.3.2.).

Les hyphes externes absorbent les nutrients dans le sol, les transportent dans les structures internes du champignon et les transfèrent à l'hôte.

Différents mécanismes peuvent intervenir pour expliquer l'efficacité des champignons mycorhiziens VAM :

(1) Amélioration de l'absorption de P, celle-ci pouvant être attribuée :

- à la diminution de la constante d'absorption Km chez le champignon par rapport à la racine.

  Vitesse d'absorption $S = \frac{Smax\ C_1}{C_1 + Km}$

  où C_1 est la concentration de P dans la solution du sol
- à la création d'un "sink" pour P très important au niveau du champignon mycorhizien VAM
- au fait que le champignon VAM pourrait absorber P même si celui-ci se trouve à des concentrations très faibles.

(2) Accroissement du volume de sol exploré comme dans le cas des ectomycorhizes (cf Fig. II.3.2.), ce processus permettant incontestablement de réduire les conséquences de la lenteur de la diffusion dans le sol d'ions tels que P, Zn, Cu (qui sont pratiquement immobiles).

(3) Accroissement de la longévité de la racine en tant qu'organe d'absorption.

Il est établi désormais que les champignons VAM ne solubilisent pas du P du sol comme on l'a prétendu parfois (Il est surprenant de constater qu'aucune recherche dans ce domaine n'a été entreprise pour les ectomycorhizes).

Quant au transport des éléments dans les hyphes, il a été démontré sans équivoque pour P, Zn Ca. Dans le cas du S, l'effet mycorhize est inexistant car SO_4^- est mobile dans le sol.
La règle suivante énoncée par Sanders et Tinker dès 1973 semble donc valable: "on ne peut attendre de réponse à la mycorhization que lorsque la vitesse d'absorption d'un élément donné (par unité de longueur de racine) correspondant à la croissance maximale de la plante est plus élevée chez la plante mycorhizée que la vitesse d'absorption observée chez la plante non mycorhizée pour lesquelles seuls la diffusion et le mass flow interviennent".

Chez certaines plantes peu exigeantes en P, telle que Acacia holosericea, la mycorhization VAM peut accélérer l'absorption de P dans des proportions telles que la plante hôte meurt par intoxication phosphatée (Cornet, 1983).

3.5.2. Effet sur l'alimentation en eau

Les champignons VAM améliorent l'absorption de l'eau par la plante-hôte. Il s'agit en fait d'une conséquence de l'amélioration de la nutrition en P car on sait qu'il existe une relation étroite entre la tolérance à la sécheresse d'une plante et sa teneur en P.

3.5.3. Effet sur l'équilibre hormonal de la plante

On a émis l'hpothèse que l'avancement de la floraison de la tomate du maïs, du framboisier, du pétunia du coton résultant de l'infection mycorhizienne pourraient être dû à un effet hormonal.

3.5.4. Protection contre les organismes pathogènes du sol

3.5.4.1. Champignons

On trouve dans la littérature de nombreux résultats suggérant que les champignon VA protégeraient les plantes-hôtes contre certains pathogènes. En fait il ne s'agirait pas d'un effet de protection direct: C'est ainsi que l'infection VAM,en stimulant la lignification des tissus de l'hôte, ralentirait ou inhibiterait la pénétration du pathogène.

3.5.4.2. Nématodes

La mycorhization pourrait dans certains cas réduire le développement des nématodes (nématodes à galles),dans d'autres cas réduire les effets des attaques de nématodes. Cet effet bénéfique dépend non seulement de la nature des partenaires impliqués mais aussi de facteurs environnementaux.

3.5.5. Effet sur légumineuses et non légumineuses fixatrices de N_2.

Contrairement aux graminées, les légumineueses exploitent médiocrement le P du sol. C'est pourquoi, elles répondent en général bien à l'infection mycorhizienne VAM. Les expériences conduites en serre ont amplement démontré l'intérêt de cette triple symbiose dans le cas de légumineuse à graines et de légumineuses forestières. Des essais au champ (F. Ganry) viennent de montrer que l'infection mycorhizienne VA pourrait accroître significativement la part de l'azote fixé dans la nutrition azotée de la plante.

Tout récemment on a montré que l'infection mycorhizienne pouvait stimuler spectaculairement la fixation de N_2 chez *Casuarina equisetifolia* (non-légumineuse fixatrice de N_2) cultivé dans un sol carencé en P (Tableau II.3.3.).

3.6. Facteurs limitants

Comme dans le cas des autres associations symbiotiques il est difficile de séparer les effets des facteurs limitants sur la plante-hôte des effets directs de ces facteurs sur l'établissement et l'activité de l'association. Toutefois, il est possible de dégager de la littérature des tendances suivantes :

3.6.1. Facteurs édaphiques

3.6.1.1. Eau

Bien que l'on connaisse des plantes aquatiques infectées par les VAM, on admet en général que l'infection VAM est handicapée par l'engorgement du sol. La sécheresse peut inhiber l'infection mais son effet sur l'invasion du cortex par les hyphes est moins marqué.

3.6.1.2. pH

En général la tolérance au pH est assez bonne. Toutefois on admet en général que les souches du genre *Glomus* préfèrent les sols neutres et alcalins ($\geq$ 6,0) alors que *Acaulospora* et *Gigaspora*, sont plus tolérantes à l'acidité. Il faut toutefois se garder de généraliser.

3.6.1.3. Teneur en P

L'expérience rapportée à la Fig. II.3.6. montre clairement que l'infection mycorhizienne passe par un maximum pour une concentration optimale en P.

Pour cette concentration optimale (et faible) en P, il est probable que la perméabilité de la membrane des cellules racinaires soit accrue, d'où exsudation plus importante des acides aminés et sucres, ce qui stimulerait la croissance des champignons VAM et leur pénétration dans la plante (Ratnayake et coll. 1978; Graham et coll. 1981). Dans ces conditions l'effet favorable de la mycorhization sur la croissance de la plante est marqué.

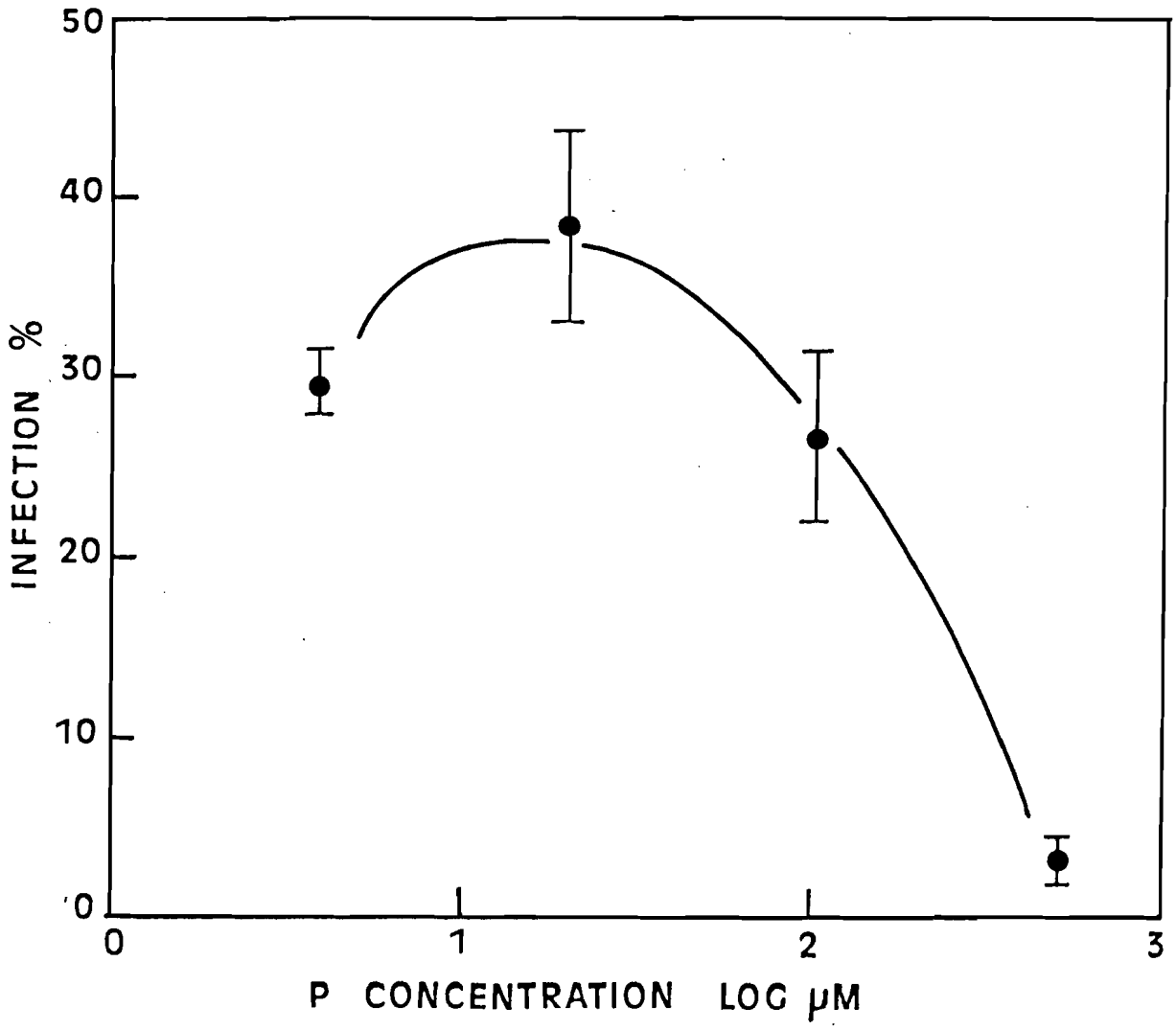


Fig. II.3.6 Influence de la teneur du milieu nutritif sur l'infection des racines de Soja par un champignon VAM (Glomus mosseae). Les plantes étaient cultivées sur un support de perlite en présence de solutions nutritives (renouvelées) renfermant des teneurs croissantes en P. Les segments verticaux représentent les erreurs standard de la moyenne. (Bethenfalvay et Yodes, 1981)

Lorsque la teneur du sol en P est excessive, l'infection VAM est très faible ou nulle sans doute par suite d'une diminution de la perméabilité de la membrane des cellules racinaires. Il n'y a, bien évidemment, aucune modification de la croissance de la plante. Toutefois il pourrait exister des souches VAM tolérantes au P. Lorsque la teneur du sol en P est nulle ou très faible, il n'y a ni infection, ni effet sur la croissance de la plante. Il est alors indispensable d'ajouter une certaine dose (faible mais non négligeable) de P au sol pour que l'effet de la mycorhization se manifeste. Bien entendu, la teneur optimale en P varie en fonction de la plante-hôte considérée et, sans doute, en fonction de la souche VAM.

3.6.1.4. Azote

Un apport d'engrais azoté excessif (200 kg N/ha) exerce un effet négatif. Toutefois on notera que des sols fertiles assez riches en N peuvent renfermer des populations abondantes de VAM.

3.6.1.5. Pesticides

Alors que certains nématicides peuvent favoriser l'infection mycorhizienne, les fongicides systémiques (benonyl) sont inhibiteurs. Il faut donc les proscrire lors d'essais d'inoculation. On pourrait toutefois utiliser les fongicides dans les parcelles témoins où l'on désire éliminer les mycorhizes.

3.6.1.6. Sols pollués par les métaux lourds

Les métaux lourds (Cd, Zn, par ex.) inhibent la croissance des endomycorhizes (comme celle des ectomycorhizes). Mais la découverte de souches de *Glomus mosseae* tolérantes (Tinker 1982) permet d'entrevoir la possibilité d'utiliser de telles souches pour régénération de sols pollués.

3.6.2. Facteurs climatiques

3.6.2.1. Température

La réponse de l'infection à la température présente un optimum qui varie suivant les souches VAM et, sans doute, les plantes-hôtes. Dans les sols tropicaux où la température est élevée (30-40°C) l'infection est rapide: 53% des racines d'arachide sont infectées en 16 jours au Sénégal.

L'effet de la température sur le fonctionnement de l'association mycorhizienne présente un optimum qui est situé autour de 30°C. Ce n'est qu'au délà de 40°C que la température gène le fonctionnement de l'association mycorhizienne. En général on peut admettre que les champignons VAM préfèrent des températures plus élevées que les plantes-hôtes (tempérées).

3.6.2.2. Lumière

Une diminution de l'intensité lumineuse est défavorable à l'infection. L'ombrage et la réduction de la durée d'éclairement réduisent la densité d'infection et le développement des arbuscules plus que la longueur de racine infectée (Hayman, 1978).

3.6.3. Interaction avec d'autres microorganismes du sol

Sur le plan pratique les interactions les plus importantes concernent les pathogènes des racines. La présence de ces pathogènes (nématodes) notamment peut réduire l'infection mycorhizienne VAM. Mais on a vu plus haut (3.5.4.) que les champignons VAM pouvaient minimiser l'effet des pathogènes sur la croissance de la plante.

3.7. Applications

3.7.1. Technique d'inoculation avec les endomycorhizes VAM

La Fig. II.3.7 montre les différentes étapes de la technique d'endomycorhization.

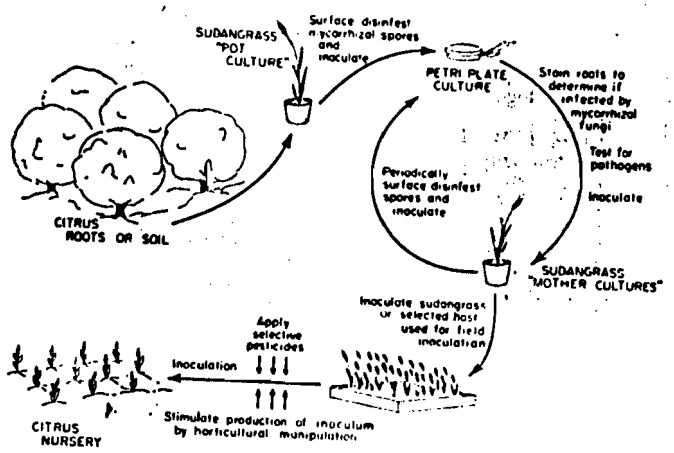


Fig. II.3.7 Schéma montrant comment l'on peut envisager l'isolement et la multiplication de champignons endomycorhiziens en vue de leur inoculation en pépinière de Citrus (Menge et coll. 1977).

3.7.1.1. Première étape: isolement

L'isolement se fait à partir de spores qui sont désinfectées et testées pour leur stérilité (élimination des pathogènes).

3.7.1.2. Deuxième étape: multiplication

On a déjà indiqué qu'on ne sait pas encore cultiver les champignons in vitro, ce qui constitue évidemment un handicap considérable par rapport aux autres symbiotes racinaires. On est donc obligé de multiplier la souche isolée
en la multipliant sur les racines d'une plante hôte: graminée (soudan grass, par exemple) ou légumineuse (Vigna unguiculata, par exemple).

3.7.1.3. Préparation de l'inoculum et inoculation

Après un délai de 2 mois on prélève les racines de la plante hôte avec le chevelu très fin formé par les hyphes et les spores. On coupe les racines infectées avec les hyphes et spores en fragments qui sont placés dans le trou de plantation (0,5 à 1 g de racines - poids frais/plante).
Pour économiser l'inoculum H.G. Diem préconise une méthode modifiée qui consiste à broyer ou mixer les racines infectées, à en faire une suspension avec laquelle on arrose le trou de plantation.
On a également mis au point récemment un inoculum constitué par les racines infectées incluses dans un polymère, cet inoculum pouvant être conservé très longtemps à l'état sec (Diem, 1982).

3.7.1. Conditions du succès de l'inoculation avec les endomycorhizes VAM.

Ces conditions sont pratiquement les mêmes que celles qui ont été définies pour les ectomycorhizes . Nous les rappelerons ici brièvement.

On peut s'attendre à une réponse positive à l'inoculation VAM

lorsque les deux conditions suivantes sont remplies :

(1) sol dépourvu ou pauvre en champignons VAM

(2) sol dont la teneur en P est faible ou moyenne.

D'autre conditions, secondaires, doivent être remplies notamment bonne aération, présence dans le sol d'aliments en quantité suffisante pour obtenir une croissance normale de la plante.

3.7.2. Résultats en sols stériles et non stériles

3.7.3.1. Résultats en sols stériles

Dans les pépinières et dans certaines plantations fruitières ou florales, où le sol est stérilisé (vapeur, VAPAM, bromure de méthyle) pour éviter la multiplication des pathogènes, l'inoculation des plantes - notamment les plantes très mycotrophes telles que les *Citrus* - par des champignons VAM est une nécessité désormais reconnue. Les champignons VAM favorisent non seulement l'assimilation par la plante de P et des oligo-éléments mais permet d'augmenter très significativement le pourcentage de reprise des plants lors de leur mise en place. La culture des *Citrus* en Californie fait largement appel à l'inoculation VAM.

3.7.3.2. Résultats en sols non stériles

Si les résultats en sols stériles sont assez constants et, dans l'ensemble, se traduisent par une stimulation significative de la croissance de la plante hôte, les résultats en sols non stériles sont irréguliers. L'absence de réponse à l'inoculation avec les champignons VAM s'explique, bien souvent par la présence dans le sol d'une microflore VAM native efficace. C'est pour cette raison qu'après transplantation au champ, des plants d'*Acacia holosericea* bien mycorhizés en pépinière n'ont manifesté que pendant 1 an une croissance supérieure à celle des plants non mycorhizés.

Dans les sols où les champignons VAM sont présents, mais distribués irrégulièrement, l'inoculation VAM peut uniformiser la croissance de la plante hôte. Dans le cas du soja semé dans un sol tropical (Sénégal) l'inoculation VAM a effectivement amélioré l'uniformité de la croissance des plantes. En outre, l'inoculation VAM a amélioré la fixation de N_2 chez cette plante de sorte que le pourcentage d'azote fixé dans la nutrition azotée du soja est passée de 23,7% dans les parcelles non inoculées avec Glomus mosseae à 41,4% dans les parcelles inoculées avec ce champignon VAM (Ganry et coll. 1982).

METHODE PHILLIPS ET HAYMAN POUR METTRE EN EVIDENCE LES VAM :

- Incuber les racines dans solution KOH 10% à 90°C pendant 1 h (par exemple au bain-marie)
- Rincer les racines à l'eau
- Rincer la dernière fois les racines avec HCl dilué(5 ml HCl dans 495 ml eau)
- Mettre les racines dans solution 0,05% bleu trypan dans lactophénol pendant 3-5 mn à 90°C ou laisser les racines dans le colorant pendant 1 minute à la température du labo
- Après coloration, retirer les racines du colorant et les laisser dans lactophénol pour éliminer l'exès du colorant.

DOCUMENTATION

MICROBIOLOGIE GENERALE

R.Y. STANIER, E.A. ADELBERG et J. INGRAHAM. 1976.- The microbial world, Prentice-Hall, Englewood, Cliffs, New-Jersey.

H. Leclerc, 1981. Microbiologie générale. Doin, Paris.

Ecologie générale. - P. DUVIGNEAUD. 1974. - La synthèse écologique, Doin, Paris.

G. LEMEE 1967. - Précis de Biogéographie, Masson, Paris.

Microbiologie du sol.

R. BLONDEAU. 1980.- Fixation biologique de l'azote atmosphérique Vuibert, Paris.

B. BOULLARD. 1968.- Les mycorhizes, Masson, Paris.

G. BACHELIER. 1963.- La vie animale dans les sols, ORSTOM, Paris.

Y. DOMMERGUES et F. MANGENOT. 1970.- Ecologie microbienne du sol, Masson, Paris.

Y. DOMMERGUES. 1977.- Biologie du sol. Presses Universitaires de France (Collection que sais-je? N°399).

Y. DOMMERGUES et S. KRUPA (ed.). 1978.- Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Elsevier Amsterdam.

Y. DOMMERGUES et H.G. DIEM (ed.).- 1982. Microbiology of tropical soils, Martinus Nijhoff, La Haye.

K.L. GILES et ATHERLY. 1981.- Biology of the Rhizobiaceae. Academic Press, New York.

R.W.F. HARDY and A.H. GIBSON (ed.). 1977.- A treatise on dinitrogen fixation. Section IV: Agronomy and Ecology. John Wiley, New York. 527 pp.

R.W.F. HARDY and W.S. SILVER (ed.). 1977.- A treatise on Dinitrogen Fixation. Section III Biology. John Wiley, New York. pp 675.

G.C. MARKS, T.T. KOZLOWSKI. 1973.- Ectomycorrhizae. Their ecology and physiology. Academic Press, New York.

F.E. SANDERS, B. MOSSE, P.B. TINKER. 1976.- Endomycorrhizas Academic Press, London.

TABLE DES MATIERES

Chapitre 1. Les légumineuses 1

1. Les plantes-hôtes 1

2. Les *Rhizobium* 1

3. L'infection de la plante-hôte et la nodulation 4

4. Le fonctionnement du nodule 12

5. Fixation de N_2 au champ 18

5.1. Méthodes d'estimation de la fixation de N_2 19

5.2. Résultats 28

6. Facteurs limitant la fixation de N_2 au champ 29

6.1. Facteurs édaphiques 29

6.2. Facteurs climatiques 30

6.3. Facteurs biotiques 30

7. Accroissement de la fixation de N_2 32

7.1. Recherches sur la plante-hôte 33

7.2. Approche microbienne 36

7.3. Pratiques culturales 39

8. Légumineuses arborescentes(pour mémoire)

Chapitre 2. Les non-légumineuses fixatrices de N_2 41

1. Les plantes-hôtes 41

2. L'endophyte, *Frankia* 42

3. Infection de la plante-hôte: génèse du nodule; spécificité 43

4. Structure du nodule 46

5. Particularités concernant la fixation de N_2 chez les plantes actinorhiziennes 47

6. Facteurs limitant la nodulation et la fixation de N_2 48

7. Applications 49

8. Accroissement de la fixation de N_2 51

9. La symbiose Parasponia-Rhizobium 52

10. Pseudo-nodules 53

Chapitre 3. Les symbioses mycorhiziennes 54

1. Introduction 54

2. Ectomycorhizes 55

2.1. Plantes-hôtes 55

2.2. Morphologie et structure des ectomycorhizes 55

2.3. Les champignons ectomycorhiziens 56

2.4. Fonctionnement de la symbiose 57

2.5. Facteurs limitants 58

2.6. Applications 60

3. Endomycorhizes vésiculo-arbusculaires (VAM) 63

3.1. Plantes-hôtes 63

3.2. Morphologie de la racine endomycorhizienne 63

3.3. Les champignons endomycorhiziens VAM 64

3.4. Effets de la plante sur le champignon VAM 66

3.5. Effets du champignon VAM sur la plante 66

3.6. Facteurs limitants 70

3.7. Applications 72

Annexe : Méthode Phillips et Hayman 76

Documentation 77