

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

présentée à

**L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNIQUES DE LILLE**

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'USTL

SPECIALITE : MICROBIOLOGIE

par

Ibrahima NDOYE

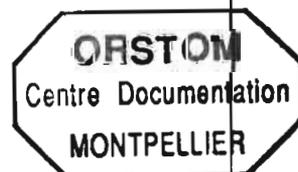
**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA
SYMBIOSE ENTRE *AZORHIZOBIUM*,
RHIZOBIUM ET *SESBANIA ROSTRATA***

soutenue le 19 janvier 1990 devant la commission d'examen
composée de

MM. J. GUILLAUME
R. TAILLIEZ
G. TRUCHET
B. DREYFUS
Mme M. HOLSTERS

Président
Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice

- 5 JUIN 1992



084 SYMBIO 02, NDO

#200061441
(expt)
Non Num
F 30.891

AVANT - PROPOS

La rédaction d'une thèse est toujours une tâche longue et souvent difficile. Il est pourtant une page facile à écrire, la première où il est possible de remercier tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué à l'élaboration de cette thèse. Qu'ils me pardonnent si je ne puis les citer tous ici.

Ce travail a été effectué en grande partie au laboratoire de Biologie des Sols de l'ORSTOM à DAKAR (Sénégal).

Je remercie les autorités scientifiques Sénégalaises en particulier Monsieur Mamadou MBOUP Directeur des Affaires Scientifiques et Techniques au Ministère du Plan et de la Coopération et la Direction de l'ORSTOM qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Depuis plusieurs années, j'ai eu la chance de travailler à côté de Monsieur Bernard DREYFUS, chef du laboratoire de l'ORSTOM sur la fixation biologique de l'azote. Qu'il trouve ici toute ma sincère gratitude pour le soutien et l'intérêt porté à mes recherches. Je le remercie tout particulièrement de son amitié et de sa confiance.

Une partie de ce travail a été réalisée au laboratoire de Biologie Moléculaire des Relations Plantes-Microorganismes du Centre INRA-CNRS de Toulouse.

Je tiens à remercier Mrs. BOISTARD et DENARIE d'avoir bien voulu m'y accueillir.

C'est Monsieur G. TRUCHET Directeur de recherche et chef du laboratoire de Cytologie Végétale au Centre INRA-CNRS qui a eu la rude tâche de m'initier aux techniques de cytologie. Malgré des occupations multiples, sa patience a supporté mes incompétences en la matière ; il a lu et corrigé on ne peut plus attentivement tous mes documents. Même si ses remarques sont parfois un peu traumatisantes, il a réussi à me faire transformer les différents manuscrits que je lui ai soumis en un document, je l'espère, lisible et cohérent. Je lui en suis profondément reconnaissant. Je ne saurai oublier dans son équipe, le dynamisme, l'enthousiasme et la précieuse collaboration de Mr. J. VASSE, Mme Françoise de BILLY et Melle Sylvie CAMUT.

Avec la collaboration de l'ORSTOM, de l'ISRA et du laboratoire du Professeur Van MONTAGU en Belgique, nous avons pu mettre en place et mener à bien des essais en plein champ. J'ose espérer que ce travail profitera au monde paysan.

Monsieur J. GUILLAUME et Monsieur R. TAILLIEZ furent mes Professeurs à Lille. Ils ont bien voulu retenir ma candidature pour une inscription en nouvelle thèse et m'ont beaucoup aidé dans mes démarches administratives. Ils ont accepté de lire ce manuscrit et de participer à ce jury, de même que Monsieur G. TRUCHET et Madame M. HOLSTERS de l'Université de Gand en Belgique. Je tiens à leur témoigner toute ma gratitude.

Je remercie tous les membres de l'équipe du laboratoire de Dakar. L'assistance de Mrs. Saer NDIAYE, Lassana FALL et Jean BAKHOUM m'a été précieuse.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Madame CISSE née Anne Marthe KONTE qui a assuré la dactylographie du manuscrit, Monsieur Jean Marc LEBLANC pour la part prépondérante qu'il a prise dans la mise en forme pratique de certains documents et Monsieur Marc DUCOUSSO pour l'aide apportée à la réalisation des diapositives.

Une pensée affectueuse va à ma femme qui a su me comprendre et me soutenir durant mes longs séjours hors du Sénégal.

TITRE : CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA SYMBIOSE ENTRE *AZORHIZOBIUM*, *RHIZOBIUM* ET *SESBANIA ROSTRATA*.

MOTS CLES : *AZORHIZOBIUM* ; *RHIZOBIUM* ; FIXATION D'AZOTE ; NODULES DE TIGE ; *SESBANIA ROSTRATA*.

RESUME : La légumineuse tropicale *Sesbania rostrata* peut développer des nodules fixateurs d'azote à la fois sur les racines et les tiges.

Après isolement d'un grand nombre de souches à partir de nodules de tige de *S. rostrata* et de nodules de racine de diverses espèces de *Sesbania*, des études taxonomiques, physiologiques et de spectre de nodulation, nous ont permis de préciser la séparation de ces souches en deux groupes distincts appartenant aux genres *Azorhizobium* et *Rhizobium*.

Toutes les souches d'*Azorhizobium* induisent la formation de nodules effectifs aussi bien sur les racines que sur les tiges de *S. rostrata*. Les souches de *Rhizobium* induisent également des nodules effectifs sur les racines de cette plante, mais se répartissent en 4 catégories selon leur aptitude ou non à induire des nodules sur la tige de *S. rostrata* et aussi selon leurs degrés d'effectivité.

L'étude de l'ontogénèse des nodules racinaires de *S. rostrata* induits par *Azorhizobium* ORS571 nous a permis de décrire :

- Un mode d'infection comportant deux étapes : invasion intercellulaire par les bactéries puis formation de cordons d'infection.
- Un mode original de libération des *Azorhizobium* dans le cytoplasme de la cellule hôte et un type de développement nodulaire encore jamais décrit à ce jour.

La quantification de la fixation d'azote par la méthode isotopique ^{15}N nous a permis de mettre en évidence le potentiel fixateur d'azote élevé de *S. rostrata*, soit 110 kg d'azote fixé par hectare en 60 jours. Cette propriété nous a conduit à étudier *S. rostrata* comme plante fourragère et à mener des essais en milieu paysan en utilisant *S. rostrata* comme engrais vert dans les rizières. Nous avons ainsi obtenu sur plusieurs années un doublement des rendements du riz ; l'apport de l'engrais vert étant dans tous les cas supérieur à l'équivalent de 100 kg d'azote à l'hectare.

TITLE : CONTRIBUTION TO THE STUDY OF THE *AZORHIZOBIUM*, *RHIZOBIUM* AND *SESBANIA ROSTRATA* SYMBIOSIS.

KEYWORDS : *AZORHIZOBIUM* ; NITROGEN FIXATION ; *RHIZOBIUM* ; STEM NODULES ; *SESBANIA ROSTRATA*.

SUMMARY : The tropical legume, *Sesbania rostrata*, can bear nitrogen fixing nodules both on roots and stems.

We have isolated several bacterial strains from stem nodules of *S. rostrata* and from root nodules of different *Sesbania* species. After taxonomic, physiological and nodulation spectrum studies we have precised the separation of these strains in two distinct groups belonging to the genera *Azorhizobium* and *Rhizobium*. All *Azorhizobium* strains form nitrogen fixing nodules both on the roots and stems of *S. rostrata*. *Rhizobium* strains isolated from root nodules of other *Sesbania* species also form effective nodules on the roots of *Sesbania rostrata*, but can be divided in four groups according to their ability to induce effective nodules on *S. rostrata* stems. Root infection of *S. rostrata* by *Azorhizobium* ORS571 involves both an intercellular invasion and the development of infection threads.

Release of bacteria in the host cytoplasm and nodule development are very original and have not yet been described.

The amount of N₂ fixed by *S. rostrata* estimated by using ¹⁵N method, is about 110 kg ha⁻¹ during a 60 day-growth. This high nitrogen-fixing potential led us to study *S. rostrata* as forage legume and made *S. rostrata* a useful green manure in paddy fields. Rice yields are successfully doubled over several growing seasons. The introduction of green manure is superior to the equivalent of 100 kg N/ha⁻¹

ABREVIATIONS

ADF	:	Acide détergent fiber partie disparue après à l'acide sulfurique 1N
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ADRAO	:	Association pour le Développement de la Riziculture en Afrique de l'Ouest
AIEA	:	Agence Internationale à l'Energie Atomique
ARA	:	Activité ribonucléique
DDSA	:	Anhydrique dodécényl succinique
DMP30	:	[2,4,6 - tris (Diméthyl amino méthyl)] phénol
ENA	:	Extractif non azoté
Hac	:	Hair curling
Had	:	Hair deformation
IEMVT	:	Institut d'Etude de Médecine Vétérinaire Tropicale
IRRI	:	International Rice Research Institute
ISRA	:	Institut Sénégalais de Recherches Agricoles
LNERV	:	Laboratoire National de l'Elevage et des Recherches Vétérinaires (Sénégal)
MAT	:	Matière azotée totale
mn	:	minute
MNA	:	Anhydride méthyl norbornène
MS	:	Matière sèche
NDF	:	Neutral détergent fiber partie disparue après attaque au lauryl sulfate de sodium

nm	:	nanomètre (10^{-9} mètre)
ORSTOM	:	Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération
PHB	:	Poly- β -hydroxybutyrate
pSym	:	plasmide symbiotique
q.s.p.	:	quantité suffisante pour
v/v	:	volume/volume
μm	:	micromètre (10^{-6} mètre)
μmole	:	micromole (10^{-6} mole)

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION GENERALE	13
Chapitre I : RHIZOBIUM ET AZORHIZOBIUM	19
I. Introduction	20
II. Matériels et Méthodes	24
1- Souches bactériennes	24
2 - Isolement des souches d'Azorhizobium et de Rhizobium	24
3 - Milieux de culture pour Rhizobium et Azorhizobium	24
3.1. Milieu YM	24
3.2. Milieu YL	26
3.3. Milieu pour la fixation d'azote in vitro	26
3.4. Milieu adapté à l'étude des caractères nutritionnels et de la taxonomie numérique	26
4 - Milieu de culture pour les plantes hôtes	27
4.1. Stérilisation et germination des graines	27
4.2. Milieu de culture des plantes	27
5 - Culture des plantes	29
5.1. Cultures en tubes	29
5.2. Cultures en vases de végétation	29
6 - Inoculation des plantes	29
6.1. Inoculation des racines	29
6.2. Inoculation des tiges de <i>S. rostrata</i>	30
7 - Evaluation de la fixation symbiotique	30
7.1. Dosage de l'azote minéral	30
7.2. Dosage de l'activité nitrogénase	31
7.2.1. Activité réductrice d'acétylène	31
7.2.2. Principe de la méthode	31
7.2.3. Conditions expérimentales	32
7.2.4. Technique du dosage	32
7.2.5. Calcul de la quantité de C ₂ H ₄ produite	32

III. Résultats

1 - Caractérisation physiologique et taxonomique	35
1.1. Isolement des souches bactériennes	35
1.2. Test de fixation libre	35
1.3. Taxonomie numérique	35
2 - Le spectre d'hôte	38
2.1. La nodulation de racine	38
2.2. La nodulation de tige	38
3 - Effectivité des souches de Rhizobium et d'Azorhizobium	41

IV. Discussion et conclusion 45

Chapitre II - INFECTION ET DEVELOPPEMENT DES NODULES DE RACINE DE SESBANIA ROSTRATA 47

I - Introduction 48

1. Infection	48
1.1. Infection par poils absorbants	48
1.2. Infection par pénétration intercellulaire	49
2 - Développement du nodule	50
2.1. Nodules radiculaires des légumineuses tempérées	51
2.1.1. La phase organogénique	51
2.1.3. Le nodule mature	52
2.2. Nodules radiculaires de légumineuses tropicales	53
2.3. Nodules caulinaires de légumineuses tropicales	54
2.3.1. L'infection	55
2.3.2. Développement du nodule	56
2.3.3. Le nodule mature	56

II - Matériels et Méthodes 57

1 - Culture de <i>S. rostrata</i>	57
2 - Méthodes de fixation et d'inclusion	57
2.1. La fixation	57
2.2. La deshydratation	57
2.3. Imprégnation dans la résine d'inclusion	58
2.3.1. Préparation de l'Epon	58
2.3.2. Imprégnation des échantillons	58
2.4. Inclusion dans des gélules et polymérisation	58

3 - Microtomie et microscopie	59
3.1. Microscopie photonique	59
3.2. Microscopie électronique	59
4 - Méthode d'éclaircissement	59
4.1. Racines entières	59
4.2. Sections de nodules	60
III - Résultats	61
1 - Infection racinaire et développement des nodules	61
1.1. Sites de nodulation et mode d'infection	61
1.2. Développement du nodule	62
2 - Différenciation ultrastructurale des cellules végétales et des bactéroïdes	65
2.1. Poches d'infection intercellulaires	65
2.2. Filaments d'infection et libération bactérienne	66
2.3. Différenciation du tissu fixateur	67
IV - Discussion	70
Chapitre III - QUANTIFICATION DE L'AZOTE FIXE PAR S. ROSTRATA	79
I - Introduction	80
II - Matériels et Méthodes	82
1 - Méthodes de culture	82
2 - Estimation de l'azote fixé par S. rostrata et S. sesban : méthode par différence et isotopique ¹⁵N	82
2.1. Dispositif expérimental	82
2.2. Préparation du sol	82
2.3. Culture des plantes	83
2.4. Technique d'inoculation	83
2.5. Traitement	84
2.6. Estimation de la fixation d'azote	84
2.6.1. Méthode de la différence	85
2.6.2. Méthode directe de la dilution isotopique	85
2.7. Analyses statistiques	89

III - Résultats et Discussion	90
1 - Nodulation et activité fixatrice d'azote de <i>S. rostrata</i> et de <i>S. sesban</i>	90
2 - Estimation de l'azote fixé par <i>S. rostrata</i> et <i>S. sesban</i>	90
2.1. Influence des différents traitements sur le poids sec et la teneur en azote total de <i>S. rostrata</i> et de <i>S. sesban</i> .	90
2.2. Influence de la submersion et du drainage du sol sur la nodulation	92
2.3. Influence des différents traitements sur l'excès isotopique et l'utilisation de l'engrais appliqué	92
2.4. Effet des différents traitements sur la fixation d'azote	92
2.5. Nodulation et fixation d'azote	96
2.6. Estimation de la fixation d'azote par la méthode de dilution isotopique	96
2.7. Estimation de la fixation d'azote par la méthode de différence	96
2.8. Estimation de la fixation d'azote	97
2.9. Effet de la submersion du sol	97
2.10. Quantité d'azote dérivé du sol, de l'engrais azoté et coefficient d'utilisation de l'engrais (F.U.E.)	98
2.11. Méthodologie relative à l'évaluation de la fixation d'azote	99
IV - Conclusion	102
Chapitre IV - UTILISATION DE SESBANIA ROSTRATA COMME ENGRAIS VERT ET FOURRAGE	103
I - Introduction	104
II - Matériels et Méthodes	107
1 - Utilisation de <i>S. rostrata</i> comme engrais vert	107
1.1. Les traitements	107
1.2. Dispositif expérimental	107
1.3. Analyse de sols	107
1.4. Fumures minérales	107
1.5. Analyse des résultats	111
1.6. Culture des légumineuses	111
1.6.1. Préparation des graines	111
1.6.2. Inoculation et semis	111
1.7. Culture du riz	111
1.7.1. Préparation d'une pépinière	111
1.7.2. Enfouissement des légumineuses	113
1.7.3. Repiquage du riz	113
1.7.4. Récolte du riz	113
1.8. Estimation de la quantité d'azote et de l'engrais vert enfoui dans les rizières	113
2 - Utilisation de <i>S. rostrata</i> comme fourrage	113
2.1. Productivité	113

2.1.1. Les traitements	113
2.1.2. Dispositif expérimental	117
2.1.3. Conditions agronomiques	117
2.1.4. Fumures minérales	117
2.1.5. Inoculation et semis	117
2.1.6. Coupes	117
2.1.7. Analyse des résultats	117
2.2. Fourrage	120
2.3. Digestibilité	120
2.4. Analyses chimiques	120
III - Résultats	122
1 - Influence de <i>S. rostrata</i> utilisée comme engrais vert sur le rendement en riz.	122
1.1. Essais en parcelles expérimentales	122
1.2. Essais menés par les paysans	122
2 - Utilisation de <i>S. rostrata</i> comme fourrage	125
2.1. Productivité	125
2.2. Valeur alimentaire de <i>S. rostrata</i>	125
IV - Discussion et Conclusion	129
CONCLUSION GENERALE	132
BIBLIOGRAPHIE	137
PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES	152

INTRODUCTION GENERALE

La fixation biologique de l'azote qui consiste en la réduction de l'azote atmosphérique (N_2) en ammoniacque (NH_3) a une importance majeure dans le fonctionnement de la biosphère. Elle apparaît comme l'un des processus fondamentaux parmi les cycles biogéniques se déroulant dans le sol. A côté des microorganismes fixant seuls l'azote atmosphérique, tels que *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter vinelandii*, *Anabaena cylindrica* ou *Clostridium pasteurianum*, le sol recèle des bactéries des genres *Rhizobium* et *Azorhizobium* capables de vivre en association avec des légumineuses, du genre *Bradyrhizobium* susceptibles de s'associer à des légumineuses et à la non légumineuse *Parasponia* ou du genre *Frankia* qui induit la nodulation de non légumineuses comme *Alnus* et *Casuarina*. Ces bactéries sont toutes capables de fixer l'azote au profit de la plante avec laquelle elles entrent en symbiose. L'importance agronomique et écologique de ces symbioses fixatrices de N_2 est considérable. Ainsi, les bactéries fixatrices qui vivent en association avec les plantes de la famille des légumineuses sont responsables de la plus grande partie de la fixation d'azote dans les sols agricoles et ont été étudiées activement depuis un siècle (Nutman, 1981).

La symbiose entre les bactéries des genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* ou *Azorhizobium* et les plantes supérieures de la famille des légumineuses est le résultat d'interactions complexes entre la bactérie et la plante hôte.

Plusieurs étapes de développement dont les modalités peuvent varier selon l'association symbiotique considérée conduisent à la formation du nodule. D'une manière très générale, l'infection d'une légumineuse par une espèce de *Rhizobium*, de *Bradyrhizobium* ou d'*Azorhizobium* provoque la formation d'un méristème nodulaire par dédifférenciation locale des cellules du cortex racinaire. L'activité méristématique conduit ensuite au développement d'un organe spécialisé, le nodule dont les cellules centrales sont envahies par les bactéries (voir les revues de Vincent, 1980 ; Newcomb, 1981 ; Verma et Long, 1983). La plante subvient aux besoins énergétiques de la bactérie en fournissant des substances carbonées résultant de la photosynthèse; elle fournit en outre un microenvironnement très particulier nécessaire à la fixation de l'azote et synthétise les enzymes permettant l'assimilation rapide de l'ammoniacque produit. Parallèlement, à l'intérieur du nodule, les bactéries se différencient en bactéroïdes capables de réduire l'azote moléculaire N_2 en NH_3 , au sein des nodules matures.

La bactérie comme la plante possède de nombreux gènes impliqués dans la symbiose. Chaque étape est ainsi sous le contrôle génétique des deux partenaires. L'identification des gènes intervenant dans la relation symbiotique passe par la recherche, la sélection de variants génétiques ou mutants de la bactérie et de la plante affectés dans leurs propriétés symbiotiques.

De nos jours, un certain nombre de mutants bactériens qui provoquent des arrêts dans le programme de développement du nodule ont été obtenus. Ces mutants ont permis de définir les étapes successives menant à la formation d'un nodule, notamment le stade d'invasion par les bactéries et d'identifier chez les bactéries, les gènes codant pour la synthèse du complexe enzymatique, la nitrogénase. Plusieurs gènes impliqués dans la nodulation ont été identifiés grâce aux méthodes de génétique et de biologie moléculaire (mutagénèse, utilisation de plasmides conjugatifs, clonage et hybridations moléculaires de régions du génome,...) (Debellé et Sharma, 1986 ; Van den Eede *et al.*, 1987 ; Davis *et al.*, 1988 ; voir les revues Rolfe et Gresshoff, 1988 ; Long, 1989).

Les espèces de *Rhizobium* à croissance rapide possèdent généralement des plasmides de grande taille appelés plasmides symbiotiques (pSym) car ils portent des gènes essentiels pour la nodulation et la fixation d'azote. Chez les symbiontes des genres *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium*, les gènes symbiotiques ne sont apparemment pas situés sur les plasmides.

Certains des gènes identifiés, interviennent lors des étapes précoces de la symbiose, c'est le cas des gènes de nodulation appelés gènes nod qui sont subdivisés en trois classes :

- Les gènes nod communs (nod ABC) ; ces gènes sont physiquement et fonctionnellement conservés chez les *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium*. Des mutations dans ces gènes provoquent une perte complète de la capacité à infecter et à noduler les plantes hôtes.
- Les gènes contrôlant la spécificité d'hôte (nod H, nod FE, nod G, nod MN, nod O). Ces gènes ne peuvent pas généralement être complétés par des gènes provenant d'autres espèces de *Rhizobium* et leur mutation provoque un retard, une réduction de la nodulation ou une modification de leur spécificité d'hôte (Debellé et Sharma, 1986 ; Horvath *et al.*, 1986 ; Debellé *et al.*, 1986 ; Cervantes *et al.*, 1989).

- Les gènes nod D sont des gènes régulateurs des gènes nod communs et des gènes de spécificité d'hôte, dont l'expression dépend aussi de facteurs présents dans les exsudats racinaires et appartenant à la famille des flavones ou des isoflavones (Rolfe et Gresshoff, 1988 ; Djordjevic *et al.*, 1988). Chez *Azorhizobium*, deux régions chromosomiques nod 1 et nod 2 essentielles à la nodulation caulinaires et racinaires ont été mises en évidence (Van den Eede *et al.*, 1987) ; l'une de ces régions montre une homologie de séquence avec les gènes nod communs (ABC) (Van den Eede *et al.*, 1987). L'expression des gènes nod de *Azorhizobium* ORS 571 est induite en présence de fragments de racines et de tige de *Sesbania rostrata* (Goethals *et al.*, 1989).

Des gènes intervenant dans le contrôle de l'infection ont été identifiés sur le chromosome ou sur un second mégaplasmide (Finan *et al.*, 1986) : ce sont les gènes exo et ndv. Des mutants EXO⁻ et Ndv⁻ de *R. meliloti*, déficients dans la production d'exopolysaccharides acides (Finan *et al.*, 1986) ou de β glucane (Dylan *et al.*, 1986) induisent des nodules Fix⁻ sur la luzerne.

Les autres gènes interviennent dans les étapes tardives de la symbiose et ont été groupés en deux classes : les gènes nif et fix.

- Les gènes nif sont définis comme les gènes de fixation d'azote ayant une homologie avec ceux de la bactérie *Klebsiella pneumoniae*.

L'étude génétique de *Azorhizobium* a été facilitée par rapport aux *Rhizobium* et *Bradhyrhizobium* par la propriété que possède *Azorhizobium* de croître et de fixer l'azote en culture pure ; ce qui donne un moyen de sélection simple de mutants nif en culture dans des boîtes de Petri. Après mutagenèse à l'Éthyl Methane Sulfonate (E.M.S.), une collection de mutants nif a été obtenue par Elmerich *et al.* (1982).

Un certain nombre de gènes nif ont été identifiés chez *Azorhizobium* (Norel *et al.*, 1985, Deneffe *et al.*, 1987 ; Pawlowski *et al.*, 1987, Van den Eede *et al.*, 1987). Un nouveau gène nif a été identifié et localisé ; sa séquence ne montre aucune homologie avec les autres gènes nif décrits auparavant (Alexandre et Elmerich, 1988). Ratet *et al.* (1988) ont étudié la régulation des gènes nif d'*Azorhizobium* in planta et ex planta (voir la revue de de Bruijn, 1988).

- Les gènes fix, ne semblent pas avoir d'équivalents homologues chez *Klebsiella pneumoniae*. Ce sont des gènes propres à *Rhizobium* qui sont nécessaires à la fixation symbiotique de l'azote (Earl *et al.*, 1987).

L'étude génétique du végétal a été plus longue du fait même de la complexité de son génome et de plus on s'est d'abord intéressé à la bactérie. Néanmoins, des études ont permis d'identifier des gènes végétaux impliqués dans la symbiose et dont certains ont été clonés (Delauney et Verma, 1988 ; Rolfe et Gresshoff, 1988). L'expression de ces gènes conduit à la synthèse de protéines spécifiques des nodules, les nodulines (Govers *et al.*, 1987). Cette expression est contrôlée en fonction des différentes étapes de développement du nodule. On peut ainsi distinguer deux types de nodulines selon le moment de leur apparition : les nodulines " précoces " et les nodulines " tardives ". Certaines de ces nodulines identifiées comme les légghémoglobines, sont très abondantes et représentent de 10 à 30% des protéines solubles dans un nodule mature. Par leurs propriétés de fixation de l'oxygène moléculaire, les légghémoglobines contrôlent la concentration en oxygène libre des cellules du nodule, tout en restant capables d'alimenter en oxygène la respiration intense des bactéroïdes (voir Appleby, 1984). La synthèse de la légghémoglobine résulte d'une coopération remarquable entre la bactérie et la plante hôte qui synthétisent respectivement l'hème et la partie protéique. A présent, la séquence de plusieurs nodulines a été identifiée, déterminée et pour certaines, une fonction a pu leur être attribuée (uricase, glutamine synthétase, sucrose synthase, malate deshydrogénase, protéines de la membrane péribactéroïdienne) (Turgey *et al.*, 1987 ; Govers, 1987 ; Thummler et Verma, 1987). Certaines espèces végétales ont fait l'objet d'études particulièrement approfondies dans ce sens : soja, pois, luzerne, lupin, *Sesbania*.

Contrairement à la plupart des légumineuses qui ne sont nodulées qu'au niveau de leurs racines, quelques légumineuses tropicales portent des nodules à la fois sur les racines et les tiges : c'est le cas des genres *Neptunia* (Schaede, 1940), *Aeschynomene* (Arora, 1954 ; Alazard, 1985 ; Alazard et Duhoux, 1988) et *Sesbania* (Dreyfus et Dommergues, 1981).

Au cours cette étude nous nous sommes intéressés à *S. rostrata*, seule espèce de *Sesbania* à porter des nodules caulinaires (Dreyfus et Dommergues, 1981).

Sesbania rostrata est une plante annuelle qui pousse durant la saison des pluies dans les sols inondés du Sahel, zone s'étendant du Sénégal à l'Ethiopie (Berhaut,

1976) et que l'on trouve également dans la zone climatique équivalente de l'hémisphère sud, en Angola, au Mozambique et à Madagascar. Au Sénégal, *Sesbania rostrata* forme des peuplements denses au Nord, dans la vallée du fleuve Sénégal et dans les mares temporaires du Ferlo. La vitesse de croissance de *Sesbania rostrata* est très grande et sa hauteur maximale atteinte en 3 mois, varie souvent entre 2m et 4m. Une floraison précoce permet à la plante de fructifier à la fin de la courte saison des pluies de ces régions sahéliennes. Bien que *Sesbania rostrata* puisse pousser en terrain exondé mais humide, adulte, on la retrouve préférentiellement dans des zones de bas-fonds inondée sous 10 à 15 cm d'eau.

L'objectif de notre travail a donc été l'étude de la symbiose entre *Azorhizobium*, *Rhizobium* et *Sesbania rostrata*.

Dans une première partie, nous avons isolé et caractérisé un très grand nombre de souches à partir de nodules de tige et de racine de *S. rostrata* et à partir des nodules de racine de diverses espèces de *Sesbania*. Des études physiologiques, taxonomiques et des tests de nodulation, nous ont permis ensuite de séparer les souches isolées en deux genres, *Rhizobium* et *Azorhizobium*.

Dans un deuxième chapitre, l'étude structurale de l'infection et de l'organogénèse des nodules racinaires de *S. rostrata* a été effectuée. Nos résultats ont été ensuite comparés à ceux décrits dans le cas des nodules racinaires de légumineuses tropicales et tempérées et en particulier dans le cas des nodules de tige de *S. rostrata*.

Dans un troisième chapitre, nous avons quantifié la fixation d'azote par *S. rostrata*, par la méthode isotopique ^{15}N , et montré ainsi le potentiel fixateur d'azote élevé de *S. rostrata*.

La fixation d'azote très active de *S. rostrata* nous a enfin permis d'envisager l'utilisation de cette plante à la fois comme engrais vert, en milieu paysan, et comme fourrage pour l'alimentation animale.

CHAPITRE I

RHIZOBIUM ET AZORHIZOBIUM

I. INTRODUCTION

Les microorganismes fixateurs d'azote isolés à partir des nodosités des légumineuses sont des bactéries que l'on range classiquement dans la famille des *Rhizobiaceae*. Toutes ces bactéries fixatrices d'azote appartenaient initialement au genre *Rhizobium*, classification au départ basée essentiellement sur le concept d'inoculation croisée. En règle générale, il avait été reconnu qu'une souche de *Rhizobium* ne pouvait former des nodules (souche infective) et fixer l'azote (souche effective) que sur un nombre limité d'espèces de légumineuses. Cette spécificité d'hôte fondée sur la nodulation d'un groupe de légumineuses, appelé groupe d'inoculation croisée a conduit à la définition de plusieurs espèces de *Rhizobium*. Un groupe d'inoculation croisée, est défini comme un groupe de plantes qui peuvent être nodulées indifféremment par toutes les bactéries isolées à partir de nodosités d'une plante de ce groupe.

Plus tard, les *Rhizobium* furent divisés en deux genres, sur la base d'études systématiques fondées sur la taxonomie numérique (T'Mannetje, 1967), sur des méthodes d'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN ribosomale (Gibbins et Gregory, 1972) et sur d'autres critères tels que le taux de croissance en milieu complexe mannitol-extrait de levure, la teneur en base G + C du génome et l'arrangement flagellaire (Jordan, 1982 ; Jarvis *et al.*, 1986). Ces deux genres sont : *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*

Le genre *Rhizobium* comprend quatre espèces toutes à croissance rapide et dont le temps de génération est inférieur à 6 heures : *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium fredii* et *Rhizobium loti*. Il existe aussi des rhizobia tropicaux à croissance rapide, en particulier ceux qui nodulent les genres *Leucaena*, *Aeschynomene*, *Acacia* et *Sesbania* (Trinick, 1980 ; Dreyfus et Dommergues, 1981 ; Alazard, 1985).

Le genre *Bradyrhizobium* comprend toutes les bactéries classées auparavant comme *Rhizobium* à croissance lente ou *Rhizobium* du groupe cowpea et dont le temps de génération est supérieur à 6 heures (Jordan, 1984, 1987 ; Jarvis *et al.*, 1986) : *R. japonicum*, *R. sp. vigna*.

La souche ORS 571 isolée des nodules de tige de *Sesbania rostrata* (Dreyfus et Dommergues, 1981 ; voir la revue de de Bruijn, 1989) possède par sa vitesse de

croissance 3 heures sur milieu YL les caractéristiques des *Rhizobium* à croissance rapide. Toutefois, certains caractères physiologiques la place taxonomiquement plus proche des *Bradyrhizobium* (Dreyfus, 1982 ; Dreyfus *et al.*, 1984). Récemment, sur la base d'études comparatives de caractères physiologiques, biochimiques, de profils protéiques et d'homologies entre ADN total et ARN ribosomal, Dreyfus *et al.* (1988) ont montré que la souche ORS 571 appartenait à un nouveau genre bactérien, sous branche des *Rhodopseudomonas palustris*, et qu'elle est plus étroitement liée à *Xanthobacter*. Ce genre nouveau appelé *Azorhizobium* est distinct à la fois des *Rhizobium* et des *Bradyrhizobium* ; il comprend une seule espèce *Azorhizobium caulinodans* dont la souche type est ORS 571 (tableau 1).

On sait que certaines souches de *Bradyrhizobium* : [*B. japonicum* (Agarwal et Keister, 1983), *Bradyrhizobium* sp. (cowpea) (Sindhu et Dardawal., 1986), 32 H1 (Kurz et Larue, 1975 ; Keister, 1975), CB 756 (Benders *et al.*, 1986)] et de *Rhizobium* [*Rhizobium* IHP 100 isolée de *Cajanus Cajan* (Benders *et al.*, 1986), *Rhizobium* de *Parasponia* ANU 289 (Mohapatra *et al.*, 1983), *R. leguminosarum* (Kurz et Larue, 1975; Stam *et al.*, 1983), *R. meliloti* (Bedmar et Olivares, 1979) et *R. trifolii* 0403 (Urban *et al.*, 1986)], manifestent une activité nitrogénase en culture pure et se comportent donc comme les fixateurs libres.

La souche ORS 571 présente également une activité nitrogénase en culture pure, mais a de plus la propriété exceptionnelle de pousser aux dépens de l'azote moléculaire comme seule source d'azote. Récemment, il a été démontré, que deux souches ORS 310 et ORS 322 isolées respectivement des nodules de tige de *Aeschynomene afraspera* et de *A. indica* sont capables comme la souche d'*Azorhizobium* ORS 571, de présenter une activité nitrogénase en culture pure et de croître aux dépens de l'azote moléculaire (Alazard, communication personnelle).

D'un point de vue physiologique, la souche ORS 571 présente également des originalités. D'une part, la tension d'oxygène optimale pour la fixation d'azote est de 3%, soit 30 fois supérieure aux valeurs connues pour la dérégulation de la nitrogénase chez les *Bradyrhizobium* (Bergersen et Turner, 1980) ; d'autre part, la nitrogénase de la souche ORS 571 paraît tout aussi fonctionnelle *in vivo* à 42°C qu'à 30°C. Son activité nitrogénase est très élevée, 1500 nanomoles C₂H₄/h/mg de protéine (Dreyfus et Dommergues, 1981 ; Dreyfus *et al.*, 1983). Cette activité est du même ordre de

Tableau 1 : Classification des *Rhizobium*

Nouvelle classification	Ancienne classification	Plantes-hôtes
<i>RHIZOBIUM</i>		
<i>R. meliloti</i>	<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>R. trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
" " " <i>viciae</i>	<i>R. leguminosarum</i>	<i>Vicia</i>
" " " <i>phaseoli</i>	<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. fredii</i>		<i>Glycine soja</i>
<i>R. loti</i>		<i>Lotus</i>
<i>R. sp. "arctiques"</i>		<i>Astragalus</i>
<i>R. sp. (Sesbania)</i>		<i>Sesbania</i>
<i>R. sp. (Acacia, leucaena, Prosopis)</i>		<i>Acacia</i>
<i>R. sp. (Neptunia)</i>		<i>Neptunia</i>
<i>BRADYRHIZOBIUM</i>		
<i>B. japonicum</i>	<i>R. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
<i>B. sp. (Lupinus)</i>	<i>R. lupini</i>	<i>Lupinus</i>
<i>B. sp. (Vigna)</i>	<i>R. sp. "cowpea group"</i>	<i>Vigna</i>
<i>B. sp. (Parasponia)</i>		<i>Parasponia</i>
<i>B. sp. (Lotus)</i>		<i>Lotus</i>
<i>AZORRHIZOBIUM</i>		
<i>A. caulinodans</i>		<i>Sesbania</i>

grandeur que celle de *K. pneumoniae*, soit de dix fois supérieure à celle des *Rhizobium* étudiés jusqu'alors (Elmerich *et al.*, 1982 ; Dreyfus *et al.*, 1983).

Dans ce chapitre, notre objectif a consisté dans un premier temps à isoler un grand nombre de souches à partir de nodules de tige et de racine de *Sesbania rostrata* et à partir de nodules de racine de diverses espèces de *Sesbania*. Par la suite, nous avons précisé la séparation des souches isolées en deux genres *Azorhizobium* et *Rhizobium*, sur la base de leurs différences taxonomiques et physiologiques. Enfin nous avons étudié les différences de nodulation caulinaire et racinaire de *S. rostrata* inoculée avec certaines des souches appartenant aux genres *Azorhizobium* et *Rhizobium*.

II MATERIELS ET METHODES

1. Souches bactériennes

La liste des souches ainsi que leur plante-hôte d'origine est donnée au tableau (2).

2. Isolément des souches d'*Azorhizobium* et de *Rhizobium*

L'isolement des souches se fait à partir de jeunes nodules de tige ou de racine (Vincent, 1970). Sitôt prélevé, chaque nodule, est stérilisé superficiellement par immersion dans l'éthanol à 90% (30 secondes) puis dans une solution 0,1% d'HgCl₂ pendant 3 mn. Une fois le nodule rincé abondamment à l'eau distillée stérile puis broyé, on ensemence par épuisement à l'anse de platine sur milieu de croissance gélosé YMA ou YLA en boîte de Petri. L'incubation se déroule à 30°C. Une seconde méthode d'isolement, plus rapide, consiste à sectionner aseptiquement un nodule frais et à piquer avec un filament de platine sa partie centrale avant d'ensemencer le milieu gélosé.

Après plusieurs cycles de purification, les souches sont testées pour leur aptitude à former des nodules sur la plante-hôte et conservées sur gélose inclinée YMA et YLA, en tubes à vis ou en boîtes de Petri et à 4°C. Pour de longues conservations, les souches sont congelées à - 80°C dans 50% de glycerol, dans des tubes Eppendorf stériles (1ml culture + 1ml glycerol).

3. Milieux de culture pour *Rhizobium* et *Azorhizobium*

3.1. Milieu YM

Ce milieu à base d'extrait de levure et de mannitol avec ou sans agar (YM ou YMA Vincent, 1970) est utilisé pour la croissance et la conservation des souches de *Rhizobium*. Ce milieu a la composition suivante en gramme/litre : mannitol : 10g ; Na-glutamate : 0,5g ; K₂HPO₄ : 0,5g ; MgSO₄ : 0,2g ; NaCl : 0,1g ; extrait de levure: 1g ; FeCl₃ : 4mg ; agar:20g. Le milieu ajusté à pH 6,8 est autoclavé à 120°C pendant 20 mn.

Tableau 2 : Liste des souches testées

Souches	Isolement	Origines géographiques	Sources
<i>Azorhizobium caulinodans</i> - ORS 571	<i>S. rostrata</i> nod.tige	Région du Fleuve (Nord Sénégal)	B. DREYFUS
" 590	"	Région de Casamance (Sud Sénégal)	I. NDOYE
" 591	"	Ouest Madagascar	R. FETTIARISON
" 592	"	"	"
" 593	"	"	I. NDOYE
" 594	"	"	"
" 595	"	"	"
ORS 56	"	Région du Fleuve	B. DREYFUS
" SR ₁	"	"	P. de LAJUDIE
" SR ₂	"	"	"
" S ₃	"	Région de Kaolack (Centre Est Sénégal)	D. ALAZARD
" S ₄	"	"	"
" S ₆	"	"	"
" S ₂	"	"	"
" 580	"	Région du Fleuve	B. DREYFUS
" 581	"	"	"
" 582	"	Région de Kaolack	B. DREYFUS
" 583	"	"	"
" 584	"	"	I. NDOYE
<i>Rhizobium</i> sp. " 51	<i>S. rostrata</i> nod.raci.	Sénégal	B. DREYFUS
" 52	"	"	"
" 53	"	"	"
" 57	"	"	"
" 502	<i>S. pubescens</i>	"	"
" 507	<i>S. pachycarpa</i>	"	"
" 604	<i>S. aculeata</i>	Ethiopie	I. NDOYE
" 600	<i>S. pachycarpa</i>	Sénégal	"
" 606	<i>S. cannabina</i>	Nord Vietnam	"
" 609	<i>S. cannabina</i>	Sud Vietnam	"
" 611	<i>S. grandiflora rose</i>	Philippines	"
" 613	<i>Sesbania sesban</i>	Inde	I. NDOYE
" 614	"	"	"
" 615	"	"	"
" 616	<i>S. grandiflora blanche</i>	"	"
" PL1	<i>S. pubescens</i>	Sénégal	P. de LAJUDIE
" S ₇	<i>S. rostrata</i>	"	D. ALAZARD

3.2. Milieu YL

Le milieu complet appelé YL est utilisé pour la croissance et la fixation d'azote des souches d'*Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1983). Il correspond à la base L supplémentée par de l'extrait de levure et du sulfate d'ammonium. Il contient en g/litre : D, L-sodium lactate : 10g ; K_2HPO_4 : 1,67g ; KH_2PO_4 : 0,87g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,1g ; NaCl : 0,05g ; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 40mg ; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$: 10mg ; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$: 5mg ; $MnSO_4 \cdot H_2O$: 2,5mg ; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,7mg ; $CoSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,14mg ; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 0,12mg ; H_3BO_3 : 0,03mg ; extrait de levure (Difco) : 1g et $(NH_4)_2SO_4$: 1g. Le milieu ajusté à pH 6,8 est autoclavé à 120°C pendant 20 mn.

3.3. Milieu pour la fixation d'azote in vitro LO :

Le milieu sans azote LO qui contient la base L supplémentée par les trois vitamines: biotine, 2mg/l ; acide panthothénique, 4mg/l ; acide nicotinique, 20 mg/l est utilisé pour la fixation d'azote en culture des souches d'*Azorhizobium*.

3.4. Milieu adapté à l'étude des caractères nutritionnels et de la taxonomie numérique

La croissance de toutes les souches de *Rhizobium* et d'*Azorhizobium* a été réalisée sur le milieu de base suivant : K_2HPO_4 : 1,67g ; KH_2PO_4 : 0,87g ; $(NH_4)_2SO_4$: 1g ; NaCl : 0,05g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,1g ; $CaCl_2$: 40mg ; $FeCl_3$: 4mg ; agar noble (Difco) : 15g ; substrat carboné 1 à 2g ; 1ml d'une solution d'oligo-éléments (Dreyfus *et al.*, 1983) ; 2 ml d'une solution de vitamines (Dreyfus *et al.*, 1983) ; eau distillée : 1 litre ; pH 6,8.

La liste des composés organiques utilisés pour l'étude de la taxonomie numérique est donnée au tableau (7). Les substrats organiques constituant l'unique source de carbone ont été testés à raison de 2g/l pour les glucides et 1g/l pour les autres composés tels que les alcools, les hydroxyacides, les acides organiques, les composés aromatiques, les acides aminés, les amines et les acides gras. Toutes les sources de carbone ont été stérilisées au filtre millipore de porosité de 0,45 μ m et ajoutées au milieu de base décrit ci-dessus. Ce milieu contenant 2% d'agar est réparti dans des boîtes de Petri stériles.

L'inoculation sur boîtes a été réalisée à l'aide d'un appareil multipointes (Lovelace et Colwell, 1968). 3 répétitions par souche sont réalisées. Comme témoins des boîtes contenant le milieu de base sans source de carbone, avec mannitol ou avec l'actate de sodium ont été utilisées. Après incubation à 30°C, les résultats sont notés à partir de 7 jours. La croissance est considérée comme positive (+, + +, + + +) ou négative (-) par comparaison aux témoins.

4. Milieu de culture pour les plantes hôtes

4.1. Stérilisation et germination des graines

Avant utilisation, les graines sont stérilisées superficiellement par immersion dans l'acide sulfurique concentré pendant une durée déterminée par la dureté de l'enveloppe propre à chaque espèce (tableau 3). Les graines sont abondamment rincées à l'eau distillée stérile, déposées dans des boîtes de Petri contenant de l'eau gélosée à 0,7% et mises à germer à 30°C à l'obscurité et en atmosphère humide, les boîtes étant renversées afin que la radicule ne s'enfonce pas dans l'agar. Les jeunes plantules de 1 à 2 cm de long sont repiquées dans le sol en pots, ou en conditions aseptiques en tube de gélose inclinée.

4.2. Milieu de culture des plantes

Le milieu Jensen (Vincent, 1970), est utilisé pour les cultures en tubes des plantes et contient par litre : K_2HPO_4 : 0,2g ; NaCl : 0,2g ; $MgSO_4 (7H_2O)$: 0,2g ; $CaHPO_4$: 1g ; $FeCl_3 (6H_2O)$: 0,14g ; H_3BO_3 : 2,86mg ; $MnSO_4 (4H_2O)$: 2,03mg ; $ZnSO_4 (7H_2O)$: 0,22mg ; $CuSO_4 (5H_2O)$: 0,08mg ; $Na_2MoO_4 (H_2O)$: 0,09mg.

Le pH étant ajusté à 6,7, le milieu est autoclavé pendant 20 mn à 120°C.

Tableau 3 : Stérilisation et germination des graines de *Sesbania*.

Plante-hôte	Temps de stérilisation dans H ₂ SO ₄	Temps de germination
<i>Sesbania rostrata</i> var. Senegal	30 mn - 60 mn	24 H
<i>Sesbania rostrata</i> var. Madagascar	30 mn - 60 mn	24 H
<i>Sesbania sesban</i>	30 mn - 60 mn	24 H
<i>Sesbania pachycarpa</i>	60 mn	48 H
<i>Sesbania pubescens</i>	60 mn	24 H
<i>Sesbania aculeata</i>	30 mn	48 H
<i>Sesbania aculeata</i> Daïrang	30 mn	48 H
<i>Sesbania cannabina</i> Nord Vietnam	30 mn	24 H
<i>Sesbania cannabina</i> Sud "	30 mn	24 H - 48 H
<i>Sesbania paludosa</i>	60 mn	48 H
<i>Sesbania grandiflora</i> rose	60 mn	48 H
<i>Sesbania</i> Sp. Vietnam	30 mn	24 H
<i>Sesbania formosa</i>	30 mn - 60 mn	24 H
<i>Sesbania aegyptiaca</i>	30 mn - 60 mn	24 H
<i>Sesbania sericea</i>	30 mn	24 H
<i>Sesbania emerus</i>	30 mn - 60 mn	24 H
<i>Sesbania alba</i>	60 mn	24 H
<i>Sesbania tetraptera</i>	30 mn - 60 mn	24 H
<i>Sesbania</i> SP. Richard-Toll	30 mn - 60 mn	24 H
<i>Sesbania grandiflora</i> blanche	60 mn	48 H

5. Culture des plantes

5.1. Cultures en tubes

La technique utilisée est celle mise au point par Gibson (1963). Après germination des graines, chaque plantule est mise en culture sur un tube de 30 x 170 mm contenant une gélose nutritive inclinée (Jensen) et muni d'un capuchon constitué par une feuille d'aluminium percée d'un trou. La racine est introduite dans le tube de façon à être en contact avec la gélose, la tige restant à l'air libre. Pour éviter le dessèchement de l'enveloppe cotylédonaire et permettre aux cotylédons de se libérer spontanément de l'enveloppe de la graine, il est nécessaire de laisser les tubes en atmosphère humide pendant 24 heures sous éclairage. Les plantes sont ensuite inoculées et placées en serre. Elles sont récoltées après 3 et 4 semaines.

5.2. Cultures en vase de végétation (pots en terre cuite)

Du sol légèrement humidifié est stérilisé à l'autoclave pendant 1h à 120°C, puis réparti dans des pots en terre cuite de 18cm de diamètre à raison de 2kg de sol par pot. Les graines de *Sesbania* stérilisées dans l'acide sulfurique concentré sont ensuite semées dans les pots à raison de 1 à 2 graines par pot. Le sol de Bel-Air dont la composition figure au tableau (4) a été utilisé.

6. Inoculation des plantes

6.1. Inoculation des racines

Les racines des plantes sont inoculées à l'aide de 5ml de culture pure de souches bactériennes contenant environ 10^8 bactéries/ml et provenant d'une culture en phase exponentielle de croissance en milieu YM et YL.

L'inoculation des tubes est faite 3 jours après le repiquage de la plantule dans le tube. Le tube est alors rempli de milieu liquide de Jensen jusqu'au bord supérieur du tube afin que toute la surface des racines soit en contact avec les bactéries en suspension dans la solution nutritive.

6.2. Inoculation des tiges de *Sesbania rostrata*

Lorsque les jeunes plantes de *Sesbania rostrata*, ont atteint une taille de 25-30 cm environ, leurs tiges sont inoculées par pulvérisation d'une culture bactérienne liquide contenant 10^8 bactéries/ml.

7. Evaluation de la fixation symbiotique (effectivité)

Pour évaluer l'efficacité de la fixation symbiotique, nous avons déterminé d'une part, les poids frais et secs et l'azote total des parties aériennes (après séchage du matériel à 60°C pendant 48 h) et, d'autre part, l'activité nitrogénase des plantes.

7.1. Dosage de l'azote minéral

La teneur en azote des plantes a été dosée par la méthode de micro kjeldahl au peroxyde d'hydrogène (Rinaudo, 1970).

Après minéralisation de 50mg de poudre végétale à l'acide sulfurique concentré et à l'eau oxygénée (110 vol.), l'extrait est distillé dans un appareil de Parnas-Wagner avec déplacement de l'azote ammoniacal par 10ml de NaOH (10N). Le distillat est recueilli dans une solution contenant le réactif de Tashiro (1 volume de bleu de méthylène à 0,70% dans l'alcool 95° pour 5 volumes de rouge de methyl à 0,15% dans l'alcool 95°). La coloration provoquée par ce réactif est verte en milieu alcalin, mauve en milieu acide, et l'ammoniaque est dosé par l'acide chlorhydrique (N/70).

Le poids atomique de l'azote étant de 14, à 1ml de solution HCl N/70 ajouté correspond donc 0,2mg d'azote. La teneur en azote des parties aériennes est calculée selon la formule :

$$\frac{0,2 \times 100}{50^*} = Y\%$$

3 répétitions ont été effectuées par échantillon à doser.

* 50 mg de poudre végétale.

7.2. Dosage de l'activité nitrogénase

7.2.1. Activité réductrice d'acétylène

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

7.2.2. Principe de la méthode

Le principe repose sur l'exploitation d'une des nombreuses réactions réductrices potentielles de la nitrogénase et qui réside dans la formation d'éthylène (C₂H₄) à partir de l'acétylène (C₂H₂) (Hardy *et al.*, 1973). $C_2H_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow C_2H_4$. La production d'éthylène nécessite donc 2 électrons.

D'autre part la nitrogénase réduit la triple liaison de la molécule d'azote en ammoniacque avec utilisation de 6 électrons : $N_2 + 6H^+ + 6e^- \longrightarrow 2NH_3$.

Le coefficient de conversion théorique N₂ réduit : C₂H₄ formé est donc de 3 : 1 c'est à dire qu'une mole d'éthylène est équivalente à 1/3 mole d'azote réduit.

Il est maintenant établi que la réaction de la nitrogénase est :



Les protons entrent en compétition avec l'acétylène, mais comme la quantité de C₂H₂ utilisée est habituellement faible, l'hydrogène produit peut être alors négligeable (Hanus *et al.*, 1981).

La mesure de l'ARA ne peut cependant constituer qu'une approche semi quantitative de l'azote fixé ; elle n'est pas une méthode directe de mesure. En effet la première source d'erreur réside dans le fait que le coefficient de conversion théorique varie considérablement en fonction des conditions environnementales (variations journalières par exemple) et en fonction des facteurs intrinsèques.

Actuellement, il n'y a pas de méthode adéquate pour calibrer l'éthylène formé avec l'azote fixé, mais il semble que le rapport de conversion soit approximativement 4 : 1 pour les légumineuses (Larue et Patterson, 1981).

7.2.3. Conditions expérimentales

La mesure de l'ARA a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (Hardy *et al.*, 1973), sur un chromatographe Varian Aerograph serie 1400 équipé d'une colonne de 120 cm remplie de sphérosil. Les températures ont été les suivantes : injecteur 120°C ; colonne 75°C ; détecteur à ionisation de flamme : 150°C. Le débit du gaz vecteur a été de 40 ml/mn. Cette technique autorise la détection facile du substrat et de son produit, l'éthylène. De plus, elle présente une sensibilité très grande.

7.2.4. Technique du dosage

Elle consiste à transférer les racines ou les tiges des plantes portant des nodules dans des flacons serums de 250 ou 500 ml ou des fioles de 20 ml fermés hermétiquement. L'acétylène est injecté à la concentration finale de 10%. Pour les mesures de fixation d'azote *in vitro*, une colonie de la souche à tester est ensemencée par piqûre dans un tube de gélose profonde contenant le milieu sans azote (LO) ; le tube est alors hermétiquement fermé, additionné d'acétylène (qsp 2% (V/V)). Les flacons sont incubés à 30°C.

L'activité réductrice d'acétylène étant linéaire pendant 1 heure, des échantillons gazeux de 0,5 ml sont prélevés après 30, 45 ou 60 mn et injectés dans le chromatographe. La quantité d'éthylène présent dans l'échantillon est par la suite mesurée.

7.2.5. Calcul de la quantité de C₂H₄ produite

La quantité d'éthylène formée dans ces conditions, pendant un temps donné, correspond au flot total d'électrons transférés par la nitrogénase . La conversion des hauteurs de pic d'éthylène en nanomoles de C₂H₄ se fait par référence à un étalon standard. Une dilution étalon d'éthylène est préparée par l'introduction de 0,57 ml d'éthylène dans un flacon hermétique de 570 ml (dilution 1/1000). La concentration de cette dilution étalon est donc de

$$\frac{10^6 \text{ nmoles}}{22.400} \dots \text{C}_2\text{H}_4/\text{ml}$$

L'injection au chromatographe de 0,5 ml de cette dilution donne un pic de hauteur: $h \times A$ (A = facteur d'atténuation ; h = pic mesuré en cm).

Les hauteurs des pics étant proportionnelles aux quantités injectées, un pic de 1 cm correspond à :

$$\frac{10^6 \times 0,5}{22.400} \times \frac{1}{h \times A} \quad \text{nmoles C}_2\text{H}_4/\text{cm de pic}$$

Pour un échantillon de volume V (ml), dont on a injecté un volume v (ml) au chromatographe et qui donne un pic de $x = h_1 \times A_1$, la quantité d'éthylène totale produite est donc

$$\frac{10^6 \times 0,5}{22.400} \times \frac{1}{h \times A} \times h_1 \times A_1 \times \frac{V}{v} \quad \text{nmoles C}_2\text{H}_4$$

h_1 = hauteur du pic C_2H_4 en cm

h = hauteur du pic standard en cm

A_1 = atténuation due à l'échantillon

A = atténuation due au témoin standard

V = volume du flacon d'incubation en ml

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

L'ARA totale est exprimée en $\mu\text{moles de C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$. L'ARA spécifique est exprimée par unité de poids sec de nodules ($\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{h/g de nodules secs}$).

Pour déterminer la signification de certains résultats nous avons utilisé le test statistique de Newman et Keuls, au seuil de 5% (Snedecor et Cochran, 1957).

Pour l'étude du spectre d'hôte, l'effectivité des souches a été exprimée en pourcentage du poids sec de parties aériennes par rapport à la souche la plus effective

(100%) sur chacune des plantes hôtes. Une souche effective (E) correspond à un pourcentage de 75 à 100% et une souche inefficace (I) correspond au même pourcentage que le témoin non inoculé c'est à dire environ 20 à 30% du poids sec de la plante inoculée avec une souche effective. Une souche peu efficace correspond à un pourcentage intermédiaire.

III. RESULTATS

1. Caractérisation physiologique et taxonomique

1.1. Isolement des souches bactériennes

Nous avons isolé dix neuf souches bactériennes à partir de nodules de tige de *Sesbania rostrata* poussant dans des régions différentes du Sénégal : région Centre-Est de Kaolack, région du fleuve Sénégal, région de Casamance et à l'Ouest de Madagascar. Dix sept souches ont été isolées à partir de nodules de racine de neuf espèces de *Sesbania*, *Sesbania rostrata*, *S. pachycarpa*, *S. aculeata*, *S. cannabina nord Vietnam*, *S. cannabina sud Vietnam*, *S. grandiflora rose*, *S. grandiflora blanche*, *S. sesban* et *S. pubescens* (tableau 2). Afin de déterminer si ces souches appartenaient au genre *Rhizobium* ou *Azorhizobium*, nous avons testé leur capacité à fixer l'azote librement et par analyse de taxonomie numérique.

1.2. Test de fixation libre

Le tableau (5) montre que toutes les souches isolées à partir de nodules de tige de plantes de *Sesbania rostrata* présentent une activité nitrogénase en culture pure. En revanche, aucune activité fixatrice n'a été décelée chez les souches isolées à partir des nodules de racine des différentes espèces de *Sesbania*.

1.3. Taxonomie numérique

Le tableau (6) montre que les souches isolées des racines des différentes espèces de *Sesbania* qui ne fixent pas l'azote en culture pure, assimilent la plupart des hydrocarbures, alors que les souches fixant librement l'azote n'utilisent que le glucose, l'acide mucique et l'acide gluconique. Aucune des 36 souches étudiées n'a poussé sur l'inuline. Il est important de noter que les souches qui fixent l'azote en culture pure n'assimilent pas le mannitol pourtant employé de façon classique dans de nombreux milieux pour *Rhizobium*. En revanche, ces souches sont les seules à croître sur le propane 1-2 diol et utilisent préférentiellement les composés tels que

Tableau 4 : Caractères physicochimiques du sol de Bel-Air

Texture (%)					pH		Matière organique (%)			Oxydes (%)	Fertilité (‰)	
Argile	Limons fin	Limons grossier	Sable fin	Sable grossier	H ₂ O	KCl	C	N	C/N	Fe ₂ O ₃ total	P ₂ O ₅ total	P ₂ O ₅ assimilable
3,8	1,4	0,7	48,4	44,5	7,7	7,0	4,0	0,26	15,4	0,69	0,37	0,28

Tableau 5 : Test de fixation libre des souches d'*Azorhizobium* et de *Rhizobium*

Souches	Activité Nitrogenase
<i>Azorhizobium</i>	+
<i>Rhizobium</i>	-

+ Fixation d'azote; - pas de fixation d'azote.

le DL- lactate (hydroxyacide), l'acide itaconique (acide organique) et l'isovalérianate (acide gras).

Les résultats présentés ci-dessus ont permis de séparer les 36 souches en deux grands groupes : (1) le premier groupe comprend toutes les souches isolées à partir de nodules de tige de *S. rostrata* et qui appartient au genre *Azorhizobium*, (2) le deuxième groupe regroupe les souches de *Rhizobium* qui ont été isolées à partir des nodules de racine de plusieurs espèces de *Sesbania* (Dreyfus et al., 1988).

Cette classification, a été confirmée par l'étude du spectre d'hôte des souches d'*Azorhizobium* et de *Rhizobium* et la comparaison de leur effectivité.

2. Le spectre d'hôte

2.1. La nodulation de racine

La capacité des souches à induire la nodulation racinaire de *Sesbania* a été étudiée. 20 espèces ont été testées : *S. rostrata* var. Senegal ; *S. rostrata* var. Madagascar ; *S. paludosa* ; *S. grandiflora rose* ; *S. grandiflora blanche* ; *S. aculeata* Ethiopie ; *S. aculeata* Daïncha ; *S. cannabina* Nord Vietnam ; *S. cannabina* Sud Vietnam ; *S. pachycarpa* ; *S. pubescens* ; *S. formosa* ; *S. aegyptiaca* ; *S. sesban* ; *S. sericea* ; *S. emerus* ; *S. alba* ; *S. tetraptera* ; *S. sp. Vietnam* ; *S. sp. Richard Toll*.

Le tableau (7) montre, que sur les 20 espèces de *Sesbania* testées, les souches d'*Azorhizobium* ne forment des nodules effectifs que sur la seule espèce, *S. rostrata*. A l'exception de *S. paludosa* où les nodules formés sont partiellement effectifs, les nodules formés chez toutes les autres espèces sont très peu développés et ineffectifs. Par contre les souches de *Rhizobium* forment des nodules effectifs sur les racines de presque toutes les espèces de *Sesbania*.

2.2. La nodulation de tige

L'aptitude des souches à noduler la tige de *S. rostrata* a été déterminée. Le tableau (8) montre aussi que toutes les souches d'*Azorhizobium* forment des nodules caulinaires effectifs chez *Sesbania rostrata*. Dans le cas des *Rhizobium*, les souches

Tableau 7 : Modulation et effectivité de souches d'*Azorhizobium* et de *Rhizobium* sur les racines de 20 espèces de *Leucaena*

N O D U L A T I O N ^a																																								
Plante-hôte	A Z O R H I Z O B I U M																		R H I Z O B I U M																					
	ORS 571	ORS 590	ORS 591	ORS 592	ORS 593	ORS 594	ORS 595	ORS 58	ORS SR1	ORS SR2	ORS S3	ORS S4	ORS S6	ORS 580	ORS 581	ORS 582	ORS 583	ORS 584	ORS S2	ORS 51	ORS 52	ORS 53	ORS 57	ORS 502	ORS 507	ORS 604	ORS 600	ORS 606	ORS 609	ORS 611	ORS 613	ORS 614	ORS 615	ORS 616	ORS 611	ORS 617				
<i>S. rostrata</i> var. Senegal	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
<i>S. rostrata</i> var. Madagascar	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
<i>S. paludosa</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
<i>S. grandiflora</i> var. rose	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>S. grandiflora</i> var. blanche	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>S. aculeata</i> Ethiopie	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>S. aculeata</i> Daïncha	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>S. cannabina</i> N Vietnam	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>S. cannabina</i> S: vietnam	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>S. pachycarpa</i>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>S. pubescens</i>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>S. formosa</i>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>S. aegyptia</i>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>S. saeban</i>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>S. sericea</i>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>S. emerus</i>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>S. alba</i>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>S. tetraptera</i>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>S. sp. vietnam</i>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>S. sp. R. Toll</i>	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I

39

Tableau 8 : Capacité de nodulation caulinaire et de fixation d'azote par *S. rostrata*(1) cultivée en tubes et inoculée avec des souches d'*Azorhizobium* et de *Rhizobium*.

Souches	Nodules		Activité nitro- genase nmole C ₂ H ₄ /h/flacon
	Nodulation	Poids sec mg/flacon	
<i>Azorhizobium</i>	E		
ORS 571	E	36,0	2931,0
<i>Rhizobium</i>			
ORS 53	E	26,0	946,2
611	e	18,5	436,5
615	e	12,6	388,1
609	e	11,5	358,5
604	e	10,5	255,6
606	e	4,1	137,0
613	e	7,0	107,5
600	I	8,0	56,4
502	I	5,5	12,5
51	I	3,0	15,2
57	I	2,1	14,5
PL ₁	Ebauches nod.	Traces	
507	"	"	-
614	"	"	-
S ₇	"	-	-
616	O	-	-
52	O	-	-
Témoin	O	-	-

(1) Pour les mesures, deux plantes ont été utilisées par souche testée.

E: nodulation effective; e: nodulation peu effective; I: nodulation ineffective; O: pas de nodule.

se répartissent en quatre catégories selon leur aptitude ou non à former des nodules effectifs sur la tige de *S. rostrata* (fig. 1 et tableau 8).

- (1) Les souches ORS 53 forment des nodules effectifs.
- (2) Les souches ORS 609 forment des nodules peu effectifs.
- (3) Les souches ORS 507, ORS 502 forment des nodules ineffectifs
- (4) Les souches ORS 52, ORS 616 ne forment aucun nodule

3. Effectivité des souches de *Rhizobium* et d'*Azorhizobium*

L'effectivité de 8 souches de *Rhizobium* et 4 souches d'*Azorhizobium* a été testée sur les racines de *S. rostrata* cultivées en tubes. Il a été ainsi observé que, 21 jours après l'inoculation, les souches d'*Azorhizobium* montrent une capacité à fixer l'azote significativement plus élevée que celle des souches de *Rhizobium* (tableau 9).

Le même test a été appliqué à 2 souches d'*Azorhizobium* et 2 souches de *Rhizobium* inoculées sur la tige de *S. rostrata* cultivées en pots. Les résultats du tableau (10) montrent d'une part que l'activité nitrogénase des souches d'*Azorhizobium* est significativement plus élevée que celle des *Rhizobium* et que, d'autre part l'azote total par plante est également plus élevé dans le cas des souches d'*Azorhizobium*.

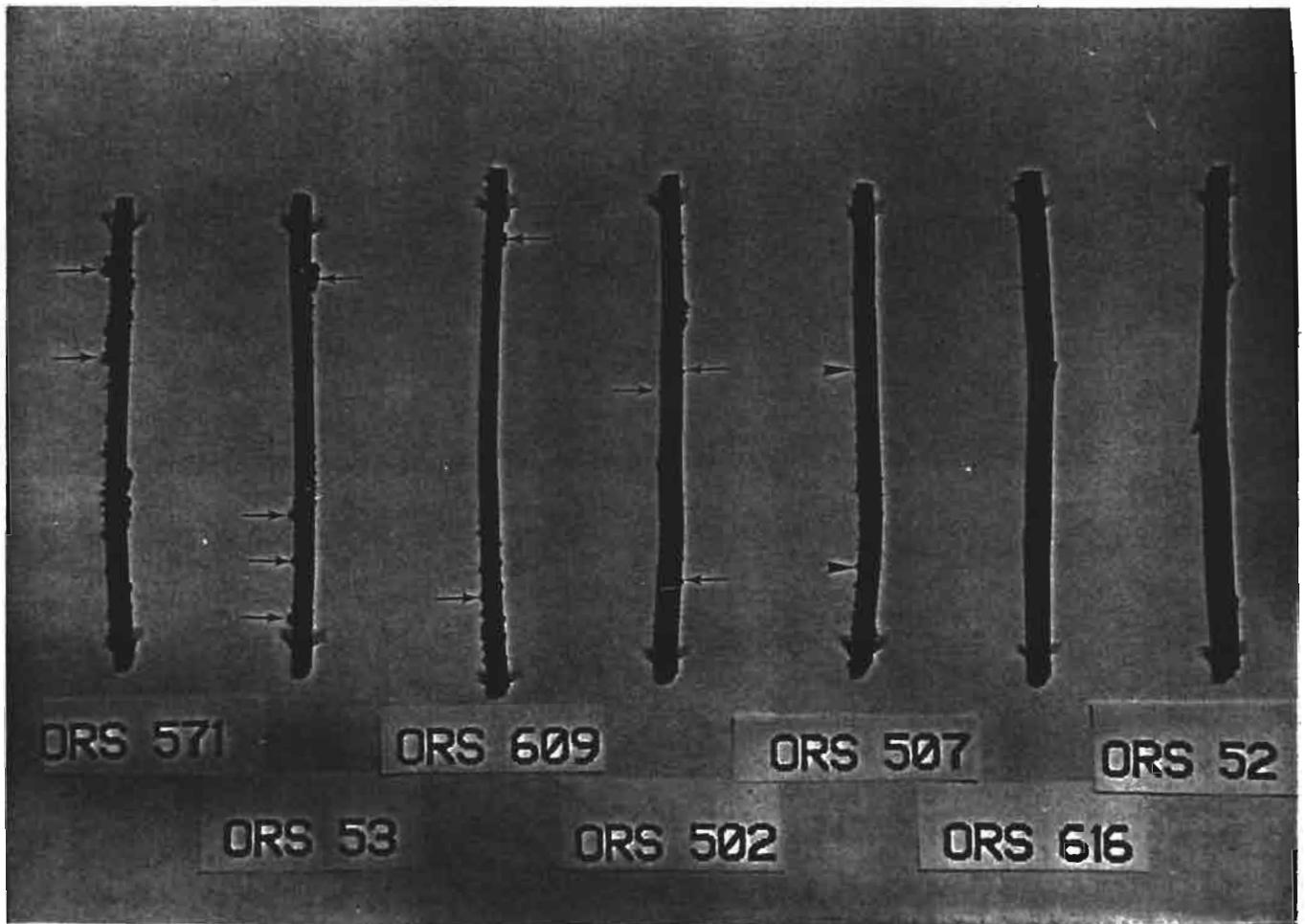


Fig. 1 : Nodulation de tiges de *S. rostrata* inoculées à l'aide d'une souche d'*Azorhizobium* (ORS 571) et par différentes souches de *Rhizobium*. Flèches = nodules ;
têtes de flèches = ébauches nodulaires

Tableau 9 : Nodulation et fixation d'azote de *S. rostrata* cultivée en tubes et inoculée à l'aide de différentes souches de *Rhizobium* et d'*Azorhizobium*.

Traitements	Partie racinaire					Partie aérienne			N total mg/plante
Souches testées	Nodules g/plante		Activité nitrogenase			Feuille + Tige g/plante		N%	
	Poids frais	Poids sec	en nanomoles C ₂ H ₄ /h/plante	en nanomole de nodules frais	C ₂ H ₄ /h/g de nodules sec	Poids frais	Poids sec		
<i>Rhizobium sp.</i>									
ORS 609	0,076b	0,009b	1028c	13492c	105.634c	0,41	0,06	4,09	2,3
606	0,112a	0,015a	1575c	13995c	101.708c	0,51	0,09	4,04	3,7
600	0,077b	0,013a	1389c	17891b	103.737c	0,49	0,09	3,57	3,1
611	0,080b	0,011a	1450c	18028b	135.751b	0,54	0,08	3,08	2,5
51	0,105a	0,015a	2024bc	19144b	134.480b	0,68	0,11	4,31	4,9
601	0,110a	0,016a	2267b	20499b	143.420b	0,62	0,11	3,85	4,3
502	0,045c	0,006b	556d	12350cd	92.670cd	0,39	0,06	2,11	1,2
613	0,103a	0,017a	2220b	19500b	130.600bc	0,62	0,10	3,91	4,12
<i>Azorhizobium</i>									
ORS 571	0,085ab	0,014a	2930a	34353a	209.772a	0,78	0,12	4,92	5,3
590	0,100a	0,015a	3056a	30565a	203.700a	0,82	0,13	4,12	5,3
591	0,095a	0,015a	3147a	33226a	209.956a	0,80	0,13	4,30	5,6
592	0,098a	0,015a	3015a	30516a	201.171a	0,73	0,12	4,20	5,0
Témoin	0	0	0	0	0	0,21	0,02	0,90	0,2

Les chiffres sont la moyenne de 10 répétitions - Les mesures ont été effectuées 21 jours après l'inoculation de racines. Dans chaque colonne, les chiffres affectés des mêmes lettres ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (Test de NEWMAN et KEULS, 1957).

Tableau 10 : Nodulation et fixation d'azote de *S. rostrata* cultivées en pots et inoculée à l'aide de différentes souches d'*Azorhizobium* et de *Rhizobium*.

Traitements		Partie racinaire		Partie aérienne				
Souches testées	Genre	Nodule g/plante poids sec	Nodule g/plante poids sec	Activité nitrogenase		Poids sec en g/ plante Feuille-Tige-Total	N% Feuille-Tige	N total en g/plante
				$\mu\text{mole C}_2\text{H}_4$ /h/plante	$\mu\text{mole C}_2\text{H}_4$ /h/g de nodules sec			
ORS 571	<i>Azorhizobium</i>	0,19b	0,15a	10,82b	72,14b	3,66d 5,18c 8,84d	4,72d 2,12b	0,27c
ORS 591	<i>Azorhizobium</i>	0,20b	0,14a	10,68b	76,30b	3,60d 5,25c 8,85d	4,85d 1,99b	0,27c
ORS 611	<i>Rhizobium</i>	0,29b	0,09b	1,30a	14,43a	2,12b 3,19b 5,31b	4,51c 1,99b	0,15b
ORS 51	<i>Rhizobium</i>	0,64a	0,005c	0,013c	2,00c	2,78c 3,56b 6,34c	4,12b 1,79b	0,18b
Témoin		0	0	0	0	1,30a 2,06a 3,36a	3,12a 1,09a	0,06a

Chaque chiffre est la moyenne de 10 répétitions. Les mesures ont été effectuées au 36ème jour après semis. Dans chaque colonne les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 5% (NEWMAN et KEULS, 1957)

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

L'étude présentée ci-dessus a permis de confirmer que la légumineuse tropicale *Sesbania rostrata* était associée aux deux genres bactériens, *Azorhizobium* et *Rhizobium*.

- Le genre *Azorhizobium* regroupe les bactéries qui ont été isolées à partir des nodules de tige de *S. rostrata*. Les souches de ce genre montrent une activité nitrogénase en culture pure et ne forment des nodules effectifs que sur la tige et les racines de *S. rostrata*.

- Le genre *Rhizobium* regroupe les bactéries isolées à partir des nodules racinaires de différentes espèces de *Sesbania*. Contrairement aux *Azorhizobium*, les souches de *Rhizobium* testées ne fixent pas l'azote en culture pure. En revanche, elles induisent une nodulation effective sur les racines de la majorité des autres espèces de *Sesbania*, y compris *Sesbania rostrata*.

Ainsi, il est clair que concernant l'effectivité des nodules des racines, les souches de *Rhizobium* ont une spécificité d'hôte beaucoup plus large que les souches d'*Azorhizobium*.

De même, le fait que dans la nature, les nodules de racine de *S. rostrata* induits par les souches de *Rhizobium* soient beaucoup plus nombreux que ceux induits par les *Azorhizobium* montre que les *Rhizobium* sont plus compétitifs que les *Azorhizobium*.

En revanche, les souches d'*Azorhizobium* apparaissent plus compétitives pour la nodulation de tige de *S. rostrata*. C'est ainsi que les nodules formés spontanément sur la tige de *S. rostrata* et provenant de sites géographiques différents, sont toujours induits par des souches d'*Azorhizobium*.

Enfin et contrairement aux souches d'*Azorhizobium* capables d'induire de manière homogène des nodules caulinaires abondants et très effectifs chez *Sesbania rostrata*, l'inoculation des *Rhizobium* sur la tige de *Sesbania rostrata* a permis de mettre en évidence une gamme de souches d'infektivité et d'effectivité bien inférieures.

En conclusion, il paraît possible d'affirmer que les souches d'*Azorhizobium* représentent les souches typiques de la nodulation caulinaire de *Sesbania*

rostrata. Toutefois, la base de la spécificité des Azorhizobium pour la tige de *Sesbania rostrata* reste à définir.

CHAPITRE II

INFECTION ET DEVELOPPEMENT

DES NODULES DE RACINE DE

S. ROSTRATA

I. INTRODUCTION

Les bactéries du genre *Rhizobium* sont capables d'infecter les plantes de la famille des légumineuses et d'induire la formation de nodules fixateurs d'azote. Dans la grande majorité des cas, les nodules sont initiés exclusivement sur la partie racinaire de la plante hôte. Il existe toutefois, des associations symbiotiques où les nodules se développent à la fois sur la tige et sur la racine. Dans ce chapitre, les données relatives à l'infection des légumineuses et au développement des nodules racinaires ou caulinaires sont brièvement présentées.

1. L'infection

Deux mécanismes d'infection des racines des légumineuses par les *Rhizobium* ont été décrits à ce jour.

1.1. Infection par les poils absorbants

Chez les légumineuses tempérées et chez certaines légumineuses tropicales comme le soja (*Glycine max*) (Turgeon et Bauer, 1982 ; Pueppke, 1983) ou le "cowpea" (*Vigna unguiculata*) (Pueppke, 1983), le microsymbionte pénètre le plus souvent au niveau des poils absorbants des racines de la plante hôte. Dans un premier temps, les *Rhizobium* présents dans le sol, sont attirés dans le voisinage des racines de la plante hôte (Bergman, *et al.*, 1988 ; Caetano-Anolles *et al.*, 1988), où ils catabolisent des substances racinaires excrétées (Broughton, 1978). Après une phase de multiplication active dans la rhizosphère, les bactéries se trouvant en contact avec la plante hôte, s'adsorbent aux poils absorbants (Dazzo *et al.*, 1984 ; Kijne *et al.*, 1986 ; Smit *et al.*, 1987). Des glycoprotéines végétales appelées lectines, interviendraient dans l'adsorption spécifique entre symbiontes homologues (Kato *et al.*, 1981 ; Dazzo et Truchet, 1983 ; Dazzo *et al.*, 1985 ; Bauer *et al.*, 1985 ; Diaz *et al.*, 1989).

La déformation des poils absorbants (phénotype Had = Hair deformation) est l'étape symbiotique qui suit l'adsorption des bactéries. Divers types de déformations comme des boursoufflements, des branchements, des courbures apicales plus ou moins prononcées sont alors observées. (Yao et Vincent, 1976 ; Bhuvaneshwari et Solheim, 1985 ; Truchet *et al.*, 1985 ; Zaat *et al.*, 1987). Une de ces déformations

correspondant au phénotype Hac (Hair curling) est considérée comme spécifique et caractéristique d'une association de type homologue (Vincent, 1980 ; Debellé *et al.*, 1986). Le phénotype Hac ("Shepherd's crook") correspond à un poil absorbant présentant une déformation apicale d'au moins 360°, au centre de laquelle, un "spot" réfringent, intensément coloré par le bleu de méthylène (Vasse et Truchet, 1984) correspond au site de pénétration des bactéries dans le poil absorbant (Vincent, 1980 ; Truchet *et al.*, 1984, 1985). C'est à partir de ce point réfringent que se développe une structure tubulaire, appelée cordon d'infection, dans laquelle les bactéries progressent vers la base du poil absorbant puis vers le cortex externe de la plante (Truchet *et al.*, 1985). Il est important de noter que chez le soja, les cordons d'infection peuvent se développer à partir d'un poil absorbant recourbé comme décrit ci-dessus, mais aussi à partir d'un poil absorbant simplement accolé aux cellules épidermiques adjacentes. Dans ce cas là, toutefois, l'infection semblerait toujours se produire au niveau du poil absorbant et non des cellules épidermiques (Turgeon et Bauer, 1985).

1.2. Infection par pénétration intercellulaire ("crack entry")

Le mode d'infection par pénétration intercellulaire des racines des légumineuses est le plus souvent observé chez les légumineuses tropicales et subtropicales. Le mode d'infection intercellulaire où les bactéries s'immiscent entre les cellules épidermiques et corticales de la plante se caractérise donc par l'absence de cordons d'infection et ne se produit pas par l'intermédiaire des poils absorbants. Ce mode a été décrit chez plusieurs légumineuses comme par exemple chez *Arachis hypogea* (Allen et Allen, 1940 ; Chandler, 1978), chez différentes espèces d'*Aeschynomene* (Arora, 1954 ; Napoli *et al.*, 1975 ; Alazard et Duhoux, 1988), chez différentes espèces de *Stylosanthes* (Rango Rao ; 1977 ; Chandler *et al.*, 1982) et chez *Mimosa scabrella* (Faria *et al.*, 1988).

Chez *Arachis hypogea*, les *Rhizobium* infectent la plante hôte entre les cellules de l'épiderme racinaire. Cette phase initiale d'invasion se prolonge par une étape de **multiplication bactérienne aboutissant à la formation de zones intercellulaires d'infection. Une phase ultérieure de pénétration intracellulaire par invagination des parois des cellules conduit à l'invasion des cellules corticales de la plante qui limitent la zone d'infection.** L'infection se propage finalement par divisions successives des

cellules envahies. Le même mode d'infection racinaire a été décrit chez *Aeschynomene indica* (Arora, 1954) et *A. americana* (Napoli *et al.*, 1975).

Chez le genre *Stylosanthes*, l'infection initiale des racines de la plante hôte par les *Rhizobium* s'effectue également par pénétration intercellulaire des cellules épidermiques. Toutefois, et contrairement au cas d'*Arachis hypogea*, les premières cellules envahies du cortex ne se divisent pas mais se désorganisent après la dissolution progressive de leur paroi. Ces cellules envahies, désorganisées et compressées par les cellules corticales saines, vont constituer des zones intercellulaires d'infection où les *Rhizobium* se divisent. Ainsi, par désorganisation successive des cellules hôtes, les *Rhizobium* atteignent des cellules corticales plus internes et résistantes, qu'ils infectent par invagination des parois cellulaires. La différence essentielle entre le processus d'infection chez le genre *Stylosanthes* et chez *Arachis hypogea* se résume donc à l'absence, chez *Stylosanthes*, de véritables zones intercellulaires d'infection.

Enfin, chez *Mimosa scabrella*, les *Rhizobium* pénètrent les racines entre les cellules épidermiques et corticales, probablement par dégradation et/ou digestion des parois cellulaires. Les *Rhizobium* progressent dans la région corticale, au niveau des parois végétales tout en émettant des protubérances vers le cytoplasme des cellules adjacentes qu'ils peuvent occasionnellement envahir selon un mode de pénétration intracellulaire identique à celui décrit chez *Stylosanthes*.

Ce mécanisme d'infection par pénétration intercellulaire est à rapprocher de ce qui a été observé chez la non légumineuse *Parasponia* qui, rappelons le, peut établir une symbiose avec *Rhizobium* (Trinick, 1979. Lancelle et Torrey 1984, 1985). Toutefois, chez *Parasponia*, les bactéries ne sont pas "libérées" dans le cytoplasme des cellules comme cela se produit chez les légumineuses, mais restent confinées par du matériel pariétal (ressemblant ainsi à des cordons d'infection) durant la période de fixation d'azote.

2. Développement du nodule

Les modalités du développement des nodosités varient selon l'association symbiotique.

2.1. Nodules radiculaires des légumineuses tempérées

Les différentes phases du développement des nodosités sont analogues chez la plupart des légumineuses tempérées (voir les revues de Newcomb, 1981 et de Verma et Long, 1983).

2.1.1. La phase organogénique

La première étape de l'initiation du nodule est décelable au niveau des cellules corticales internes situées entre l'extrémité de la trace infectieuse et l'un des pôles du protoxylème (Libbenga et Harkes, 1973 ; Truchet, 1978). Les importantes variations cytologiques qui affectent ces cellules marquent le début d'un processus de dédifférenciation qui se traduit, dans un premier temps, par l'individualisation d'un méristème nodulaire originel. Dans un deuxième temps, le méristème nodulaire se développe grâce à l'activité mitotique des cellules qui le composent (Vincent, 1980 ; Truchet, 1978 ; Newcomb, 1981 ; Dudley et al., 1987) et à la dédifférenciation, puis à l'incorporation de cellules corticales nouvelles en son sein (Truchet *et al.*, 1980). Le fait que les divisions cellulaires débutent avant que les bactéries n'atteignent le cortex suggère que les *Rhizobium* induisent à distance la formation du méristème nodulaire probablement par l'intermédiaire d'une substance diffusible (Libbenga et Harkes, 1973 ; Truchet et al., 1980).

Tandis que le nodule se développe à partir du méristème, les cordons d'infection, passant entre ou à travers des cellules corticales, poursuivent leur croissance vers l'intérieur de la racine en se dichotomisant jusqu'à atteindre les cellules méristématiques proximales.

2.1.2. La phase de maturation

Les *Rhizobium* sont ensuite libérés dans les cellules en position subméristématique. La libération des *Rhizobium* dans le cytoplasme de la cellule hôte semble intervenir à un niveau du cordon infectieux où la gaine cellulosique fait localement défaut ; ainsi dans les instants qui précèdent leur libération, les bactéries ne sont plus isolées du cytoplasme ambiant que par le plasmalemme du filament. Les termes ultimes de la libération doivent alors s'effectuer par un processus

d'endocytose (Robertson *et al.*, 1978). Au terme de leur libération les bactéries se retrouvent dans le cytoplasme de l'hôte, séquestrées à l'intérieur d'une membrane qui les isole du cytoplasme végétal (Robertson *et al.*, 1978) et qui dérive essentiellement du plasmalemme des cellules envahies.

Sitôt après la libération bactérienne, les cellules végétales envahies augmentent de volume et deviennent polyploïdes (Truchet *et al.*, 1980). Parallèlement, la différenciation des bactéries en bactéroïdes se traduit par des modifications cytologiques importantes comme l'évolution du nucléoïde, l'épaississement du feuillet interne de la paroi des bactéries et l'édification d'un réseau d'invaginations membranaires plus ou moins élaborées selon les espèces (Truchet, 1973). Ces variations cytologiques s'accompagnent de variations morphologiques, telles que l'augmentation de la taille et de la forme des bactéroïdes qui présentent souvent des formes en x et y caractéristiques (Truchet, 1973 ; Gourret, 1975). Le polymorphisme observé caractérise les bactéries qui ont perdu tout pouvoir de division. C'est au terme de la différenciation des deux symbiontes que le nodule devenu mature, réduit l'azote moléculaire.

2.1.3. Le nodule mature

Les nodules matures sont de véritables organes différenciés composés de zones cytologiquement distinctes.

Dans le cas des légumineuses tempérées, l'activité continue du méristème apical procure aux nodules une forme généralement allongée. Les nodules sont dits de type indéterminé. Ils présentent plusieurs zones d'âges différents, les cellules les plus anciennes étant situées le plus près de la racine. De l'extrémité nodulaire vers la racine support, on observe successivement 4 zones cytologiquement différentes (Truchet *et al.*, 1980) :

- Une zone apicale (zone I) méristématique dont le fonctionnement continu, permet l'élongation du nodule.

- Une zone II d'infestation et d'accroissement cellulaire au niveau de laquelle, les cellules se différencient et sont progressivement envahies par les bactéries. Cette zone équivaut à la phase de maturation des nodules en développement décrits ci-dessus.

- Une zone III, dite zone rouge ou zone des bactéroïdes, dont la couleur est due à une hémoprotéine, la léghémoglobine. La partie protéique de ce pigment qui constitue environ 20 à 30% des protéines cellulaires des nodules est contrôlée génétiquement par l'hôte (voir Appleby, 1984). En revanche, l'hème du pigment semble être synthétisé par la bactérie. La synthèse de la léghémoglobine représente une des conditions essentielles de la fixation azotée ; l'hémoprotéine intervient en effet en maintenant le flux d'oxygène à des valeurs suffisamment élevées pour permettre la respiration et la phosphorylation oxydative des bactéroïdes et suffisamment basses pour que l'action inhibitrice de l'oxygène sur la nitrogénase ne puisse s'exercer. C'est au niveau de la zone III que le bactéroïde différencié, réduit l'azote moléculaire en ammoniac qui est par la suite assimilé généralement sous forme d'amides par la plante hôte (voir la revue de Verma et Long, 1983).

- Une zone IV de dégénérescence est caractérisée par la nécrose des deux symbiontes.

2.2. Nodules radiculaires de légumineuses tropicales

Les études sur le développement des nodules de légumineuses tropicales sont beaucoup moins nombreuses que celles relatives à l'organogénèse des nodules de légumineuses tempérées. Les rares études approfondies effectuées dans ce domaine ont été réalisées chez le soja (*Glycine max*) (Bieberdorf, 1938 ; Newcomb *et al.*, 1979). La comparaison des études dévolues au développement des nodules radiculaires des légumineuses tempérées et du soja montrent une grande similitude entre plusieurs étapes symbiotiques : ainsi par exemple, l'adsorption des bactéries aux poils absorbants de la plante, la déformation apicale des poils absorbants en crosse (phénotype Hac), l'infection par filament d'infection progressant dans la lumière du poil absorbant, l'initiation nodulaire au niveau des cellules corticales, la libération des bactéries à partir de filaments d'infection intracellulaires, la différenciation simultanée des deux symbiontes et l'histologie des nodules matures montrant une région centrale faite de cellules envahies fixatrices et de cellules non envahies et qui est limitée, vers l'extérieur par un cortex interne où cheminent les traces vasculaires, un endoderme sclérifié périphérique et un cortex externe.

Plusieurs différences apparaissent toutefois de la même comparaison. Ainsi, tel qu'il a été précisé plus haut, un mécanisme intercellulaire d'infection aboutissant à l'organogénèse d'un nodule fixateur d'azote a été décrit chez le soja (Turgeon et Bauer, 1985) ; de même, le méristème nodulaire (phénotype Nod) est initié au niveau des cellules corticales externes alors que la trace infectieuse est encore dans le poil absorbant de la cellule épidermique.

D'une manière schématique et contrairement aux légumineuses tempérées où les cellules nodulaires subissent une différenciation étalée dans le temps, les cellules d'un nodule de soja subissent une différenciation simultanée pour aboutir à un massif fait de cellules centrales toutes capables de fixer l'azote atmosphérique en même temps. Ce mode de différenciation par activité méristématique limitée dans le temps conduit à l'organogénèse de nodules de forme arrondie. A maturité et quel que soit l'axe de coupe, les nodules dits de type déterminé montrent une histologie simplifiée avec une zone centrale unique, entièrement limitée par le cortex interne, les traces vasculaires et le cortex externe. Le mode de développement résumé ci-dessus rappelle celui décrit chez le cowpea (Bieberdorf 1938, Newcomb, 1981).

Chez *Arachis hypogea* (Allen et Allen, 1940 ; Chandler *et al.*, 1982), *Stylosanthes* (Chandler, 1978) et chez *Aeschynomene americana* (Napoli *et al.*, 1975), les nodules, également de type déterminé sont initiés sans formation de cordons d'infection. Chez ces légumineuses, l'infection se propage par division successive des cellules hôtes envahies et le nodule ainsi formé se caractérise par l'absence de cellules non envahies.

2.3. Nodules caulinaires de légumineuses tropicales

Seules des légumineuses tropicales possèdent la capacité de former des nodules à la fois sur les racines et les tiges : *Sesbania rostrata* (Dreyfus et Dommergues, 1981), *Neptunia oleracea* (Schaede, 1940) et une quinzaine d'espèces d'*Aeschynomene* (Alazard, 1985 ; Alazard et Duhoux, 1988a) dont les plus étudiées sont *A. indica* (Arora, 1954 ; Yatazawa et Yoshida, 1979 ; Vaughn et Elmore, 1985 ; Alazard et Duhoux 1988a) et *A. afraspera* (Alazard et Duhoux 1988a, 1988b).

2.3.1. L'infection

Dans tous les cas étudiés, l'infection des légumineuses à nodules caulinares se déroule au niveau de sites préexistants, distribués le long de la tige et qui représentent autant d'ébauches potentielles à partir desquelles des racines adventives peuvent se développer. C'est à la base de ces ébauches et après un mécanisme d'infection intercellulaire, que les nodules se développent.

Chez *Sesbania rostrata*, les *Rhizobium* pénètrent directement au niveau de la fissure circulaire occasionnée par l'émergence de massifs méristématiques caulinares décrits ci-dessus. Cette pénétration intercellulaire conduit à la formation de poches d'infection intercellulaire où les *Rhizobium* se multiplient activement. Cette infection restreinte aux cellules basales de l'ébauche racinaire n'affecte jamais l'apex en forme de dôme. Des filaments d'infection intercellulaires se forment ensuite à partir de ces poches de multiplication intercellulaires dont ils constituent des ramifications et pénètrent sous la forme de doigts de gant dans le cytoplasme des cellules adjacentes (Tsien *et al.*, 1983 ; Duhoux, 1984).

Un mode d'infection équivalent à celui de *S. rostrata* a été décrit chez *Neptunia oleracea*. Notons toutefois que chez *Neptunia oleracea*, l'infection ne débute qu'après l'induction du développement des primordiums racinaires, produite par une immersion de la tige (Schaede, 1940 ; Dreyfus *et al.*, 1984).

Il est important de noter que chez *Sesbania rostrata* et *Neptunia oleracea*, le mode d'infection des racines et des tiges, par pénétration intercellulaire identique à celui décrit chez un grand nombre de légumineuses tropicales à nodules racinaires, conduit, dans un second temps, à la formation de cordons d'infection, typique des légumineuses des régions tempérées. En revanche, chez *Aeschynomene indica* (Arora, 1954) et chez *A. afraspera* (Alazard et Duhoux, 1988b), le processus d'infection qui débute également dans la fissure circulaire d'une ébauche racinaire, est équivalent à celui décrit chez *Arachis hypogea* (Chandler, 1978) ; il n'y a pas formation de cordons d'infection et l'infection se propage exclusivement par divisions successives des cellules hôtes envahies.

2.3.2. Développement du nodule

L'organogénèse des nodules caulinaires de *S. rostrata*, résulte d'une induction à distance par les bactéries et se traduit par la dédifférenciation de cellules situées à la base de l'ébauche racinaire préexistante (Tsien *et al.*, 1983 ; Duhoux, 1984). Les territoires méristématiques nouveaux vont alors constituer des massifs volumineux qui confluent et repoussent le méristème racinaire apical, qui marque un arrêt de son développement (Duhoux, 1984). La propagation des cordons d'infection qui affectent en nombre croissant les cellules végétales différenciées, la libération des bactéries à partir des filaments d'infection et leur différenciation en bactéroïdes conduisent au développement nodulaire et à sa différenciation vers un type fixateur d'azote.

2.3.3. Le nodule mature

Le méristème nodulaire s'accroît progressivement et donne une forme grossièrement sphérique au nodule. Arrivés à maturités, les nodules caulinaires sont ovoïdes, verdâtres et atteignent 3-4 mm de diamètre en moyenne. leur organisation interne, assez constante, se résume à un tissu central, entouré d'un parenchyme chlorophyllien et à la périphérie, d'un cortex. Le tissu central est formé de cellules envahies dont le cytoplasme est essentiellement encombré par de volumineuses enclaves de séquestration remplies de bactéroïdes. Un noyau dégénérescent et un cytoplasme réduit à quelques mitochondries et quelques rares plages de ribosomes occupent le reste du volume cellulaire.

Le parenchyme cortical du nodule est chlorophyllien. C'est dans ce tissu que circulent les cordons vasculaires du nodule.

Les nodules caulinaires de légumineuses tropicales sont de type déterminé.

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats relatifs à l'étude de l'infection et à l'ontogénèse des nodules racinaires de *Sesbania rostrata* induits par l'*Azorhizobium* ORS 571. Nos résultats sont ensuite comparés à ceux déjà décrits dans le cas des nodules de tige de *Sesbania rostrata* et des nodules racinaires des légumineuses tropicales et tempérées.

II. MATERIELS ET METHODES

La stérilisation, le milieu de culture de *S. rostrata*, le mode de culture en tube et l'inoculation ont déjà été décrits au chapitre précédent.

2. Méthodes de fixation et d'inclusion

Les nodules prélevés à différents stades de développement ont été traités pour une observation en microscopie photonique ou en microscopie électronique selon les étapes suivantes :

2.1. La fixation

Les échantillons sont préfixés pendant 15 min par la glutaraldéhyde (2,75% dans le tampon cacodylate de sodium 0,2M ; pH 7,2). L'osmolarité du fixateur mesurée à l'aide d'un microosmomètre automatique Roebing est d'environ 650 milliosmoles. Une fois disséqués, les échantillons sont fixés dans le même fixateur pendant 30 min sous vide, puis pendant 1h30 min dans une solution renouvelée à la pression atmosphérique et à température ambiante. Les échantillons fixés sont ensuite rincés dans une solution tampon de cacodylate de Na(0,3M, pH 7,2, 600 mosm, 3 x 1h) puis post-fixés pendant 1h dans une solution de tétr oxyde d'osmium (O_5O_4) à 1% dans un tampon cacodylate 0,3M, pH 7,2.

2.2. La déshydratation

Une fois fixés, les échantillons sont rapidement lavés à l'eau distillée et déshydratés progressivement par passages dans des solutions aqueuses de concentrations croissantes en éthanol (25%, 50%, 70%, 90%, 1h pour chaque bain) et finalement par 3 bains d'1h dans de l'éthanol pur. Des bains dans l'oxyde de propylène (2 x 15 min) précèdent l'imprégnation dans la résine d'inclusion.

2.3. Imprégnation dans la résine d'inclusion

2.3.1. Préparation de la résine

La résine d'inclusion choisie est l'Epon 812 aussi appelée glycidyl ether 100, qui est le composant majeur du mélange d'inclusion. Celui-ci est composé de deux solutions:

- Une solution A, préparée en mélangeant 62 ml de glycidyl ether 100 à 100 ml de DDSA ($C_{16}H_{26}O_3$).

- Une solution B constituée d'un mélange de 100 ml de glycidyl ether 100 et de 89 ml de MNA anhydre ($C_{10}H_{10}O_3$).

La préparation des deux solutions se fait à la température du laboratoire. Le mélange d'inclusion est obtenu en ajoutant deux volumes de la solution A à un volume de la solution B, auquel on adjoint un durcisseur, le DMP30 (2%, v/v).

2.3.2. Imprégnation des échantillons

Les échantillons sont imprégnés progressivement dans des mélanges oxyde de propylène - résine de composition suivante :

- 1) 3 volumes d'oxyde de propylène + 1 volume de mélange d'inclusion
- 2) 1 volume d'oxyde de propylène + 1 volume de mélange d'inclusion
- 3) 1 volume d'oxyde de propylène + 3 volumes de mélange d'inclusion

L'imprégnation est achevée après trois bains dans la résine pure.

Chaque bain dure au minimum 1h et se déroule à la température du laboratoire.

2.4. Inclusion dans des gélules et polymérisation

Chaque échantillon est déposé au fond d'une gélule avec une goutte de mélange d'inclusion puis orienté sous la loupe binoculaire. On complète ensuite avec de la résine d'inclusion. La polymérisation des gélules est achevée après 48 h dans une étuve à 60°C.

3. Microtomie et microscopie

3.1. Microscopie photonique

Des sections de nodules fixés et inclus sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome Reichert Jung ultracut E muni d'un couteau de verre. Les sections semi-fines obtenues ont une épaisseur moyenne de 0,9 μ m. Ces coupes sont déposées sur des lames histologiques propres et séchées à l'étuve à 60°C. Elles sont ensuite colorées selon la méthode de Huber, Parker et Odland (1968) par la fuchsine basique et le bleu de méthylène. Les observations sont faites sur un microscope photonique Olympus Vanox équipé d'un module automatique de prise de vues PM 10 AD. Des sections de nodules plus épaisses de 100 à 300 micromètres ont été également obtenues à l'aide d'un microtome à lame vibrante Microcut H1200. Ces coupes épaisses sont réalisées à partir de nodules fixés par la glutaraldéhyde, mais ni déshydratées ni incluses. Les sections sont ensuite colorées au bleu de méthylène (0,01% dans l'eau distillée) selon la méthode de Vasse et Truchet (1984) avant d'être montées entre lame et lamelle dans de l'eau distillée et observées en microscopie photonique à fond clair.

3.2. Microscopie électronique

Des sections ultrafines de 70 à 80 nm environ, réalisées au couteau de diamant sont recueillies sur des grilles de microscopie électronique recouvertes d'une membrane de formvar. Les coupes ultrafines sont ensuite contrastées selon la méthode de Reynolds (1963) par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb. Une fois sèches, les grilles sont observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission HITACHI EM 600 sous une tension de 75 KV.

4. Méthode d'éclaircissement

4.1. Racines entières

Des racines entières de *Sesbania rostrata* éventuellement préfixées par la glutaraldéhyde 2,75% (15 min sous vide puis 15 min à la pression atmosphérique) sont éclaircies à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium pendant 15 à 30 min sous vide. Cette solution est préparée extemporanément, à partir d'une solution

commerciale d'hypochlorite de sodium concentrée contenant 12,5% de chlore actif et diluée dans l'eau distillée (V/V) (Truchet *et al.*, 1989). Une fois éclaircies, les racines sont rincées à l'eau distillée (2 x 5 min), débitées en segments de quelques mm de longueur, montées entre lame et lamelle et observées en microscopie photonique à fond clair.

4.2. Sections de nodules

Des sections de nodules de 100 à 300 μm réalisées à l'aide du microcut H1200, sont préfixées par la glutaraldéhyde pendant 15 min puis éclaircies à l'aide d'hypochlorite de sodium. Après éclaircissement (15 min à la température du laboratoire) les sections sont rincées à l'eau distillée avant d'être observées en microscopie photonique à fond clair.

Dans tous les cas (racines entières ou sections de nodules avec ou sans éclaircissement), les échantillons peuvent être colorés 5 min par le bleu de méthylène (0,01% dans l'eau distillée) avant d'être observés. Enfin, une dissection ayant pour but d'enlever le cortex de la racine principale est généralement faite, après la fixation ou l'étape d'éclaircissement.

III. RESULTATS

Les résultats relatifs à l'ontogénèse des nodules radiculaires de *Sesbania rostrata* sont présentés en deux parties. Dans une première partie le mécanisme d'infection et le développement des nodules sont décrits à partir d'observations réalisées en microscopie photonique. Une seconde partie basée sur des observations en microscopie électronique, regroupe l'essentiel de nos résultats concernant la différenciation ultrastructurale des deux symbiontes.

1. Infection racinaire et développement des nodules

1.1. Sites de nodulation et mode d'infection

Le système racinaire de *Sesbania rostrata* se compose d'une racine principale d'où émergent un grand nombre de racines secondaires (Pl. 1, Fig. 2). Dans les conditions de culture en tube que nous avons utilisées, la racine principale apparaît faiblement piliée. Les poils absorbants de petite taille, droits ou légèrement ondulés, sont uniformément répartis sur la racine principale et au niveau des jonctions avec les racines secondaires. L'observation du système racinaire de *S. rostrata* permet d'identifier les sites de nodulation 16 à 24 heures après l'inoculation de la souche *Azorhizobium* ORS 571. Ces sites, particulièrement visibles après un éclaircissement à l'hypochlorite de sodium, sont exclusivement localisés à la base des racines secondaires et affectent plus particulièrement le segment de la radicule enfoui dans le cortex de la racine principale (Pl. 2, Fig. 3). C'est donc dans la cavité naturelle due à l'émergence d'une radicule que sont réalisées les conditions propices à l'infection et à la nodulation.

Le mode d'infection de la racine par les bactéries a été recherché en observant la région basale des radicules dès la 12ème heure après l'inoculation. Cette recherche a nécessité dans un premier temps, la dissection du cortex de la racine principale de manière à dégager la partie enfouie de la radicule et à mettre à jour les ébauches méristématiques dès leur plus jeune âge (Pl. 2, Fig. 4 et 5). C'est à la surface de ces ébauches, éventuellement éclaircies par l'hypochlorite de sodium, que l'infection a été observée.

Le mode d'infection est du type intercellulaire, c'est à dire que les bactéries pénètrent au niveau de la paroi commune à deux cellules épidermiques adjacentes, au point de contact entre une cellule épidermique et un poil absorbant ou encore entre deux poils absorbants adhérents (Pl. 3, Fig. 6, 7 et 8). En effet, et de manière intéressante, il a été noté, après dissection, la présence de poils absorbants de petite taille se développant à la surface du segment radicellaire enfoui dans le cortex de la racine principale (Pl. 2, Fig.4 et 5). Des observations répétées n'ont pas permis toutefois de déceler des indices d'infection au niveau d'un poil individuel. En particulier, aucune déformation correspondant au phénotype Hac (Shepherd's crook) n'a été observée. Cependant, après coloration au bleu de méthylène et dès la 12ème heure suivant l'inoculation, on peut souvent observer des structures d'infection classiques intensément colorées, ayant la forme tubulaire classique de filaments d'infection. Ces filaments sont initiés à partir de poches d'infection intercellulaires ou au point de contact entre cellules (Pl. 3, Fig. 6 et 8). Des coupes semi-fines d'ébauches méristématiques ou de segments radicellaires proximaux témoignent de ce type d'infection intercellulaire (Pl. 4, Fig. 9,10, et 11) et de la relation existant entre la formation d'une poche d'infection et la différenciation d'un filament d'infection à partir de cette poche (Pl. 4, Fig. 11). En conclusion, l'infection des racines de *S. rostrata* par *Azorhizobium* ORS 571 est de type intercellulaire et se propage sous la forme de filaments d'infection.

1.2. Développement du nodule

L'apparition de boursouflures à la base d'une radicelle est la première manifestation visible de la nodulation. L'étude du développement du nodule a donc été réalisée à partir de coupes semi-fines d'environ 1 μ m ou de sections plus épaisses (100 à 200 μ m) d'ébauches nodulaires prélevées et fixées à des temps variables suivant l'inoculation. Les sections les plus épaisses ont été éclaircies par l'hypochlorite de Na et colorées par le bleu de méthylène, avant d'être observées par microscopie photonique à fond clair.

L'observation de sections de nodules de très jeunes âges (16 à 24 h. après l'inoculation) montre la présence d'une trace infectieuse localisée au niveau des cellules épidermiques, et celle d'un méristème nodulaire situé en position interne et formé de cellules de petite taille (Pl. 5, Fig. 12 et 13). A cet âge, le méristème a une

forme arrondie et il est situé en regard de la trace infectieuse périphérique (Pl. 5, Fig. 12). Il prend naissance à partir de cellules corticales de la radicule qui se dédifférencient pour acquérir à nouveau l'ultrastructure et les potentialités de cellules méristématiques classiques (Pl. 5, Fig. 12). Le fait que l'observation de plusieurs ébauches initiales, n'ait pas permis de localiser la présence d'infection au sein de ces massifs primordiaux, suggère très fortement que l'induction du méristème nodulaire par le microsymbionte s'effectue à distance.

Des nodules un peu plus âgés (24 à 36 h après l'inoculation), montrent une organisation interne différente. Le méristème prend progressivement la forme d'une corbeille dont la partie concave se distribue autour du site infectieux originel (Pl. 6, Fig. 14 et 15) ; ce site, en position centrale, est alors constitué de poches d'infection intercellulaires et de filaments d'infection (Pl. 6, Fig. 16 et 17). Chez des nodules arrivés à ce stade de développement, la trace infectieuse occupe un espace délimité par les cellules corticales externes de la racine support et les cellules méristématiques plus internes. Au cours de ce stade, la dédifférenciation des cellules corticales nouvelles et/ou l'activité du méristème originel conduisent à une augmentation du massif méristématique. Cette augmentation se produit selon un mode centrifuge par rapport à l'axe central d'infection (Pl. 6, Fig. 14 et 15). L'accroissement de la taille du nodule se fait donc en largeur mais non en longueur. C'est à ce stade, que débute la différenciation des traces vasculaires du nodule qui assureront l'échange des métabolites carbonés et azotés entre le nodule et la plante hôte (Pl. 6, Fig. 15).

Le type de développement et l'organisation interne décrits ci-dessus, se confirment dans le temps. Des sections de nodules âgés de 48h à 72h montrent à la fois, l'accentuation d'un goulet central où sont apparentes les structures d'infection (Pl. 7, Fig. 18 et 19), et la différenciation centrifuge des cellules du nodule (Pl. 7, Fig. 18 et 19) ; les cellules les plus anciennes, déjà différenciées sont alors au centre de la corbeille, tandis que les cellules les plus jeunes issues de l'activité méristématique et nouvellement produites sont visibles à la périphérie (Pl. 7, Fig. 21). Il est important de noter qu'à ce stade, les filaments d'infection constituent alors un réseau étendu qui s'étale dans toutes les directions et atteint toutes les cellules centrales du nodule y compris les cellules méristématiques de la périphérie (Pl. 7, Fig. 18, 19 et 20). C'est au 3ème jour suivant l'inoculation que débute la synthèse de la légghémoglobine. La présence de l'hémoprotéine est contemporaine du début de la fixation azotée, qui atteindra son maximum environ 10 jours après l'inoculation (Fig. 22). Précisons enfin,

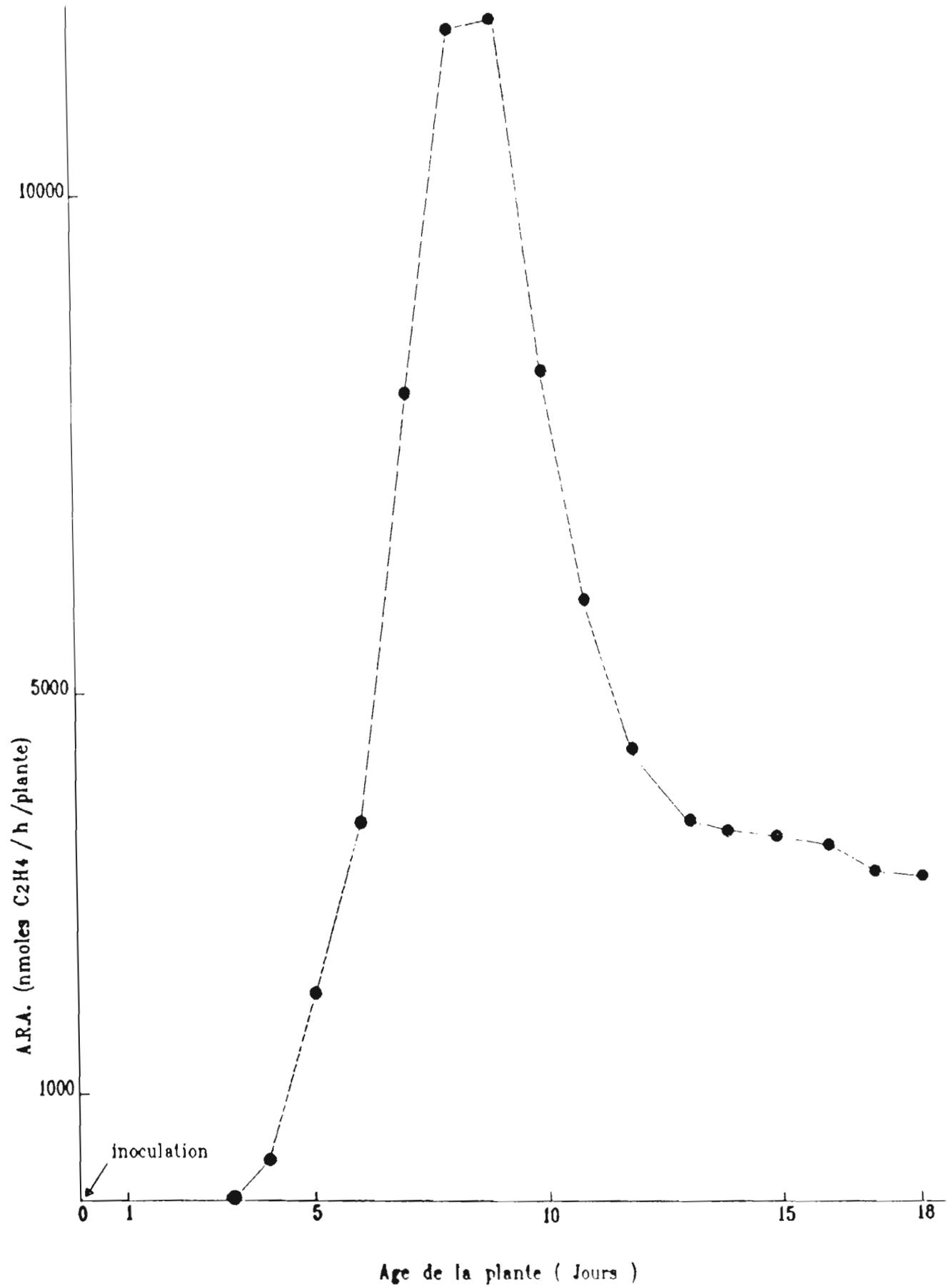


Figure 22 : Evolution de la fixation d'azote des nodules racinaires de *S. rostrata*

que les traces vasculaires et l'endoderme périphérique ont achevé leur différenciation dès le 4ème-5ème jour après l'initiation du nodule ; ils entourent alors le nodule sur toute sa surface (Pl. 7, Fig. 21).

L'étude histologique des nodules fixés entre le 5ème et le 7ème jour après l'inoculation, montre le maintien d'une zone centrale non envahie correspondant au goulet originel d'infection, et au niveau duquel quelques filaments d'infection sont encore visibles (Pl. 8, Fig. 23). Le tissu bactéroïdien conserve sa forme en corbeille, et le gradient de différenciation cellulaire décrit ci-dessus est alors bien visible (Pl.8, Fig.23 et 24). Notons qu'à ces âges, le fonctionnement méristématique n'est pas achevé tel qu'on peut le voir sur la figure 24 où l'on note la présence de filaments d'infection au niveau de cellules périphériques. Les mêmes caractères d'ensemble s'appliquent aux nodules matures fixés entre le 7ème et 14ème jour. En section, les nodules montrent une forme ovale rappelant celle d'une citrouille et qui s'explique par l'activité méristématique centrifuge décrite plus haut. De même, on note la persistance de la dépression centrale vestige de la voie d'infection, entourée de tissu bactéroïdien fixateur, où toute trace d'infection a alors disparu (Pl. 9, Fig. 25). Quant aux tissus périphériques du nodule, ils se résument en un cortex externe limité à une seule assise cellulaire, un endoderme nodulaire périphérique et des traces vasculaires différenciées (Pl. 9, Fig. 26). Ces traces qui sont connectées au système vasculaire de la plante hôte, sont limitées par un second endoderme, l'endoderme vasculaire (Pl.9, Fig. 26). Les traces vasculaires cheminent dans un parenchyme nodulaire dont le plastidome se différencie en chloroplastes à la lumière.

2. Différenciation ultrastructurale des cellules végétales et des bactéroïdes

2.1. Poches d'infection intercellulaires

Dès les premières heures suivant l'inoculation, les bactéries pénètrent dans la plante hôte au niveau des espaces intercellulaires où elles se multiplient pour former des poches d'infection intercellulaires. Ces poches limitées par les parois des cellules adjacentes, sont essentiellement constituées d'un mucilage dans lequel se trouvent les bactéries (Pl.10, Fig.27). La nature fibrillaire du mucilage s'observe au niveau d'auréoles électriquement claires entourant les bactéries et au niveau desquelles les fibrilles plus lâches du mucilage sont alors visibles. Ultrastructuralement les

bactéries montrent des membranes limitantes ondulées et un espace périplasmique important. Le cytoplasme bactérien est lui même constitué de deux parties, l'une périphérique dense aux électrons et l'autre centrale, plus claire, représentant le nucléoïde. On note l'absence de toute inclusion cytoplasmique chez les bactéries, à l'exception de très rares gouttelettes de poly β hydroxybutyrate (PHB). Dans le cytoplasme des cellules végétales limitant les poches d'infection, la présence de nombreux dictyosomes et une densité ribosomique importante sont les indications d'une activité métabolique importante. On note également la production dans la cellule végétale de gouttelettes électroniquement denses qui fusionnent avec le plasmalemme puis s'immiscent au matériel cellulosique de la paroi. L'origine de ces gouttelettes n'a pas pu être déterminée. Leur rôle présumé pourrait être le renforcement des parois limitant les poches d'infection intercellulaires. Il n'y a donc pas, comme dans d'autres cas décrits chez les légumineuses tropicales, de désorganisation ou d'effondrement des cellules végétales primitivement envahies.

2.2. Filaments d'infection et libération bactérienne

Les filaments d'infection sont des structures tubulaires, initiées à partir des poches d'infection intercellulaires ; les filaments progressent dans les tissus de la plante par les parois des cellules qu'ils peuvent pénétrer, par invagination. Un filament d'infection est délimité par les assises cellulosiques de la paroi végétale qu'il emprunte (Pl.11, Fig. 29 et 30). Dans la lumière du filament, les bactéries dont l'ultrastucture est en tout point identique à celle décrite plus haut, sont le plus souvent en ligne noyées dans un mucilage dense aux électrons (Pl.11, Fig. 30). Les filaments d'infection sont souvent observés au sein même des cellules méristématiques nodulaires, cellules de petit volume, mitotiquement actives, possédant un noyau central à gros nucléole, un cytoplasme peu vacuolisé et riche en ribosomes et en dictyosomes et des parois fines traversées par de nombreux plasmodesmes (Pl.10, Fig. 28). Selon l'axe de section, on remarque le plus souvent une désorganisation ultrastructurale à l'extrémité du filament d'infection, où l'on note alors l'absence de la gaine cellulosique périphérique, et une réduction du matériel mucilagineux (Pl.11, Fig. 29 et 30). A cette extrémité, les bactéries d'aspect hétérogène ne sont plus alors séparées du cytoplasme végétal que par le plasmalemme de la cellule hôte. Ces modifications

structurales localisées pourraient être l'indice de la libération des bactéries. Plusieurs observations sont en faveur de cette hypothèse :

(1) L'impossibilité d'observer un mode de libération par endocytose, identique à celui décrit chez plusieurs légumineuses (Kijne, 1975 ; Robertson *et al.*, 1978).

(2) L'observation répétée dans des sections longitudinales ou transversales de gouttelettes d'infection dont une partie est limitée par la paroi et une autre, libre de toute entrave (Pl.12, Fig. 31-34).

(3) La présence de bactéries dans des " vacuoles " de libération dont l'origine est révélée par des vestiges d'origine pariétale et/ou du mucilage des filaments d'infection (Pl.12, Fig. 31-34).

(4) Enfin l'observation d'un nombre accru de gouttelettes infectieuses dans des cellules hôtes végétales ayant amorcé leur différenciation et montrant, un espace vacuolaire de plus en plus important (Pl.12, Fig. 33 et 34).

Il n'a pas pu être déterminé si les gouttelettes de libération observées, représentaient une section transversale de l'extrémité d'un filament d'infection ou bien des gouttelettes individuelles qui se seraient alors séparées de la digitation infectieuse avant d'être le site d'une dégradation sélective de la paroi, puis du mucilage. Quoiqu'il en soit, et dans les deux cas, la libération se traduit donc par l'individualisation de gouttelettes à l'intérieur desquelles, selon la section, on observe une à plusieurs bactéries qui ne sont plus séparées du cytoplasme végétal que par le plasmalemma (Pl.12, Fig. 31-34).

2.3. Différenciation du tissu fixateur

Les quatre étapes de différenciation qui sont décrites ci-dessous ne correspondent pas à des zones particulières du nodule, mais seulement à quatre types cellulaires les plus souvent observés ; elles résument l'essentiel des modifications ultrastructurales qui affectent à la fois les cellules végétales et les bactéries. Contrairement à certaines associations symbiotiques, le passage d'une étape à l'autre se fait de manière progressive.

(1) - Les cellules végétales qui commencent à être envahies par les bactéries ont un cytoplasme faiblement vacuolisé mais très riche en ribosomes, en profils réticulaires et en dictyosomes (Pl.13, Fig. 35 ; Pl.14, Fig. 37 et 38). Au sein de ce cytoplasme, les bactéries sont enclavées, le plus souvent seules, et parfois à plusieurs, dans une membrane qui dérive probablement du plasmalemme qui délimitait les gouttelettes d'invasion décrites plus haut (Pl.13, Fig. 35 et 36). De nombreuses vésicules cytoplasmiques renfermant parfois un matériel moyennement dense aux électrons, fusionnent à ces membranes séquestrantes, leur donnant en section un profil tourmenté (Pl.14, Fig. 37 et 38). Dans les enclaves, les bactéries dont certaines se divisent, conservent les caractéristiques ultrastructurales qu'elles avaient dans les poches intercellulaires ou les filaments d'infection, c'est à dire, des membranes limitantes irrégulières séparées par un espace périplasmique pouvant être important, et un cytoplasme dense où se reconnaissent les zones riches en ribosomes ou en ADN. Notons, dès ce stade, la présence de cellules végétales envahies par les bactéries et d'autres exemptes de toute invasion (Pl.13, Fig. 36).

(2) - La maturation des cellules envahies conduit à trois modifications ultrastructurales d'importance. On observe en effet, la réduction du nombre de vésicules du cytoplasme végétal, avec pour conséquence un profil plus homogène des membranes entourant les bactéroïdes et une diminution progressive de la densité cytoplasmique en ribosomes (Pl.15, Fig. 39 et 40). Parallèlement, le début de différenciation des bactéroïdes d'aspect plus régulier et qui s'allongent (Pl.15, Fig.39), s'accompagne d'une réduction de l'espace périplasmique due à un contact plus étroit entre la paroi et la membrane cytoplasmique et de l'apparition dans le cytoplasme bactéroïdien de granules de polyphosphates très osmiophiles (Pl.15, Fig. 40). Enfin, à ce stade, on remarque généralement la présence d'une seule bactérie par membrane de séquestration mais aussi des zones de contact étroit entre membranes séquestrantes (Pl.15, Fig. 40). Il y a donc une réduction du nombre de bactéries par sac si l'on compare les cellules végétales récemment envahies à celles qui ont amorcé leur différenciation. Une telle variation ne peut s'expliquer, dans un premier temps, que par le morcellement de chaque membrane pér bactéroïdienne limitant une **gouttelette d'infection**, en autant de sacs qu'il y a de bactéries enclavées ; puis, dans un second temps, par la division simultanée de chaque bactéroïde et de la membrane qui lui est propre.

(3) - La troisième étape de différenciation se caractérise également par plusieurs critères ultrastructuraux. D'un point de vue végétal, la cellule hôte, très large et de forme généralement arrondie, est alors entièrement envahie par les bactéroïdes (Pl.16, Fig. 41). Cette invasion a pour conséquence une réduction importante du cytoplasme et le rejet contre les parois cellulaires des organites cytoplasmiques, tels que les mitochondries ou les plastes (Pl.16, Fig. 42). Notons également, comme dans la majorité des nodules de légumineuses étudiées à ce jour, la présence parmi les cellules envahies, de cellules exemptes de toute invasion (Pl.16, Fig. 41). Ces cellules de plus petite taille, se résument à un cadre cellulaire, délimitant un volume occupé dans sa très grande partie par une vacuole très développée (Pl.16, Fig. 41). Entre la paroi et la vacuole, on distingue une mince frange cytoplasmique où se distinguent des organites classiques et des globules électroniquement denses et limités par une simple membrane, les péroxysomes (Pl.16, Fig. 41).

D'un point de vue bactérien, deux caractères principaux sont à retenir :

- Le profil régulier et l'aspect homogène des bactéroïdes dont les pôles sont le plus souvent occupés par une accumulation importante de PHB (Pl.16, Fig. 41 ; Pl.17, Fig.42).

- La concentration à nouveau de plusieurs bactéroïdes par sac pér bactéroïdien dont le profil en "rosace" est alors caractéristique (Pl.16, Fig. 41 ; Pl.17, Fig. 42). Les deux hypothèses qui peuvent être émises pour expliquer une telle organisation, division unilatérale des bactéroïdes ou fusion de membranes individuelles en un compartiment plus vaste, restent encore en suspens. Toutefois, des indices tangibles de fusion entre membranes semblent accréditer la seconde hypothèse (Pl.17, Fig. 42).

(4) - Le stade ultime de différenciation se caractérise chez la cellule végétale par une perte importante de la densité ribosomique, un noyau de profil très irrégulier et un cytoplasme réduit par la présence dans les cellules envahies de sacs pér bactéroïdiens renfermant jusqu'à plusieurs dizaines de bactéroïdes (Pl.18, Fig. 43 et 44). Ceux-ci possèdent un cytoplasme où le nucléoïde central est encore visible, et dans lequel s'accumulent de larges gouttelettes de PHB et des inclusions très denses de polyphosphate (Pl.18, Fig. 44). Ce stade de différenciation qui est le plus avancé que nous ayons observé, correspond à un nodule de 14 jours.

IV. DISCUSSION

L'organogénèse des nodules racinaires de *S. rostrata* induits par l'*Azorhizobium* ORS 571 se subdivise en 3 phases principales :

Une phase d'infection intercellulaire des *Azorhizobium* qui se produit à la base des racines secondaires, dans le segment de la radicelle enfoui dans le cortex de la racine principale. Cette infection intercellulaire conduit à la formation de poches d'infection intercellulaires où les bactéries se multiplient activement, puis à celle ultérieure, de filaments d'infection intercellulaires. Les filaments qui se différencient à partir des poches intercellulaires, essaient enfin vers le cortex racinaire.

- Une phase d'induction méristématique qui s'effectue à distance de la trace infectieuse et qui affecte les cellules corticales de la racine. L'activation du méristème originel conduit à un développement nodulaire de type centrifuge, les cellules néoformées se disposant en corbeille autour d'un axe infectieux central.

- Une phase de maturation, où les cellules méristématiques sont successivement atteintes par un filament d'infection puis progressivement envahies par les bactéroïdes. Les cellules envahies se différencient ensuite selon un gradient où les cellules méristématiques se retrouvent en position excentrée, et les cellules fixatrices en position médiane. Un endoderme et des traces vasculaires en continuité avec le cylindre central de la racine support, sont observés à la périphérie du nodule mature.

Certaines étapes du développement des nodules racinaires de *S. rostrata* rappellent celles, déjà décrites, chez d'autres légumineuses. A ces étapes, communes à plusieurs associations symbiotiques, s'ajoutent d'autres étapes propres à *S. rostrata* et qui ne semblent pas avoir été décrites à ce jour. La discussion qui suit précise les caractères communs ou spécifiques de la nodulation racinaire chez *S. rostrata*, selon l'ordre chronologique où ils se manifestent pendant le développement.

Sites de nodulation

Chez la majorité des légumineuses tempérées comme la luzerne ou le trèfle, il n'est pas possible de repérer à l'avance, les sites racinaires où les nodules vont se développer. Chez ces plantes, il semble en effet, exister une sensibilité constante des poils absorbants à l'infection, qui se traduit par une nodulation répartie uniformément

sur toute la racine (Bhuvanewari *et al.*, 1981). Chez le soja, Bhuvanewari *et al.* (1980) ont montré que les nodules sont concentrés sur le fragment de la racine où les poils absorbants en développement sont particulièrement sensibles à l'infection. Chez *Sesbania rostrata*, les sites de nodulation sont prédéterminés ; au niveau de la tige, le nodule se développe à partir de bourgeons caulinaires capables de se différencier en racines latérales en cas d'immersion (Duhoux et Dreyfus, 1982 ; Tsien *et al.*, 1983 ; Duhoux, 1984). Au niveau de la racine, nous avons montré que la nodulation prenait naissance au niveau du segment de la racine secondaire enfoui dans le cortex de la racine principale. La présence de cavités naturelles, dues à l'émergence de bourgeons ou de la radicelle, et où les bactéries se concentrent, semble donc une condition nécessaire à la nodulation de *S. rostrata*. Cela paraît être également le cas d'autres légumineuses tropicales comme *Aeschynomene afraspera* (Alazard et Duhoux, 1987, 1988).

Mode d'infection

Le mode d'infection de la racine de *S. rostrata* par voie intercellulaire ("Crack entry") est observé couramment chez les légumineuses tropicales. Il a aussi été décrit dans le cas de la nodulation caulinaire chez *S. rostrata* (Tsien *et al.*, 1983 ; Duhoux, 1984), chez *Neptunia oleracea* (Schaede, 1940 ; Dreyfus *et al.*, 1984), *Aeschynomene americana* (Napoli *et al.*, 1975), *Aeschynomene indica* (Arora, 1954), *Arachis hypogea* (Chandler, 1978), *Stylosanthes* (Chandler *et al.*, 1982), *Mimosa scabrella* (Faria *et al.*, 1988) et enfin chez le soja (Turgeon et Bauer, 1985) où il coexiste toutefois avec la voie classique d'infection par filaments d'infection au niveau des poils absorbants (Turgeon et Bauer, 1982). Ce mode d'infection intercellulaire a également été décrit chez la luzerne après inoculation d'une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* portant le plasmide symbiotique de *R. meliloti* (Truchet *et al.*, 1984) ou d'une souche de *R. meliloti* EXO⁻, déficiente dans la production d'exopolysaccharides acides (Finan *et al.*, 1985). Ces deux derniers résultats suggèrent fortement que le mode d'infection atypique par pénétration intercellulaire représente un type d'infection ancestral particulièrement répandu chez les légumineuses tropicales. La formation de poches intercellulaires, visibles dès les premières heures qui suivent l'inoculation apparaît en revanche, comme une caractéristique de *S. rostrata* et n'avait été décrite à ce jour que dans le cas de la nodulation caulinaire de cette légumineuse (Tsien *et al.*, 1983 ; Duhoux, 1984). Des poches intercellulaires ont également été décrites à la périphérie de nodules de luzerne stimulés par *Agrobacterium tumefaciens* portant le plasmide

Sym (Truchet *et al.*, 1984). Enfin, la présence de cordons d'infection, observés dans les nodules racinaires de *S. rostrata* est un caractère de nodulation largement répandu. Des filaments d'infection ont aussi été décrits dans les nodules de toutes les légumineuses tempérées étudiées. [Le trèfle (Gourret, 1975), le pois (Kijne, 1975 ; Truchet, 1976), la luzerne (Vasse et Truchet, 1984)...] et de légumineuses tropicales à nodules caulinaires [*S. rostrata* (Tsien *et al.*, 1983 ; Duhoux, 1984), *Neptunia oleracea* (Schaede, 1940)] ou à nodules racinaires [*Glycine max* (Bauer, 1981 ; Pueppke, 1983), *Vigna unguiculata* (Pueppke, 1983)]. Rappelons que chez les légumineuses tempérées, et quelques légumineuses tropicales comme le soja, les filaments d'infection sont initiés au centre de la courbure d'un poil déformé en crosse ("Shepherd's crook," phenotype Hac). En revanche, chez *S. rostrata*, et quel que soit le type de nodulation observé, les filaments d'infection sont initiés à partir d'une poche intercellulaire d'infection. A ce titre, et contrairement à ce que Olson et Rolfe (1985) ont décrit dans le cas de la nodulation racinaire chez *S. rostrata*, nous n'avons jamais observé d'infection au niveau d'un poil absorbant, rappelant, celle classique des légumineuses tempérées, aussi bien avec la souche d'*Azorhizobium* ORS 571 qu'avec les souches de *Rhizobium* ORS 52 et ORS 611.

Quel que soit leur site d'initiation (poches intercellulaires ou courbure d'un poil absorbant) et les légumineuses chez lesquelles ils ont été décrits, les filaments d'infection montrent toujours la même organisation ultrastructurale. Les bactéries sont incluses dans un mucilage d'origine indéterminée, lui même limité par la paroi pectocellulosique et par le plasmalemme des cellules adjacentes. Cette organisation structurale caractérise à la fois les filaments d'infection et les poches intercellulaires d'infection décrites dans les nodules caulinaires (Tsien *et al.*, 1983, Duhoux, 1984), les nodules racinaires de *S. rostrata* (notre étude), ainsi que les poches intercellulaires d'infection observées dans les nodules de luzerne induits par *Agrobacterium tumefaciens* pSym (Truchet *et al.*, 1984). L'hypothèse selon laquelle un filament d'infection se développerait par invagination de la paroi d'un poil absorbant (Nutman, 1956) est de nos jours écartée. Lors d'une étude ultrastructurale à partir de coupes sériées d'un poil de soja infecté, Callaham et Torrey (1981) ont en effet **montré, que le développement d'un filament d'infection s'effectuait par dégradation locale de la paroi existante et la synthèse simultanée d'une paroi nouvelle autour du site infectieux.** Il est possible qu'un tel processus soit impliqué dans la formation de

cordons d'infection à partir de poches intercellulaires dans les nodules caulinaires de *S. rostrata* (Duhoux, 1984).

Libération des bactéries

Le mode de libération par endocytose, répandu chez les légumineuses tempérées, a été décrit par plusieurs auteurs. Chez ces plantes, les bactéries se libèrent le plus souvent à partir de l'extrémité d'un filament d'infection qui n'est plus limité par la paroi végétale et au niveau de laquelle les bactéries s'accrochent contre le plasmalemme limitant le filament d'infection. La phase finale de libération s'apparente à un mécanisme d'endocytose, mécanisme par lequel les bactéries s'extraitent du filament d'infection pour se retrouver en position intracellulaire. La libération serait la résultante d'une coopération entre symbiontes dont les activités enzymatiques respectives permettraient la dégradation des couches celluliques et du mucilage à l'extrémité du filament d'infection (Verma *et al.*, 1978), permettant ainsi l'étape finale d'endocytose (Dixon, 1964 ; Kijne, 1975 ; Robertson *et al.*, 1978). Notons que, selon Robertson *et al.* (1978), l'absence de paroi cellulaire limitante serait une condition nécessaire à la libération des bactéries, et qu'une activité phosphatase acide, liée à la libération bactérienne, a été localisée au sein du filament d'infection, dans les nodules de pois (Truchet et Coulomb, 1973). Des modes de libération différents ont toutefois été décrits chez d'autres légumineuses et essentiellement chez les légumineuses tropicales. Ainsi chez *Arachis hypogea* (Allen et Allen, 1940 ; Chandler, 1978), *Stylosanthes* (Chandler *et al.*, 1982), *Aeschynomene* (Arora, 1954 ; Napoli *et al.*, 1975 ; Vaughn et Elmore, 1985), *Mimosa scabrella* (Faria *et al.*, 1988), les bactéries sont déversées directement dans le cytoplasme des cellules végétales, après dissolution de la paroi des cellules ; les bactéries se propagent ensuite par mitoses successives des cellules déjà infectées. Un mode plus élaboré a été décrit chez *Vigna radiata* (Newcomb et McIntyre, 1981) où des gouttelettes d'infection véhiculent dans un premier temps, les bactéries au sein du cytoplasme végétal. La libération du microsymbionte intervient plus tardivement par un mécanisme d'endocytose identique à celui décrit plus haut. Dans les nodules radiculaires de *S. rostrata*, un mode **intermédiaire** semble exister. Comme chez *Vigna*, les gouttelettes d'infection ont été **observées**. Ultrastructuralement, ces gouttelettes, localisées à l'extrémité sans paroi d'un filament d'infection, ou libres dans le cytoplasme végétal, montrent une dégradation importante de la paroi limitante et une diminution très poussée du mucilage interne. Contrairement au mécanisme observé chez *Vigna*, le processus final

de libération par endocytose n'a pas été observé, dans le cas des nodules radiculaires de *Sesbania rostrata*. En revanche, la réduction du nombre de bactéries, de quatre dans les gouttelettes d'infection localisées au niveau des cellules méristématiques à une seule bactérie par membrane enveloppe dans des cellules plus différenciées, suggère fortement une division sélective de la membrane limitant les gouttelettes d'infection en autant de compartiments qu'il y a de bactéries incluses. Ce mode original de libération ne semble pas avoir été décrit à ce jour.

Induction du méristème nodulaire

Le méristème des nodules racinaires de *S. rostrata* est induit au niveau de cellules corticales internes de la racine support, situées en regard de la trace infectieuse périphérique. Le fait qu'aucun signe d'infection ne soit visible au niveau même des cellules méristématiques originelles, suggère que l'induction s'effectue à distance, en stimulant la dédifférenciation des cellules corticales de la plante. Le mode d'induction à distance a été décrit lors de l'étude de l'organogénèse des nodules chez les légumineuses tempérées comme le pois (Libbenga et Harkes, 1973 ; Newcomb *et al.*, 1979) et la luzerne (Truchet *et al.*, 1980). L'étude des propriétés symbiotiques de plusieurs mutants de *Rhizobium meliloti* qui, bien que ne formant pas de filaments d'infection (Truchet *et al.*, 1984 ; Finan *et al.*, 1985 ; Leigh *et al.*, 1985) ou incapables de se libérer dans les cellules végétales (Truchet *et al.*, 1980 ; Leigh *et al.*, 1985, 1987), nodulent néanmoins spécifiquement la luzerne, a confirmé la notion d'induction à distance. Selon Truchet *et al.* (1980), un principe inducteur de la nodulation, d'origine bactérienne et de nature chimique encore inconnue, serait responsable de la dédifférenciation des cellules corticales végétales. L'hypothèse d'un rôle de phytohormones dans ce mécanisme a également été suggérée par Libbenga *et al.* (1973). Les cellules cibles affectées lors de l'étape d'induction nodulaire sont généralement les cellules corticales de la plante : cellules corticales internes comme chez le pois (Libbenga et Harkes, 1973 ; Truchet, 1978 ; Newcomb *et al.*, 1979) ou la luzerne (Truchet *et al.*, 1980) ; ou cellules corticales externes, en particulier chez le soja (Newcomb *et al.*, 1979 ; Turgeon et Bauer, 1982), le haricot (Vandenbosch *et al.*, 1985) ou l'arachide (Allen et Allen, 1940 ; Chandler, 1978).

Dans la majorité des travaux relatifs à la nodulation chez les légumineuses tropicales, il n'est généralement pas fait mention des assises végétales initialement réactivées. Dans le cas des nodules caulinaires de *S. rostrata* où, une induction

méristématique à distance a été décrite (Tsien *et al.*, 1983 ; Duhoux, 1984), le nodule serait induit à partir du cortex de la racine (Tsien, 1983) ou au niveau de tissus non caractérisés, mais qui seraient localisés sous le méristème apical du bourgeon caulinaire (Duhoux, 1984).

Activité méristématique et développement nodulaire

Une fois induit, le méristème nodulaire montre une activité mitotique importante, et s'accroît en volume. Le mode de fonctionnement méristématique détermine la morphologie des nodules. Deux types morphologiques ont été décrits :

- Les nodules de type indéterminé (pois, vesce, trèfle, luzerne,...) ont un méristème qui se situe en position apicale et qui montre une activité ininterrompue pendant plusieurs semaines. En conséquence, le nodule s'allonge selon un axe proximo distal (de la racine vers l'extérieur) et se différencie en zones, où toutes les étapes de la différenciation des cellules végétales et des bactéries sont observées. Au terme de leur développement, les nodules indéterminés montrent une forme oblongue caractéristique.

- Le nodule de type déterminé (soja, haricot, nodules caulinaires de *S. rostrata* et la majorité des légumineuses tropicales) ont un méristème dont l'activité est réduite dans le temps. A l'arrêt de la prolifération méristématique, succède alors une phase de différenciation cellulaire synchrone qui aboutit, à maturation, à l'individualisation d'une seule zone centrale. Les nodules déterminés ont généralement une forme sphérique ou ovoïde.

Les nodules racinaires de *S. rostrata* présentent des caractéristiques de développement propres à chacun des types résumés ci-dessus. Dans les nodules racinaires, nous avons décrit une activité méristématique de type centrifuge éloignant les cellules méristématiques du goulet d'infection central et laissant dans l'intervalle, une palette de cellules envahies dont les plus différenciées sont localisées au centre du nodule. Ces critères sont propres aux nodules de type indéterminé. Toutefois, ce mode de développement s'achève par l'arrêt de l'activité méristématique en **périphérie du nodule. La différenciation progressive des dernières cellules du méristème conduit alors à l'homogénéisation cytologique des cellules internes du nodule** qui, en section, fait apparaître un type cellulaire unique. A la fin de leur développement, les nodules radiculaires de *S. rostrata* sont alors de type déterminé,

et montrent un aspect ovoïde caractéristique. A notre connaissance, ce type intermédiaire de développement n'a pas été décrit chez une autre légumineuse.

Différenciation des bactéroïdes

La différenciation des bactéroïdes intracellulaires comprend deux phases qui peuvent être simultanées, une phase de multiplication qui aboutit à l'augmentation sensible du nombre de bactéries par cellule envahie et une phase de maturation qui s'accompagne souvent d'un polymorphisme.

La phase de multiplication peut se dérouler de deux manières. La plus répandue implique la division de l'ensemble de l'unité structurale représentée par une bactérie et sa membrane de séquestration (membrane enveloppe). Ce type de division, qui aboutit à un nombre croissant de bactéries séquestrées individuellement, est commun à toutes les légumineuses tempérées étudiées à ce jour (pois, vesce, lupin, trèfle, ...) et à plusieurs légumineuses tropicales comme *Arachis hypogea* (Chandler, 1978), *Aeschynomene indica* (Yatazawa *et al.*, 1984, Vaughn et Elmore, 1985) ou chez le genre *Stylosanthes* (Chandler *et al.*, 1972).

Le deuxième mode de multiplication implique la division exclusive de la bactérie et non de la membrane séquestrante. Au terme de la phase de multiplication, plusieurs bactéroïdes se retrouvent alors dans le même sac pér bactéroïdien. Ce mode de multiplication a été particulièrement décrit chez le soja (Bergersen et Briggs, 1958).

Chez *S. rostrata*, le premier mode de libération par divisions simultanées de l'ensemble bactérie-membrane pér bactéroïdienne a été observé. Ce mode de multiplication caractérise à la fois les bactéroïdes intracellulaires des nodules racinaires ou caulinaires. Rappelons que dans les nodules racinaires, les bactéries individuelles dérivent du morcellement préalable de gouttelettes d'infection renfermant plusieurs bactéries ; il est très probable que le même mécanisme se déroule dans les nodules caulinaires.

La phase de maturation regroupe l'ensemble des modifications qui conduisent à la différenciation des bactéroïdes fixateurs d'azote. Les paramètres les plus souvent décrits sont la forme, le nombre, la taille et l'ultrastructure des bactéroïdes. Ainsi, par exemple, dans les nodules de luzerne, le bactéroïde fixateur d'azote est allongé, ceinturé par une membrane séquestrante qui lui est propre, et montre une ultrastructure remarquable par l'alternance de zones claires à nucléoïdes et de zones

sombres à ribosomes (Vasse et Truchet, communication personnelle). Chez le trefle, ou le pois, un polymorphisme avec des formes en x et y a été décrit (Gourret et Arias, 1974) ; chez le soja, la différenciation conduit à la concentration de plusieurs bactéroïdes arrondis par sac bactéroïdien (Werner et Morschel, 1978), tandis que, chez l'arachide, un seul bactéroïde par sac est dénombré (Chandler, 1978). En réalité, tous les cas de figures existent et ont été décrits au cours d'études réalisées sur le développement nodulaire chez les légumineuses. On doit toutefois retenir que les caractères de différenciation des bactéroïdes seraient contrôlés exclusivement par la plante (Kidby et Goodchild, 1966) et il a été montré qu'une même bactérie se différencie de manière différente en fonction de l'hôte auquel elle est étai inoculée (Kidby et Goodchild, 1966 ; Dart, 1977).

Le fait que les bactéroïdes se différencient de manière identique dans les nodules caulinaires et racinaires de *S. rostrata*, est conforme à cette hypothèse. Dans les deux cas, au terme de cette différenciation, on dénombre dans un même sac pér bactéroïdien plusieurs bactéries de forme plus arrondie que les bactéroïdes nouvellement libérés dans le cytoplasme. Le mécanisme par lequel, un nombre croissant de bactéroïdes par sac est observé tout au long de la différenciation des nodules radiculaires de *S. rostrata*, n'a pas été résolu. Deux possibilités demeurent, à savoir la division unilatérale de la bactérie ou la fusion de plusieurs sacs pér bactéroïdiens en un sac individuel plus large. Une observation attentive de micrographies de cellules nodulaires envahies montrant des contacts de plus en plus fréquents entre les sacs bactéroïdiens de bactéries individuelles, le profil souvent en " rosace " du sac pér bactéroïdien délimitant plusieurs bactéries et les indices de fusions membranaires à l'intérieur d'un sac regroupant plusieurs bactéroïdes, sont en faveur de la deuxième hypothèse. Des fusions entre membranes séquestrantes ont été décrites dans les nodules radiculaires de pois (Gunning, 1970), du haricot (Pladys et Rigaud, 1988) ou de luzerne (Truchet et Coulomb, 1973). Ces fusions ne sont toutefois visibles que dans la zone proximale du nodule, où une dégénérescence des symbiontes est observée, et non dans la région centrale fixatrice. Dans les nodules radiculaires de *S. rostrata*, les fusions supposées sont observées à un moment du développement pendant lequel le nodule exprime sa plus grande capacité à réduire l'acétylène. L'hypothèse selon laquelle, la forme du bactéroïde dont l'ultrastructure est présentée sur la Planche 15, figure 40 représenterait la forme différenciée fixatrice d'azote du microsymbionte reste à démontrer.

Le nodule mature

L'organisation histologique interne des nodules de *S. rostrata* est en tout point comparable à celle des nodules caulinaires (Tsien *et al.*, 1983 ; Duhoux, 1984) ou celle des nodules d'autres légumineuses comme *Glycine max* (Newcomb *et al.*, 1979), *Vigna unguiculata* (Dart, 1977) ou *Arachis hypogea* (Chandler, 1978). On notera en particulier parmi les cellules fixatrices centrales du nodule, des cellules exemptes de toute infection, qui pourraient être impliquées dans la transformation de l'ammonium issu de la fixation en uréïdes. Il a été montré en effet chez le soja et le haricot (Newcomb *et al.*, 1985 ; Vandenbosch et Newcomb, 1986), que certaines enzymes assurant cette transformation étaient localisées dans les peroxyosomes des cellules non envahies. *S. rostrata* étant une légumineuse à uréïdes (Thaler et Alazard, communication personnelle) et des peroxyosomes ayant été observés au sein des cellules non envahies de la zone centrale, il est probable que ces cellules aient un rôle équivalent dans l'assimilation de l'azote fixé.

CHAPITRE III

QUANTIFICATION DE L'AZOTE FIXE
PAR SESBANIA ROSTRATA

I. INTRODUCTION

Les données globales sur la fixation d'azote par les légumineuses sont très variables. Ainsi chez les légumineuses tempérées, la fixation d'azote varie en général de 20 à 150Kg N₂/ha/an (Gibson, 1977) tandis que certaines légumineuses tropicales peuvent fixer plus de 300 kg N₂/ha/an (Quispel, 1974). Plusieurs méthodes ont été développées pour estimer la fixation d'azote chez les légumineuses ; les méthodes les plus couramment employées sont :

- La méthode par différence de rendement (Weber, 1966 ; William et al., 1977 ; Talbot *et al.*, 1982) qui consiste à comparer la teneur en azote total des plantes fixatrices et non fixatrices.

- La méthode consistant en une mesure de l'activité nitrogénase ; l'enzyme nitrogénase qui réduit N₂ en NH₃, peut également réduire l'acétylène C₂H₂ en éthylène C₂H₄ (Dilworth, 1966 ; Hardy *et al.*, 1973 ; Turner et Gibson, 1980).

- Les méthodes isotopiques fondées sur l'emploi d'isotopes stables permettant de différencier l'azote provenant de chaque source, azote de l'air et azote du sol (Fried et Middleboe, 1977 ; Kohl *et al.*, 1980 ; Turner et Bergersen, 1980 ; Mariotti *et al.*, 1983 ; Guiraud, 1984).

S. rostrata pouvant porter des nodules fixateurs d'azote à la fois sur les racines et les tiges, le nombre et le poids des nodules peuvent donc être beaucoup plus élevés que chez la majorité des autres légumineuses (Dreyfus et Dommergues, 1981). La mesure de la fixation azotée par la méthode de l'activité nitrogénase a montré que la capacité de *S. rostrata* à fixer l'azote, considérable et voisine de 600 μ moles C₂H₄/h/plante (Dreyfus, 1982), est 4 à 5 fois plus élevée que celle du soja évaluée à environ 120 μ moles C₂H₄/h/plante (Sloger *et al.*, 1975); il s'agit là toutefois d'une estimation indirecte de l'activité fixatrice d'azote qui ne donne pas une mesure exacte de l'activité réductrice effective de la nitrogénase ; elle présente également le désavantage de ne pas refléter exactement ce qui se passe dans la plante.

Une estimation faite par la méthode par différence de rendement a montré que *S. rostrata* cultivée au champ fixe environ 200 kg N₂/ha pendant une période de 52 jours (Rinaudo *et al.*, 1982). Cette valeur, toutefois, reste également critiquable, du fait même de la méthode utilisée et qui est basée sur le dosage de l'azote total, c'est à dire l'azote fixé et l'azote minéral. En effet cette méthode implique que l'absorption

de l'azote combiné du sol est la même pour la plante fixatrice et la plante témoin. Cette absence d'interactions entre fixation et absorption d'azote minéral n'est pas prouvée et peut conduire à une sous estimation de la fixation d'azote (Mariotti *et al.*, 1983).

L'objectif de cette étude a donc consisté tout d'abord à mesurer avec précision l'azote fixé par *S. rostrata* par la méthode de dilution isotopique ^{15}N . Cette méthode qui a l'avantage d'être une méthode directe de mesure de la fixation d'azote, permet d'intégrer la totalité de la saison de croissance de la plante (Mariotti *et al.*, 1983) et offre une sensibilité de l'ordre de 50 fois supérieure au test de Kjeldahl (Larue et Patterson, 1981 ; Guiraud, 1984). Nous avons ensuite comparé les résultats obtenus par cette méthode avec ceux obtenus en utilisant la méthode de la différence. De même et dans le but de mieux évaluer les potentialités de fixation d'azote par les nodules de tige chez *Sesbania rostrata*, nous avons comparé la fixation d'azote de *Sesbania rostrata* à celle de *Sesbania sesban*, espèce de *Sesbania* sans nodules caulinaires présentant un développement végétatif tout à fait comparable à celui de *Sesbania rostrata*. Au cours de la présente étude, nous avons enfin cherché à déterminer l'influence de la submersion du sol sur la capacité fixatrice des deux espèces de *Sesbania*.

II. MATERIELS ET METHODES

1. Méthodes de culture

S. rostrata et *S. sesban* sont cultivées pendant 7 semaines sur sol de Bel-Air stérile, en vase de végétation, 1 plante par vase. L'inoculation des racines est effectuée au moment du semis des graines germées, respectivement avec les souches ORS 571 et ORS 502. L'inoculation des tiges de *S. rostrata* a été effectuée aux 14ème et 28ème jours par pulvérisation d'une culture d'ORS 571. A compter du 14ème jour suivant l'inoculation, les plantes sont arrosées abondamment afin de maintenir le sol très humide dans chaque vase. 4 répétitions par traitement sont réalisées. Les mesures, nombre de nodules, poids sec des nodules, activité nitrogénase des nodules et l'azote total des plantes sont effectuées à intervalle d'une semaine à compter de la 3ème semaine de croissance. L'activité nitrogénase des nodules est mesurée par la méthode de réduction de l'acétylène en éthylène (Hardy *et al.*, 1973). L'azote total des parties aériennes a été déterminée suivant la méthode de micro Kjeldahl (Rinaudo, 1970).

2. Estimation de l'azote fixé par *S. rostrata* et *S. sesban* : méthode par différence et isotopique N-15

2.1. Dispositif expérimental

L'expérience a été réalisée dans une serre de la station ORSTOM de Dakar Sénégal, pendant la période allant de décembre 1985 à février 1986. A cette époque de l'année, la température moyenne pendant le jour est de 24°C, la température de nuit 20°C et la photopériode seulement de 12h.

2.2. Préparation du sol

Le sol utilisé est un sol sableux typique (psamment) répondant au nom vernaculaire de Dior, ayant un pH de 7,0 et renfermant 93% de sable, 0,3% de C et 0,025% de N. (cf. tableau 4). Pour éviter toute contamination par des *Rhizobium* indigènes, le sol est préalablement stérilisé par fumigation au bromure de méthyle. Le sol est ensuite réparti dans des seaux en plastique de 30 cm de diamètre à raison

de 20 kg de sol par seau. L'engrais azoté marqué ^{15}N est alors appliqué dans tous les seaux à la dose de 0,2 g N par seau, ce qui correspond, à l'application de 28,3 kg N par ha. L'azote marqué est appliqué sous forme d'une solution de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ avec un excès isotopique de 4,973% et enrichie en glucose (5g/seau) de façon à obtenir un rapport C/N de 10. La fertilisation phosphopotassique consiste en l'application de 1g de K_2HPO_4 par seau, ce qui correspond à 140 kg par ha.

2.3. Culture des plantes

Les graines sont stérilisées en surface à l'aide d'acide sulfurique concentré. La durée de ce prétraitement est de 45 mn pour *Sesbania rostrata* et de 30 mn pour *S. sesban*. Les graines, lavées plusieurs fois à l'eau stérile, sont mises à germer pendant 24h sur des boîtes de Petri contenant de l'agar semi-solide à 8‰. Les graines germées sont ensuite semées dans les seaux. Quelques jours après le semis, les jeunes plantes sont démariées de façon qu'il ne reste qu'une seule plante par seau. Les plantes sont maintenues pendant 2 mois en serre. *Sesbania rostrata* étant une espèce photopériodique dont le développement est fortement ralenti en période de jours courts, les plantes reçoivent un éclairage complémentaire artificiel prolongeant la durée du jour jusqu'à 14h.

2.4. Technique d'inoculation

N'ayant pu, à ce jour isoler de souche de *Rhizobium* capable de noduler effectivement à la fois les tiges de *Sesbania rostrata* et les racines de *Sesbania sesban*, nous avons sélectionné à partir de 36 souches, celles assurant la meilleure fixation d'azote pour les deux espèces : la souche ORS 571 pour la nodulation des tiges et des racines de *Sesbania rostrata* et la souche ORS 502 pour la nodulation des racines de *Sesbania sesban*. La souche ORS 571 est cultivée sur milieu YL (Dreyfus *et al.*, 1983) et la souche ORS 502 sur milieu YM (Vincent, 1970). Pour inoculer les racines des deux espèces de *Sesbania*, 10 ml d'une culture liquide de *Rhizobium* sont versés sur le sol au moment de la mise en terre des graines germées. Pour inoculer les tiges de *Sesbania rostrata* on pulvérise les tiges avec une culture de la souche ORS 571, 3 semaines après le semis. Les plantes témoins, c'est à dire non inoculées, n'ont jamais été contaminées pendant la durée de l'expérience.

2.5. Traitement

L'expérience a consisté en l'étude des trois facteurs suivants :

Facteur A (espèce de *Sesbania*) : *S. rostrata* ; *S. sesban*

Facteur B (régime hydrique) : sol drainé ; sol submergé

Facteur C (inoculation) : pas d'inoculation ; inoculation.

Le dispositif est un bloc randomisé avec 4 traitements, 4 répétitions et 2 régimes. Les traitements sont les suivants :

Traitement 1 et 5 : *Sesbania rostrata* non inoculée

Traitement 2 et 6 : *Sesbania sesban* non inoculée

Traitement 3 et 7 : *Sesbania rostrata* inoculée

Traitement 4 et 8 : *Sesbania sesban* inoculée

Dans le cas des plantes cultivées en sol submergé (1, 2, 3 et 4), une lame d'eau de 2 à 3 cm d'épaisseur est maintenue sur le sol à partir de la deuxième semaine. Dans le cas des plantes cultivées en condition de drainage (5, 6, 7 et 8), la fréquence et l'abondance de l'arrosage sont telles que la tension de l'eau du sol est maintenue au voisinage de la capacité au champ.

La récolte des plantes intervient au bout de 60 jours, âge auquel les *Sesbania rostrata* ont 1,6 m de haut et les *Sesbania sesban* 1,1 m de haut. Grâce au maintien d'une photopériode de 14 h, aucune plante ne fleurit.

2.6. Estimation de la fixation d'azote

Les feuilles et les tiges sont échantillonnées séparément et séchées à 60-70°C. Chaque échantillon est ensuite broyé pour obtenir une poudre de 100 μ m. L'azote total de chaque échantillon est ensuite dosé en utilisant la méthode de micro Kjeldahl (Rinaudo, 1970). Les analyses de ^{15}N ont été réalisées au laboratoire de l'AIEA à Seibersdorf (Vienne) en utilisant la méthode de Dumas et la spectrométrie de masse (Fiedler et Proksch, 1975). Pour chacune des plantes, les teneurs en N et ^{15}N sont

calculées en prenant en compte les poids secs et les teneurs en N et ^{15}N des feuilles et des tiges.

Les potentialités fixatrices d'azote de *Sesbania rostrata* et *Sesbania sesban* ont été estimées par les deux méthodes suivantes.

2.6.1. Méthode de la différence

La quantité d'azote fixée est mesurée par la différence entre la teneur en azote total des parties aériennes des plantes inoculées fixatrices d'azote et la teneur en azote total des plantes non inoculées non fixatrices d'azote et dont l'azote provient uniquement du sol. Les plantes ayant reçu la même application d'engrais marqué à l' ^{15}N , on calcule pour chaque plante fixatrice la différence entre la teneur en azote total des parties aériennes de chacune d'entre elles et la moyenne de la teneur en azote total des plantes non inoculées (Williams *et al.*, 1977 ; Talbot *et al.*, 1982).

2.6.2. Méthode directe de la dilution isotopique

Dans la nature, l'azote est un mélange de deux isotopes stables ^{14}N et ^{15}N . En 1970, Delwiche et Steyn, observant des différences dans les abondances naturelles en ^{15}N entre plantes fixatrices et non fixatrices, suggèrent la possibilité d'utiliser ces différences pour la mesure de la fixation. Ainsi, plusieurs méthodes d'estimation de la fixation d'azote se sont développées en utilisant l'isotope ^{15}N comme traceur. L'abondance isotopique A en ^{15}N , exprimée en atome $^{15}\text{N}\%$ est définie par

$$A = \frac{\text{Nombre d'atomes } ^{15}\text{N}}{\text{Nombre d'atomes } ^{14}\text{N} + \text{Nombre d'atomes } ^{15}\text{N}} \times 100$$

Les techniques de marquage isotopique artificiel par ^{15}N conduisent à l'expression des compositions isotopiques en abondance absolue ou en excès isotopique. Cet excès se définit comme la différence entre l'abondance isotopique de l'échantillon et celle

d'un étalon de référence. Pour l'azote, l'étalon de référence sera l'azote de l'air dont l'abondance isotopique est : $0,3663\% \pm 0,0004$. L'excès isotopique sera donc égal à :

$$\text{e } \% : A \text{ échantillon} - A \text{ air} = A \text{ échantillon} - 0,366$$

La mesure de l'abondance isotopique est effectuée avec un spectromètre de masse.

Le spectromètre de masse est un appareil qui produit des ions à partir de la substance à étudier. Cet appareil mesure le rapport des intensités des courants d'ions produits par les deux faisceaux d'ions correspondants aux deux isotopes, les sépare suivant un rapport M/e de leur masse "M" à leur charge électrique "e" avant d'en donner la répartition. Le spectromètre de masse mesure donc un rapport isotopique R qui est égal au rapport des ions de $M/e = 29$ ($^{14}\text{N}^{15}\text{N}^+$) et $M/e = 28$ ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}^+$):

$$R = \frac{(^{14}\text{N}^{15}\text{N}^+)}{(^{14}\text{N}^{14}\text{N}^+)}$$

A partir de la mesure des abondances ou des excès isotopiques, il est alors possible de calculer les quantités de ^{15}N dans l'échantillon (quantité totale d'azote multipliée par l'abondance isotopique) et les quantités de ^{15}N en excès (quantité totale d'azote multipliée par l'excès isotopique). Dans la pratique nous utiliserons uniquement l'excès isotopique.

La méthode de dilution isotopique (Fried et Broeshart, 1975 ; Legg et Sloger, 1975 ; Fried et Middleboe, 1977 ; Bremmer, 1977 ; Wagner et Zapata, 1982 ; Vose *et al.*, 1982 ; Rennie et Rennie, 1983 ; Fried *et al.*, 1983) consiste à enrichir l'azote du sol de ^{15}N par ajout d'un engrais marqué ; elle est basée sur le fait que les plantes non fixatrices utilisent l'azote du sol et de l'engrais marqué alors que les plantes fixatrices utilisent en plus l'azote de l'air, ce qui se traduit par une dilution de l'azote marqué au sein de la légumineuse. **La détermination du rapport en ^{15}N des plantes inoculées aux plantes non inoculées permet l'estimation de l'azote provenant du sol et par voie de conséquence celle de l'azote fixé, ceci du fait que l'enrichissement en ^{15}N est moindre chez la plante fixatrice de N_2 .** On cultive simultanément dans des parcelles distinctes, des plantes fixatrices (*Sesbania rostrata* et *Sesbania sesban* inoculées) et des

plantes témoins non fixatrices (*S. rostrata* et *S. sesban* non inoculées), le sol ayant reçu dans les deux cas, la même quantité d'engrais azoté ^{15}N .

Le postulat de base de cette méthode est que l'isotope ^{15}N soit accessible de manière identique aux plantes témoins et aux plantes fixatrices et que celles-ci utilisent dans les mêmes proportions l'azote du sol et l'azote de l'engrais. Si l'on désigne par :

% Ndfso : "percent plant N derived from soil " : pourcentage de l'azote de la plante dérivé du sol pour les plantes non fixatrices d'azote

% Ndffo : " percent plant N derived from fertilizer" : pourcentage de l'azote de la plante dérivé de l'engrais pour les plantes non fixatrices d'azote

% Ndfsn : pourcentage de l'azote de la plante dérivé du sol pour les plantes fixatrices d'azote

% Ndffn : pourcentage de l'azote de la plante dérivé de l'engrais pour les plantes fixatrices d'azote

on peut écrire :

$$\frac{\% \text{Ndffo}}{\% \text{Ndfso}} = \frac{\% \text{Ndffn}}{\% \text{Ndfsn}} \quad (1)$$

En outre, si l'on désigne $y = \% \text{Ndfa}$ " percent plant N derived from the atmosphere" : le pourcentage de l'azote de la plante dérivé de la fixation dans la plante fixatrice d'azote, on peut écrire :

- pour la plante non fixatrice

$$\% \text{Ndfso} + \% \text{Ndffo} = 100 \quad (2)$$

- pour la plante fixatrice

$$\% \text{Ndfsn} + \% \text{Ndffn} + \% \text{Ndfa} = 100 \quad (3)$$

On tire des trois équations :

$$y = \% \text{Ndfa} = \left(1 - \frac{\% \text{Ndffn}}{\% \text{Ndffo}} \right) \times 100$$

Si atom % ^{15}N excess (fo) = excès isotopique dans les plantes non fixatrices

atom % ^{15}N excess (fn) = excès isotopique dans les plantes fixatrices.

On peut écrire étant donné que les mêmes quantités d'engrais marqué de façon identique, ont été appliquées dans les deux cas :

$$\frac{\% \text{Ndffn}}{\% \text{Ndffo}} = \frac{\text{atom } \%^{15}\text{N excess (fn)}}{\text{atom } \%^{15}\text{N excess (fo)}}$$

et donc,

$$y = \% \text{Ndfa} = \left(1 - \frac{\text{atom } \%^{15}\text{N excess (fn)}}{\text{atom } \%^{15}\text{N excess (fo)}} \right) \times 100$$

Les valeurs individuelles de %Ndfa pour chaque plante fixatrice sont calculées à partir des valeurs individuelles "atom % ^{15}N ex. (fn)" et de la moyenne des valeurs "atom % ^{15}N ex. (fo)" des plantes non fixatrices.

La quantité d'azote fixé par plante est calculée comme suit :

$$\text{N}_2 \text{ fixé (g/plante)} = Y = \frac{\% \text{Ndfa}}{100} \times \text{N} = \frac{y}{100} \times \text{N}, \text{ N étant la teneur en azote total de chaque plante.}$$

En outre on a calculé pour les plantes fixatrices et non fixatrices :

$$- \% \text{Ndff (nitrogen derived from fertilizer)} = \frac{\text{atom } \%^{15}\text{N ex. (plante)}}{\text{atom } \%^{15}\text{N ex. (engrais)}} \times 100$$

- FUE (fertilizer use efficiency) ou coefficient d'utilisation de l'engrais en pourcentage :

$$\text{- FUE} = \frac{\text{N x Ndff (fraction)}}{\text{quantité d'engrais appliqué}} \times 100, \text{ N étant toujours la teneur en azote total de la plante considérée .}$$

2.7. Analyses statistiques

Les résultats ont été analysés par le test statistique de Newman et Keuls (Snedecor et Cochran, 1957).

III. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Nodulation et activité fixatrice d'azote de *S. rostrata* et *S. sesban*

Les figures (45 A et B) montrent que le nombre et le poids sec des nodules de racine de *S. rostrata* (8/plante ; 0,04 g/plante) sont très faibles par rapport aux nodules de tige (527/plante ; 0,74 g/plante). Dans le cas de *S. sesban*, le nombre et le poids sec des nodules ont été évalués respectivement à 148/plante et 0,33 g/plante. Grâce à sa nodulation caulinaire, *S. rostrata* a donc produit 4 fois plus de nodules que *S. sesban* pendant la même période.

Des mesures d'ARA (Activité réductrice d'acétylène) effectuées à la fois sur les nodules de tige et de racine de *S. rostrata* et sur les nodules de racine de *S. sesban* sont présentées sur la figure 45C. Les résultats montrent que dans nos conditions d'expérience, environ 97% de l'activité totale fixatrice d'azote de *S. rostrata* est due essentiellement aux nodules de tige de *S. rostrata* ; l'activité des nodules de racine est négligeable. Des résultats analogues ont été rapportés pour *S. rostrata* cultivée dans le même sol en conditions submergées (Rinaudo et Moudiongui, 1985). Dans le cas des nodules de racines de *S. sesban* l'ARA est moins élevée que celle des nodules de tige de *S. rostrata* (fig. 45C).

L'azote accumulé dans les parties aériennes est beaucoup plus élevé (3 fois plus) chez *S. rostrata* (0,32 g/plante) que chez *S. sesban* (0,1g/Plante) (Fig. 45 D). Cette potentialité fixatrice d'azote chez *S. rostrata* est sans doute liée à l'abondance des nodules de tige.

2. Estimation de l'azote fixé par *S. rostrata* et *S. sesban* (Ndoye et Dreyfus, 1988)

2.1. Influence des différents traitements sur le poids sec et la teneur en azote total de *Sesbania rostrata* et de *Sesbania sesban*

Le tableau (11) rapporte les effets de l'inoculation sur le poids sec et la teneur en azote total de *S. rostrata* et de *S. sesban*. L'inoculation de *S. rostrata* avec la souche d'*Azorhizobium* ORS 571 a pour conséquence une augmentation du poids sec de 28% en sol inondé et de 24% en sol drainé ; l'augmentation de la teneur en azote total

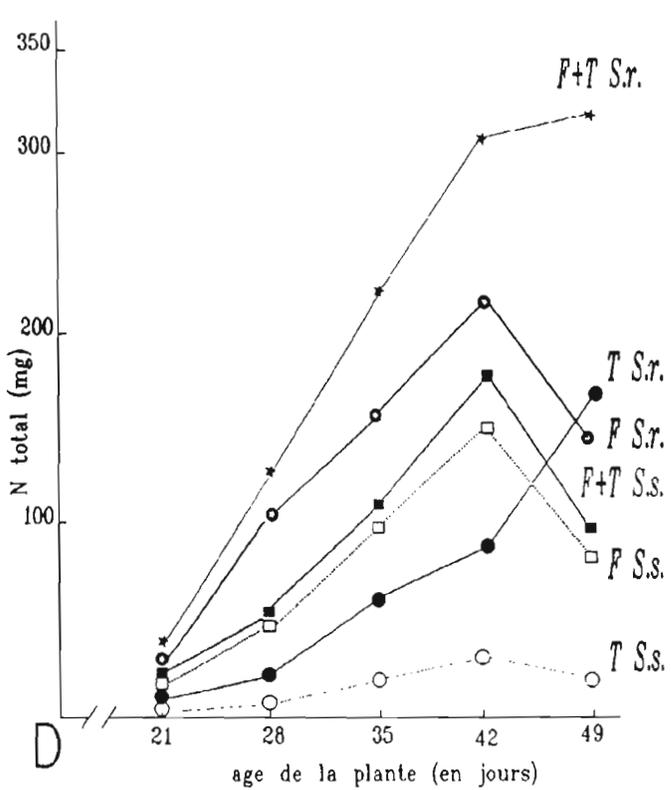
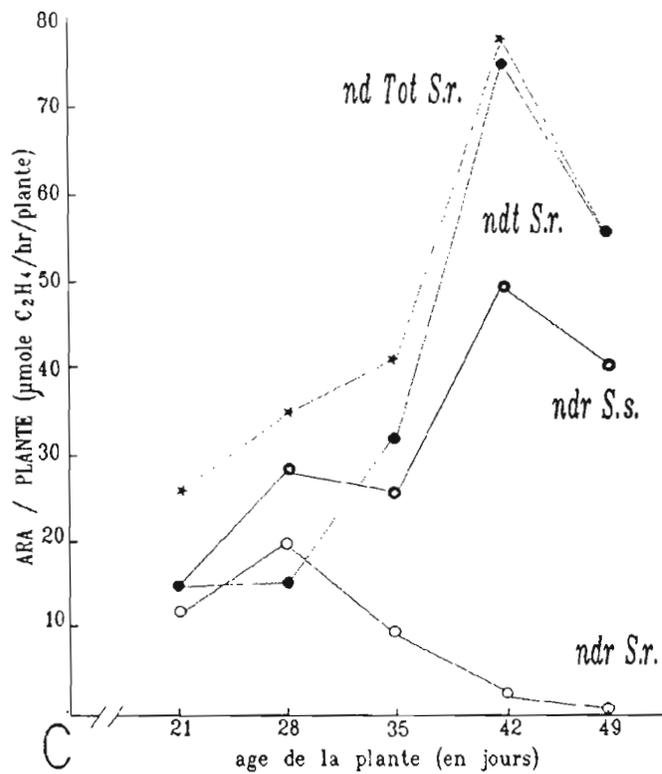
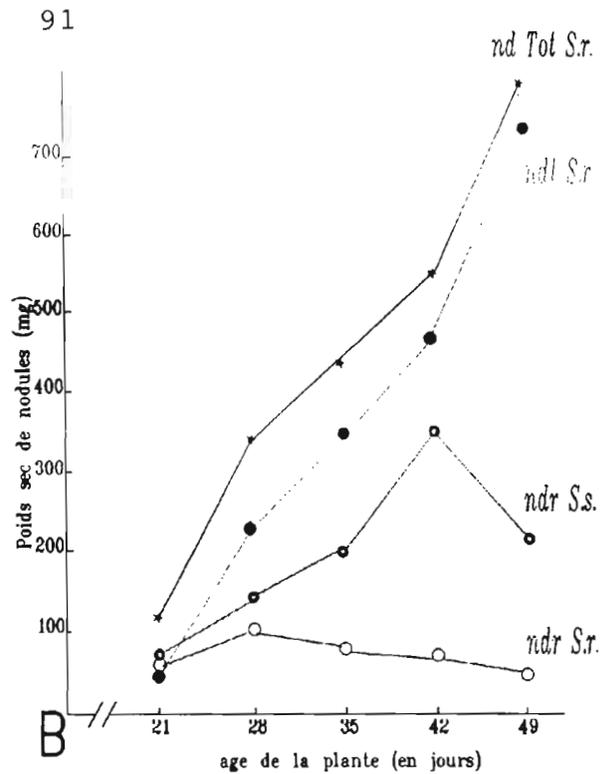
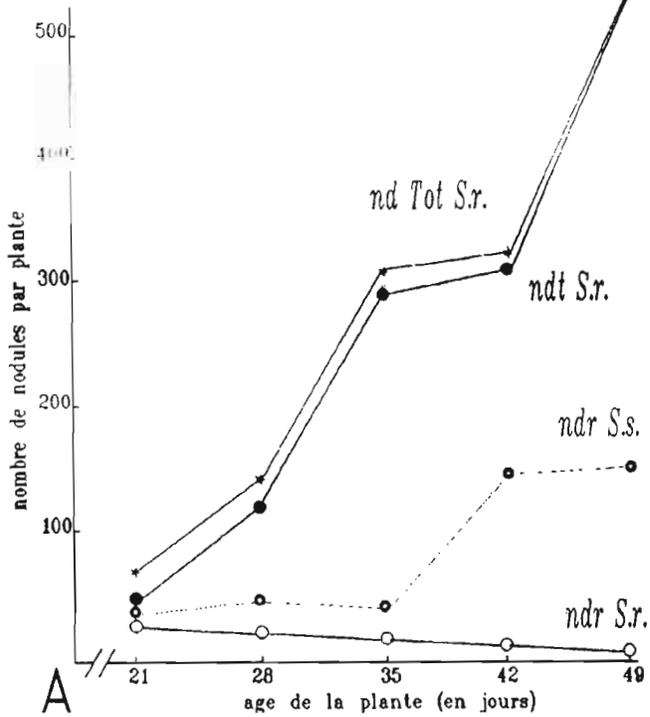


Fig. 45 - Comparaison de la fixation de l'azote entre *Sesbania rostrata* (S.r.) et *Sesbania sesban* (S.s.) - ndr = nodule de racine, ndt = nodule de tige, ndTot = nodules totaux, F = feuille, T = tige, F+T = feuilles + tiges

décélée dans le même temps est de 82% en sol inondé et 50% en sol drainé. L'inoculation de *Sesbania sesban* avec la souche ORS 502 conduit à une augmentation du poids sec de 20% en sol drainé mais n'a aucun effet en sol inondé.

2.2. Influence de la submersion et du drainage du sol sur la nodulation

Dans le sol submergé, le poids sec des nodules de racine de *Sesbania rostrata* est très faible (0,03 g/plante) alors que celui des nodules de tige est très élevé ($1,4 \pm 0,5$ g/plante). Dans le sol drainé, le poids sec des nodules de racine de *Sesbania rostrata* est de $0,3 \pm 0,08$ g/plante et celui des nodules de tige de $1,0 \pm 0,3$ g/plante (tableau 11).

Dans le cas de *Sesbania sesban*, le poids sec des nodules a été de $0,45 \pm 0,11$ g/plante en sol drainé et de $0,10 \pm 0,05$ en sol submergé.

2.3. Influence des différents traitements sur l'excès isotopique et l'utilisation de l'engrais appliqué

Les résultats du tableau (12) montrent que l'inoculation de *Sesbania rostrata* avec la souche ORS 571 diminue l'excès isotopique (atom % ^{15}N excess.) des tiges et des feuilles dans le sol drainé et inondé ; l'effet apparaît toutefois moins marqué en sol drainé. L'inoculation de *Sesbania sesban* avec la souche ORS 502 diminue sensiblement, mais non significativement, l'excès isotopique des feuilles et des tiges. Le coefficient d'utilisation de l'engrais (FUE) n'est pas affecté par l'inoculation. On observe une tendance à la diminution du coefficient FUE sous l'effet de la submersion.

2.4. Effet des différents traitements sur la fixation d'azote

Le pourcentage d'azote provenant de la fixation (% Ndfa) dans les tissus des plantes est toujours plus élevé chez *Sesbania rostrata* que chez *Sesbania sesban*. La submersion du sol n'augmente significativement le % Ndfa que chez *Sesbania rostrata* (tableau 13). Les effets des différents traitements sur la quantité d'azote fixé mesurée

Tableau 11 : Influence de différents traitements sur le poids sec des nodules, le poids sec et la teneur en azote total des parties aériennes de *Sesbania rostrata* et *Sesbania sesban* âgées de 60 jours et cultivées dans un sol submergé (W) ou drainé (D)⁽¹⁾.

Traitement			Poids sec (g/plante)				Teneur en azote (%)		N total (g/plante)
Espèces	Inoc. (2)	Régime hydrique	Nodules	Tiges	Feuilles	Total	Tiges	Feuilles	
<i>Sesbania rostrata</i>	0	W	0	16,8±3,9 ^c	8,0±1,4 ^b	24,9±3,6 ^c	0,71±0,07 ^c	3,80±0,4 ^c	0,42±0,11 ^d
<i>Sesbania rostrata</i>	+	W	Racines 0,03 Tige 1,4±0,3	20,5±6,0 ^b	11,5±3,4 ^a	32,0±9,5 ^b	1,14±0,04 ^a	4,48±0,07 ^b	0,76±0,21 ^b
<i>Sesbania rostrata</i>	0	D	0	21,7±1,6 ^b	11,7±1,2 ^a	33,4±0,5 ^b	0,82±0,31 ^{bc}	3,54±0,61 ^c	0,58±0,03 ^c
<i>Sesbania rostrata</i>	+	D	Rac.0,3±0,08 Tige 1,0±0,3	29,6±4,7 ^a	11,7±1,5 ^a	41,3±6,0 ^a	0,98±0,12 ^{abc}	4,94±0,31 ^a	0,87±0,12 ^a
<hr/>									
<i>Sesbania sesban</i>	0	W	0	5,9±2,7 ^d	7,9±1,5 ^b	13,9±4,0 ^d	1,01±0,21 ^{abc}	4,31±0,31 ^b	0,40±0,06 ^d
<i>Sesbania sesban</i>	+	W	0,1±0,05	5,9±1,0 ^d	8,3±1,2 ^b	14,2±1,7 ^d	1,15±0,32 ^a	4,61±0,12 ^{ab}	0,45±0,04 ^d
<i>Sesbania sesban</i>	0	D	0	13,5±2,6 ^c	11,5±0,6 ^a	24,9±3,0 ^c	0,97±0,11 ^{abc}	3,84±0,72 ^c	0,59±0,12 ^c
<i>Sesbania sesban</i>	+	D	0,45±0,11	16,7±1,7 ^c	12,5±0,8 ^a	29,2±2,2 ^{bc}	1,12±0,22 ^{ab}	4,29±0,11 ^b	0,71±0,07 ^b
				CV ³ 12,6	10,0	10,9	14,6	5,8	10,6

(1) Valeur moyenne ± intervalle de confiance (P = 0,05)

(2) Inoculation : 0, plantes non inoculées; + plantes inoculées

(3) Coefficient de variation (%)

Pour chaque expérience, les nombres dans une même colonne et suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement pour P = 0,05 (NEWMAN et KEULS, 1957).

Tableau 12 : Excès isotopique (atom % ^{15}N .ex.) et coefficient d'utilisation de l'engrais (FUE) de *Sesbania rostrata* et *Sesbania sesban* âgées de 60 jours cultivées dans un sol submergé ou drainé.

Espèces	Traitements		Excès isotopique ⁽¹⁾		F U E ⁽²⁾
	Inoc. ⁽³⁾	Régime hydrique	Tiges	Feuilles	
<i>Sesbania rostrata</i>	0	W	0,511 ^a	0,450 ^a	28,8 ± 14,8
<i>Sesbania rostrata</i>	+	W	0,239 ^c	0,219 ^b	24,7 ± 10,7
<i>Sesbania rostrata</i>	0	D	0,404 ^{abc}	0,353 ^{ab}	31,1 ± 3,6
<i>Sesbania rostrata</i>	+	D	0,249 ^c	0,235 ^b	30,1 ± 5,2
<i>Sesbania sesban</i>	0	W	0,447 ^{ab}	0,372 ^{ab}	23,4 ± 9,8
<i>Sesbania sesban</i>	+	W	0,397 ^{abc}	0,309 ^{ab}	22,6 ± 6,4
<i>Sesbania sesban</i>	0	D	0,371 ^{abc}	0,319 ^{ab}	29,1 ± 4,9
<i>Sesbania sesban</i>	+	D	0,318 ^{bc}	0,250 ^b	28,7 ± 1,6
			CV ⁴ 21,6	21,9	

(1) Pour chaque traitement, les nombres dans une même colonne et suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement pour $P = 0,05$ (Newman et KEULS, 1957)

(2) Valeurs moyennes ± intervalle de confiance ($P = 0,05$)

(3) Inoculation: 0, plantes non inoculées : + plantes inoculées

(4) Coefficient de variation (%)

Tableau 13 : Fixation d'azote par des plantes de *S. rostrata* et *Sesbania sesban* âgées de 60 jours et cultivées dans un sol submergé (W) ou drainé (D). Fixation calculée par la méthode isotopique et par la méthode de différence (1).

Espèces	Régime hydrique	Méthode de mesure	Fixation d'azote	
			% Ndfa	Azote fixé (g/plante)
<i>Sesbania rostrata</i>	W	Isotopique	51 ± 10,1	0,78 ± 0,31
		Différence	45 ± 13,1	0,68 ± 0,21
<i>Sesbania rostrata</i>	D	Isotopique	36 ± 5,7	0,62 ± 0,06
		Différence	35 ± 12,4	0,59 ± 0,31
<i>Sesbania sesban</i>	W	Isotopique	13 ± 8,0	0,06 ± 0,03
		Différence	11 ± 5,2	0,05 ± 0,03
<i>Sesbania sesban</i>	D	Isotopique	18 ± 2,5	0,13 ± 0,03
		Différence	18 ± 2,3	0,12 ± 0,11

Valeurs moyennes ± intervalle de confiance (P = 0,05).

par la méthode isotopique ou par la méthode de la différence sont similaires à ceux observés pour % Ndfa.

2.5. Nodulation et fixation d'azote

Le tableau 11 montre que la nodulation des tiges chez *Sesbania rostrata* permet à cette plante de produire trois fois plus de nodules que *Sesbania sesban* pendant la même période que le sol soit drainé ou submergé. Ces résultats confortent ceux rapportés dans l'expérience préliminaire et montrent que Le potentiel fixateur d'azote de *Sesbania rostrata* est probablement corrélé à l'abondance des nodules de tige.

2.6. Estimation de la fixation d'azote par la méthode de dilution isotopique

Pour chaque plante correspondant aux traitements 3 et 7, 4 et 8 le pourcentage d'azote provenant de la fixation de N₂ ($y = \% \text{ Ndfa}$) a été calculé en utilisant les valeurs individuelles des excès isotopiques des feuilles et des tiges des plantes fixatrices et non fixatrices d'azote. Pour chaque plante nodulée, l'azote total fixé Y (g/plante) a également été calculé. Ainsi, il a été estimé que $51 \pm 10\%$ (sol submergé) et $36 \pm 5,7\%$ (sol drainé) de l'azote des *Sesbania rostrata* nodulées proviennent de la fixation d'azote atmosphérique contre $13,8\%$ (sol submergé) et $18 \pm 2,5\%$ (sol drainé) chez *Sesbania sesban*. Ce pourcentage d'azote provenant de la fixation est donc significativement plus élevé chez *Sesbania rostrata*. En sol submergé ce pourcentage augmente chez *Sesbania rostrata* mais par contre diminue chez *Sesbania sesban*. Ceci représente pour chaque plante de *Sesbania rostrata*, une fixation de $0,78 \pm 0,31 \text{ g N}_2$ en sol submergé ou $0,62 \pm 0,06 \text{ g N}_2$ en sol drainé, et pour chaque plante de *Sesbania sesban* une fixation de $0,06 \pm 0,03 \text{ g N}_2$ en sol submergé ou $0,13 \pm 0,03 \text{ g N}_2$ en sol drainé (tableau 13).

2.7. Estimation de la fixation d'azote par la méthode de différence

Chaque plante de *Sesbania rostrata* inoculée fixe en 60 jours, $0,68 \pm 0,21 \text{ g N}_2$ (sol submergé) ou $0,59 \pm 0,31 \text{ g N}_2$ (sol drainé). Chaque plante de *Sesbania sesban* fixe

dans le même temps, $0,05 \pm 0,03$ g N₂ (sol submergé) ou $0,12 \pm 0,11$ g N₂ (sol drainé) (tableau 13)

2.8 . Estimation de la fixation d'azote

Au champ, la densité normale de plantation est de 120.000 à 160.000 plantes/ha. En se basant sur une densité moyenne de 140.000 plantes/ha, et pour une période de 60 jours, la fixation d'azote par *Sesbania rostrata* représenterait l'équivalent de 95 - 109 kg N₂/ha en sol submergé et de 83 - 87 kg N₂/ha en sol drainé. Une telle extrapolation doit toutefois être considérée avec prudence. Il y a probablement une stimulation de la fixation d'azote due au fait que l'azote marqué ¹⁵N incorporé au sol avec du glucose, induit une prolifération microbienne intense qui immobilise et met à la disposition du végétal, des éléments nutritifs et de l'azote minéral du sol, favorisant ainsi la fixation d'azote (Fried *et al.*, 1983 ; Witty, 1984). En revanche, une fixation plus importante aurait dû être décelée si les plantes avaient été cultivées entre les mois de juin et septembre, période pendant laquelle les conditions climatiques sont beaucoup plus favorables pour la croissance et la fixation d'azote que celles qui caractérisent la fin de l'année.

La même extrapolation permet d'évaluer la quantité d'azote fixé par *Sesbania sesban* en 60 jours à 7 - 8 kg N₂/ha en sol submergé et à 17 - 18 kg N₂/ha en sol drainé.

2.9. Effet de la submersion du sol

La submersion du sol réduit de façon spectaculaire la nodulation des racines chez les deux espèces de *Sesbania*, mais ne modifie que légèrement la quantité de nodules de tiges de *Sesbania rostrata* (tableau 11).

Dans un sol drainé, le poids des nodules de tige est un peu inférieur à celui d'un sol submergé. Il est intéressant de noter que la somme des poids de nodules de tige et de racine est pratiquement la même pour les plantes cultivées en sol submergé ou en sol drainé.

Comme le montre le tableau 13, la fixation d'azote par *Sesbania rostrata* n'est pas affectée par la submersion contrairement au cas de *Sesbania sesban* où elle est

considérablement réduite. La différence de comportement des deux espèces de *Sesbania* pourrait être expliquée par l'une des deux hypothèses suivantes :

(1) les nodules de racine et non les racines elles mêmes des deux espèces de *Sesbania* se décomposent rapidement sous l'effet de la submersion, qui limite la diffusion de l'oxygène dans le sol.

(2) les nodules de tige de par leur position même, ne sont soumis à aucune contrainte.

2.10. Quantité d'azote dérivé du sol, de l'engrais azoté et coefficient d'utilisation de l'engrais (FUE)

L'emploi de traceur ^{15}N permet dans le végétal, de distinguer l'azote originaire du sol et celui qui provient du sulfate d'ammonium ajouté. Les proportions relatives à l'azote du sol, de l'engrais sont représentés sur les figures 46 et 47. Le pourcentage de l'azote dérivé du sol chez des plantes de *Sesbania rostrata* fixatrices est de 43% (sol submergé) ou 59% (sol drainé). Pour les plantes de *Sesbania sesban* ces pourcentages sont de 79,3% (sol submergé) ou 76,5% (sol drainé). Pour les plantes non inoculées l'azote dérivé du sol représente 90,3% (sol submergé) ou 92,4% (sol drainé) chez *Sesbania rostrata* et 91,8% (sol submergé) ou 93,0% (sol drainé) chez *Sesbania sesban*. Ces résultats suggèrent qu'une plante nodulée et fixant l'azote utilise "mieux" l'azote du sol qu'une plante non nodulée et donc non fixatrice.

Les pourcentages d'azote dérivé de l'engrais restent faibles chez les deux espèces de *Sesbania*. Dans le sol drainé, le coefficient FUE est plus élevé que dans le sol submergé probablement parce que, dans le second cas, une fraction de l'azote engrais a été dénitrifié. Cependant quel que soit le régime hydrique, le FUE est toujours faible (23 - 31%) (tableau 12). Ainsi, en valeurs relatives, les plantes semblent utiliser moins d'azote provenant de l'engrais mais plus d'azote du sol.

Cette situation est comparable a celle qui a été rapportée pour *Casuarina equisetifolia* et *Acacia holosericea* cultivées dans le même sol (Gauthier *et al.*, 1985 ; Cornet *et al.*, 1985) et avec le soja et le millet cultivés sur d'autres sols du Sénégal (Ganry, Communication personnelle). Dans la plupart des sols de l'Afrique de l'Ouest, le faible coefficient FUE explique que pour obtenir une réponse satisfaisante

à l'application d'engrais azoté, il faut apporter une quantité d'engrais beaucoup plus élevée que celle nécessaire.

2.11 Méthodologie relative à l'évaluation de la fixation d'azote

Le tableau (13) montre qu'il y a une très bonne corrélation entre les évaluations obtenues par la méthode isotopique et celles obtenues avec la méthode de la différence. Une telle concordance a déjà été rapportée par un certain nombre d'auteurs (Talbot *et al.*, 1982 ; Witty, 1983 ; Cornet *et al.*, 1985).

Ainsi dans les conditions de croissance contrôlées que nous avons utilisées, les méthodes d'estimation de la fixation d'azote sont fiables et reproductibles. Cependant les estimations par la méthode de la différence, diffèrent quelque peu de la méthode isotopique. Selon Witty (1983), ces légères différences seraient dues au fait que les plantes témoins et les plantes fixatrices n'utilisent pas l'azote de l'engrais dans les mêmes proportions : 9,7 et 4,6% (sol submergé), 7,6 et 4,9 (sol drainé) respectivement pour les plantes témoins et fixatrices de *Sesbania rostrata* et 8,2 et 7,1% (sol submergé), 7 et 5,7 % (sol drainé) pour les plantes témoins et fixatrices de *Sesbania sesban* (Fig. 46 et 47).

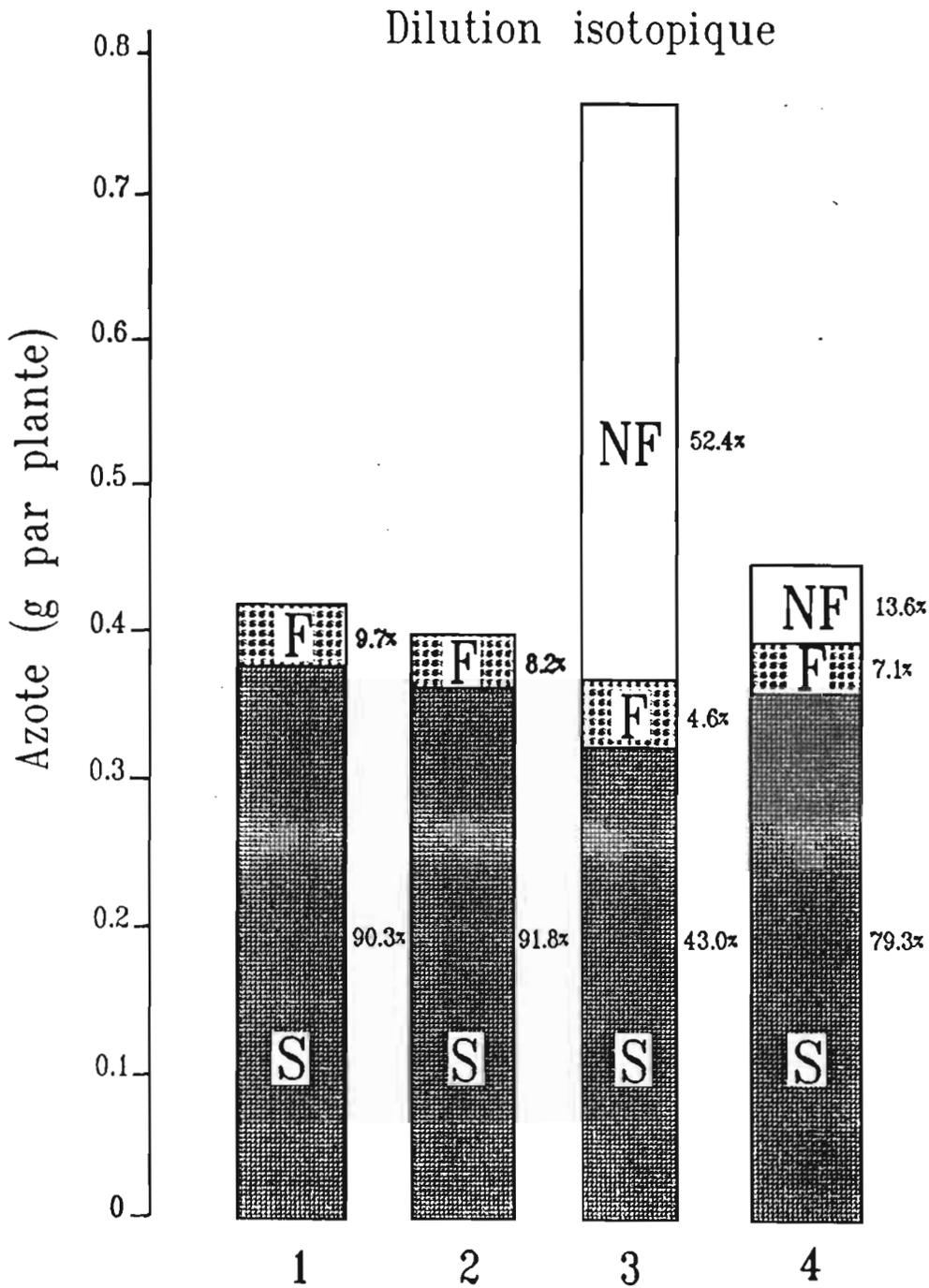


Fig-46 : Contribution de l'azote du sol (S), de l'azote de l'engrais (F) et de l'azote de la fixation (NF) à la nutrition de *S. rostrata* et *S. sesban* cultivées en conditions submergées.

Dilution isotopique

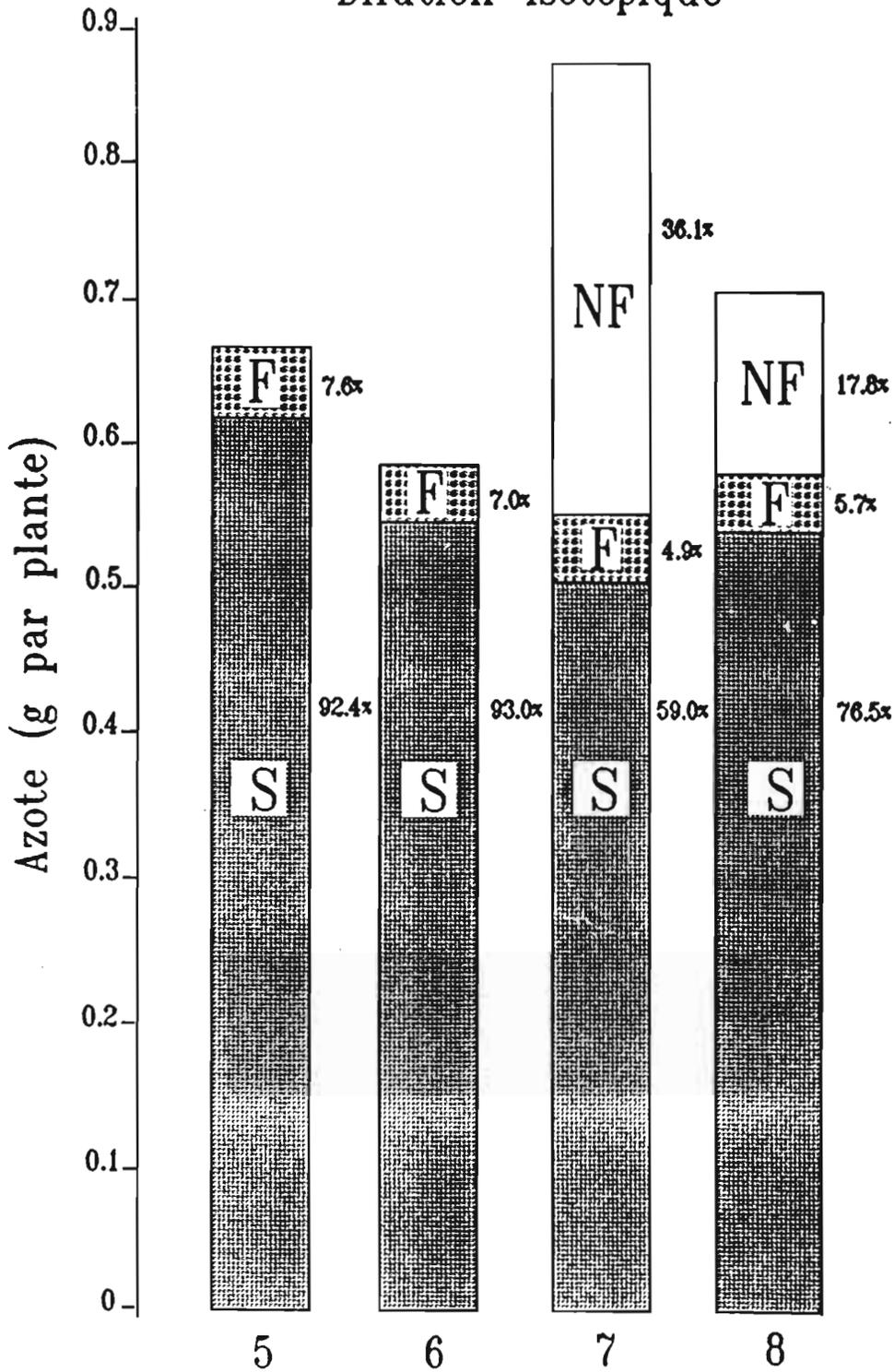


Fig-47 : Contribution de l'azote du sol (S), de l'azote de l'engrais (F) et de l'azote de la fixation (NF) à la nutrition de S. rostrata et S. sesban cultivées en conditions drainées.

IV. CONCLUSION

L'association symbiotique *Azorhizobium* - *Sesbania rostrata* présente une nodulation abondante et très effective, due presque essentiellement aux nodules de tige. L'estimation de la fixation d'azote par la méthode isotopique a montré que cette association très performante, pouvait fixer au champ environ 110 kg d'azote à l'hectare en 60 jours.

Les résultats présentés ci-dessus confirment le potentiel fixateur d'azote élevé d'une légumineuse à nodule de tige, *Sesbania rostrata* qui, en sol submergé ou drainé, a un rendement exprimé en matière sèche ou en azote plus élevé que celui de *S. sesban*, légumineuse à nodules racinaires. Il apparaît en conséquence que l'utilisation de *S. rostrata* comme engrais vert en riziculture peut être recommandée comme alternative à la fertilisation chimique.

La différence entre les deux espèces de *Sesbania*, mise en évidence tout au long de nos expériences, doit être rapprochée des résultats obtenus au champ, où il a été observé que, pour une période de croissance de 45 jours, *Sesbania rostrata* produit plus de 25 tonnes de matière fraîche /ha contre seulement 12 tonnes à *Sesbania sesban* (I. Ndoye, 1988).

Important facteur d'adaptation, la nodulation caulinaire confère à *Sesbania rostrata* une grande capacité de fixation azotée dans des conditions de submersion du sol.

CHAPITRE IV

**UTILISATION DE SESBANIA ROSTRATA
COMME ENGRAIS VERT ET FOURRAGE**

I. INTRODUCTION

L'eau et l'azote constituent deux des facteurs majeurs régissant la production agricole. Les exigences en azote des plantes cultivées sont considérables. C'est ainsi que pour le riz, aliment de base de près de la moitié de la population mondiale, il a fallu accroître la consommation des engrais azotés et phosphatés pour faire face à une demande de plus en plus forte. Pour produire 100 kg de grains, le riz " consomme" de 1,8 à 2kg d'azote quel que soit le type de sol ou la date de plantation (Patnaik et Rao, 1979). Cependant, l'emploi des engrais azotés est souvent limité par leurs prix élevés, sans cesse croissant, incompatibles avec les ressources financières de la majorité des paysans des pays en voie de développement. La fixation biologique de l'azote constitue une alternative attrayante et de moindre coût. L'enfouissement dans le sol, des parties aériennes d'une plante fixatrice d'azote et les résidus végétaux en résultant jouent alors le rôle d'engrais azoté organique susceptible de se substituer aux engrais minéraux. Le nom d'engrais vert est donné à cette pratique.

L'utilisation des légumineuses comme engrais vert en vue d'améliorer les rendements des rizières est une pratique ancienne, en particulier en Asie du Sud-Est et en Inde où de nombreuses légumineuses sont utilisées, *Aeschynomene americana*, *Aeschynomene indica*, *Astragalus sinicus*, *Crotalaria juncea*, *Crotalaria stricta*, *Indigofera tinctoria*, *Lablab purpureux*, *Medicago hispida* *Medicago officinalis*, *Vicia officinalis*, *V. cracca*, et plusieurs espèces du genre *Sesbania* qui ne portent pas de nodules sur la tige, *Sesbania aculeata*, *S. cannabina*, *S. sesban*, *S. paludosa* (Vachhani et Murty, 1964 ; Patnaik et Rao, 1979 ; Watanabe et App., 1979 ; Allen et Allen, 1981; Singh, 1984 ; Roger et Watanabe, 1986 ; Brewbaker et Glover, 1988).

Des progrès ont été enregistrés dans le domaine des engrais verts avec la découverte des légumineuses comme *S. rostrata*, dont la double nodulation conduit à l'obtention de nodules 5 à 10 fois plus nombreux que chez la plupart des autres légumineuses (Dreyfus et Dommergues, 1981). Cela se traduit par une capacité de fixation d'azote très supérieure à celle par exemple, d'autres espèces asiatiques de *Sesbania* utilisées jusqu'alors comme engrais vert. *S. rostrata* ayant l'aptitude à pousser dans de sols submergés pouvait donc être utilisée comme engrais vert en riziculture.

Testée comme engrais vert, en parcelles de 1m² ou 25m², *S. rostrata* a permis de doubler le rendement en riz par rapport à la manière traditionnelle et permet

l'obtention de riz dont la teneur en protéines est accrue de 37 à 50% par rapport aux teneurs habituelles (Rinaudo *et al.*, 1982, 1983 ; Dreyfus *et al.*, 1985 ; Rinaudo et Moudiongui, 1985 ; Diack, 1987). En outre, *S. rostrata* présente vis à vis du nématode parasite du riz *Hirschmanniella oryzae* un effet piège très net. (Pariselle, 1987, Pariselle et Rinaudo., 1988). L'utilisation de *S. rostrata* est donc doublement bénéfique. Des expériences conduites en 1985-1986 aux Philippines à l'IRRI ont montré que *S. rostrata* était la légumineuse la plus performante parmi les espèces testées comme engrais vert. Son incorporation au sol de la rizière peut apporter l'équivalent de 120 kg N par hectare (Ladha *et al.*, 1988).

Parallèlement à ses propriétés d'engrais vert, *Sesbania rostrata* est très utilisée comme fourrage vert donné aux animaux et en particulier aux bovins. L'étude de la valeur fourragère de *S. rostrata* n'ayant jusqu'à présent jamais été abordée, il nous a paru utile d'envisager son utilisation comme fourrage en introduisant sa production parmi celle d'autres plantes fourragères dans la nouvelle zone économique du fleuve Sénégal, zone naturelle d'élevage. De telles productions fourragères devraient donc conduire à une amélioration de la nutrition animale et par voie de conséquence à une augmentation de la production de viande et de protéines animales. Il en résulterait une augmentation de la consommation par tête d'habitant, actuellement faible au Sénégal.

Dans la première partie de ce chapitre, l'utilisation de *Sesbania rostrata* comme engrais vert est envisagée avec pour objectifs la réduction des lourdes importations de riz par le Sénégal et l'amélioration des rendements de rizières permettant l'autonomie alimentaire du pays.

Des essais en milieu paysan ont eu pour but de tester la validité de la démarche, d'identifier les éventuelles contraintes liées à l'introduction de cette biotechnologie dans les habitudes et pratiques culturelles des agriculteurs, et enfin éventuellement de trouver des solutions aux problèmes liés à l'emploi des engrais verts. Un projet Utilisation de *Sesbania rostrata* comme engrais vert a été mené en Casamance (Sud du Sénégal), région de riziculture traditionnelle où les rizières présentent de graves pénuries en azote. Les expériences réalisées ont été conduites en liaison avec l'ORSTOM, l'ISRA et l'Université de Gand en Belgique.

Dans un deuxième temps, l'utilisation de *S. rostrata* comme plante fourragère pour les animaux a été envisagée. En effet, la connaissance de la valeur alimentaire des

fourrages revêt une importance particulière au Sénégal où ils entrent dans la composition de différentes rations. Les fanes en général, particulièrement celles d'arachide et de niébé sont très recherchées. Récoltées avec soin, elles entrent, en partie ou en totalité, dans la composition de rations d'embouche ovine ou bovine (Roberges *et al.*, 1984).

L'utilisation de *Sesbania rostrata* comme plante fourragère est menée depuis 1985, en étroite liaison avec L.N.E.R.V.

II. MATERIELS ET METHODES

1. Utilisation de *Sesbania rostrata* comme engrais vert

1.1. Les traitements

Les traitements ont été les suivants :

- (1) Témoin T, aucune fumure minérale azotée
- (2) Témoin N, avec fumure minérale azotée
- (3) Engrais vert *S. rostrata* (S) inoculé et enfoui
- (4) Engrais vert *A. afraspera* (A) inoculé et enfoui.

1.2. Dispositif expérimental (fig. 48)

C'est un dispositif en bloc à randomisation totale avec 4 traitements et 8 répétitions sur un total de 32 parcelles élémentaires. La surface d'une parcelle est de $8\text{m} \times 5\text{m} = 40\text{m}^2$

1.3. Analyse des sols (tableau 14)

Le sol utilisé est un sol argileux (ustisol), à pH acide et dont la teneur en matière organique est élevée. Contrairement à la plupart des sols tropicaux, ce sol a un pourcentage en phosphore assimilable important. La proportion du sol en bases échangeables, Ca et K, est forte mais un peu faible en Mg.

1.4. Fumures minérales (tableau 15)

La fumure phosphopotassique est épanchée avant le semis, 30 jours après le semis des légumineuses sur les parcelles (S) et (A) et au moment du repiquage du riz sur l'ensemble des parcelles du champ d'essai. La dose appliquée est de 60 unités de P sous forme de P_2O_5 et de 50 unités de K sous forme de K_2O . La fumure minérale

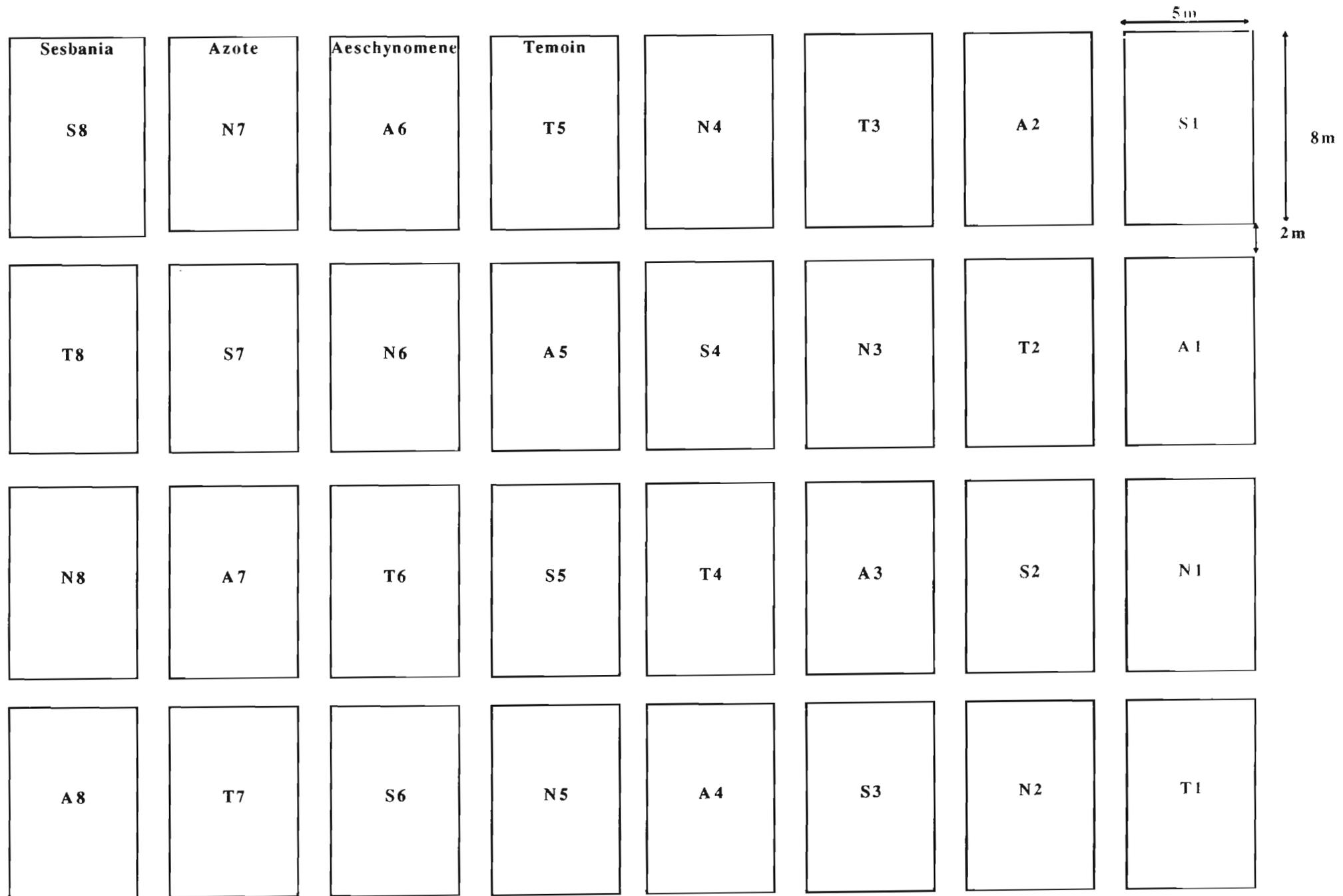


Fig. 48 - Utilisation de *Sesbania rostrata* comme engrais vert. (PLAN DE L'EXPERIMENTATION)

Tableau 14 : Principales caractéristiques chimiques de sols de rizières de Fanghote (Casamance)

pH		Fertilité					Bases échangeables			
H ₂ O	KCl	C‰	N‰	C/N	P ₂ O ₅ total (Olsen) ‰	P ₂ O ₅ (Olsen) ‰	mé/160 g			
							Ca	Mg	K	Na
4,2	3,7	52,2	3	29,8	1,43	0,28	2,9	0,7	0,26	0,67

Tableau 15 : Quantité de fumures minérales sur les différentes parcelles

Traitements	Fumure sur <i>S. rostrata</i> et <i>A. afraspera</i>			Fumure sur le riz		
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
Témoin (T)	0	0	0	0	60	50
Azote (N)	0	0	0	60/3	60	50
<i>A. afraspera</i> (A)	0	40/2	32/2	0	20	18
<i>S. rostrata</i> (S)	0	40/2	32/2	0	20	18

40/2 signifie 40 unités de P₂O₅ en 2 apports

32/2 " 32 unités de P₂O₅ en 2 apports

60/3 " 32 " " en 3 apports

azotée, sous la forme d'urée épanchée uniquement sur les parcelles témoins (N), est apportée à raison de 20 unités d'azote lors du repiquage du riz, du tallage, 3 semaines plus tard et avant floraison 1 mois, et demi plus tard.

1.5. Analyse des résultats

Pour la signification des résultats le test statistique de Newman et Keuls au seuil de 5% a été utilisé.

1.6. Culture des légumineuses

1.6.1. Préparation des graines

Afin d'obtenir une bonne germination, les graines sont préalablement scarifiées. Le traitement mécanique consiste à ajouter du sable siliceux aux graines et à faire tourner délicatement le mélange dans un mortier à l'aide d'un pilon afin de rayer le tégument des graines.

1.6.2. Inoculation et semis

Les graines sont inoculées avant le semis par immersion dans un inoculum liquide contenant environ 10^8 bactéries/ml. Les graines sont ensuite semées à la main, en ligne dans la rizière humide. L'inoculation des tiges est effectuée environ 25 jours après le semis, à l'aide d'un pulvérisateur à insecticide par pulvérisation de l'inoculum sur la tige des légumineuses (Fig. 49).

1.7. Culture du riz

1.7.1. Préparation d'une pépinière

Une pépinière de riz est mise en place environ 20 jours après le semis des graines de légumineuses.



Fig. 49 : Inoculation des tiges de S. rostrata

1.7.2. Enfouissement des légumineuses (fig. 50A et B)

Après 45 jours de croissance, les légumineuses sont coupées à la base des tiges, à l'aide de faucilles ou de coupe-coupes. Elles sont ensuite étalées sur le sol de la rizière, hachées en portions de 10-20cm et réparties uniformément sur les parcelles correspondantes. L'engrais vert est alors enfoui à une profondeur de 10-15 cm par un labour au kadiendo, outil traditionnel servant à enfouir les chaumes et les herbes et à effectuer des labours profonds, ou des billons.

1.7.3. Repiquage du riz (fig. 51A et B)

Environ une semaine après l'enfouissement de l'engrais vert, les plants de riz de la pépinière sont prélevés et repiqués en rizière.

1.7.4. Récolte du riz (fig. 52)

Quand le riz atteint sa maturité (120 jours de cycle), la récolte est effectuée manuellement. Le riz est alors séché pendant quelques jours et prêt à être pesé pour le calcul des rendements.

1.8. Estimation de la quantité d'azote de l'engrais vert enfoui dans les rizières

Un échantillonnage du champ qui permet de connaître le nombre de plantes de *Sesbania rostrata* à l'hectare est réalisé. Des plantes sont récoltées au hasard dans le champ et séchées à l'étuve à 60°C. La teneur en azote des plantes est dosée et la quantité d'azote de l'engrais vert enfouie dans les rizières est ensuite déterminée.

2. Utilisation de *S. rostrata* comme fourrage

2.1. Productivité

2.1.1. Les traitements

Les traitements ont été réalisés sur *S. rostrata* et *S. sesban* après inoculation.



Fig. 50A : Enfouissement à plat de S. rostrata



Fig. 50B : Enfouissement en billon de S. rostrata



Fig. 51A : Repiquage à plat du riz



Fig. 51B : Repiquage sur billon du riz



Fig. 52 : Récolte du riz

2.1.2. Dispositif expérimental (fig. 53)

C'est un dispositif en bloc avec 2 traitements et 6 répétitions s'étendant sur 12 parcelles élémentaires. La surface d'une parcelle est de $4\text{m} \times 5\text{m} = 20\text{m}^2$

2.1.3. Conditions agronomiques

Les plantes sont semées sur des sols argilo sableux (tableau 16) de la ferme de Sangalkam pendant la saison des pluies. Aucune irrigation n'est apportée

.

2.1.4. Fumures minérales

Une fertilisation de fond de 100 unités P sous forme de P_2O_5 , et une fertilisation d'entretien de 50 unités de K sous forme de K_2O , et 100 unités de P sous forme de P_2O_5 sont apportées. Aucune fumure azotée n'est épanchée.

2.1.5. Inoculation et semis

Les graines de *S. rostrata* et de *S. sesban* inoculées au semis par immersion respectivement dans des suspensions d'ORS 571 et d'ORS 502 sont semées à la main, en poquets de 25 x 25cm. Les tiges de *S. rostrata* sont inoculées à l'aide de la souche ORS571, 3 semaines après le semis.

2.1.6. Coupes

Les coupes sont effectuées à 45 jours et les pesées de la biomasse réalisées immédiatement.

2.1.7. Analyses des résultats

Le test statistique de Newman et Keuls au seuil de 5% a été utilisé.

Fig.53 : PRODUCTIVITÉ DE $\left\{ \begin{array}{l} \text{SESBANIA ROSTRATA (S.R) ET} \\ \text{SESBANIA SESBAN (S.S)} \end{array} \right.$

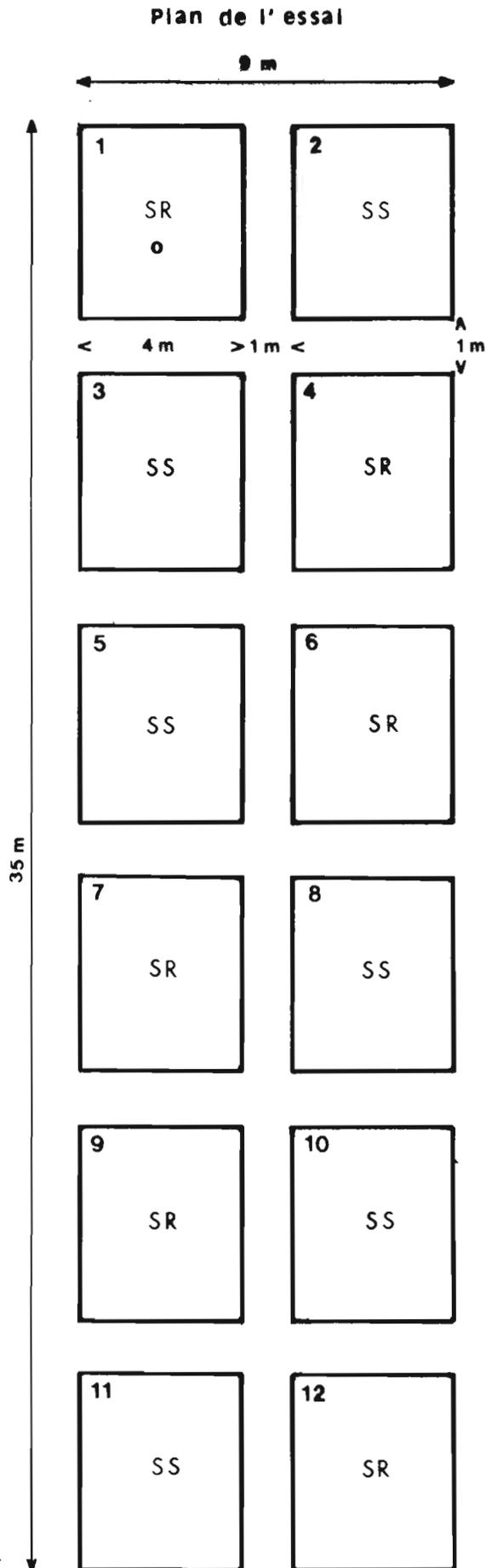


Tableau 16 - Principales caractéristiques chimiques de sol de SANGALKAM

pH		Fertilité					Bases échangeables			
H ₂ O	KCl	C ‰	N ‰	C/N	P ₂ O ₅ total ‰	P ₂ O ₅ (Olsen)‰	mé/160 g			
							Ca	Mg	K	Na
6,7	5,7	17,9	1,20	14,9	0,74	0,03	16,35	5,20	0,30	0,58

2.2. Fourrage

Les graines de *S. rostrata* sont immergées dans un inoculum d'ORS 571 (10^8 bactéries/ml) et semées au mois d'août. L'inoculation des tiges avec la souche ORS 571 est effectuée 25 jours après le semis. *Sesbania rostrata* est récoltée 55 jours après l'inoculation. Les coupes effectuées à la faucille, sont séchées sur place pendant deux jours, puis rentrées en grange. Les plantes faisant systématiquement l'objet d'attaques d'insectes (*Mesoplatys sineta* : chrysomelidae, Coleoptere) à la fin du mois de septembre sont traitées avant la récolte avec du diméthéate, de l'acephate, du Decis ou du Malathion.

2.3. Digestibilité

La valeur d'un fourrage peut être mesurée par des méthodes d'analyses chimiques et de détermination de la digestibilité (Milford et Minson, 1966).

Les aliments ingérés par l'animal n'étant pas digéré en totalité, la partie non utilisée est alors excrétée sous forme de matières fécales. La part absorbée après digestion est appelée digestible et le terme de digestibilité rend compte du degré d'utilisation des aliments ou des nutriments (Skerman, 1977 ; Rivière, 1978).

Les essais ont été effectués au LNERV sur moutons peul-peul, selon la méthode classique (Boudet et Rivière, 1968). Cette méthode consiste à déterminer les aliments digérés par les animaux, par la pesée des quantités offertes, des refus et des fèces et par l'analyse chimique d'échantillons homogènes prélevés sur ces trois fractions. Le rapport entre la quantité de chaque nutriment dans les produits ingérés et dans les fèces permet de calculer les coefficients de digestibilité. Les mesures sont effectuées dans des cages de digestibilité. La valeur fourragère dépend de deux éléments essentiels : la valeur énergétique et la teneur en azote.

2.4. Analyses chimiques

Les analyses chimiques classiques (matières minérales et matière organique) ainsi que les dosages des constituants pariétaux par la méthode de Van Soest qui consiste à évaluer l'influence de la membrane végétale sur la transformation des aliments par

les animaux, ont été réalisées au laboratoire d'alimentation de l'IEMVT, Maisons-Alfort, France, et par le Laboratoire National de l'Élevage et des **Recherches Vétérinaires de Dakar, Sénégal.**

III. RESULTATS

1. Influence de *S. rostrata* utilisée ou comme engrais vert sur le rendement en riz

1.1. Essais en parcelles expérimentales

Les résultats obtenus en 1985 montrent une très bonne croissance des plantes de *S. rostrata* ainsi qu'une nodulation de tige importante. Au bout de 6 semaines, *S. rostrata* peut ainsi atteindre une hauteur moyenne de deux mètres et produire une biomasse de 37 t/ha. La croissance de *S. rostrata* illustrée sur la figure 54 peut, dans la meilleure période c'est à dire après 3 semaines de croissance, atteindre 10 cm par jour.

L'apport azoté de l'engrais vert durant 6 semaines de croissance est équivalent à environ 150 kg/ha (tableau 17). L'inoculation de *A. afraspera*, légumineuse tropicale à nodulation caulinaire n'a pas donné satisfaction en comparaison de la masse de matière organique enfouie 27 t/ha.

Le rendement du riz en grains, exprimé par hectare a été évalué respectivement à 2,0 t dans la parcelle témoin, à 2,9 t dans les parcelles ayant reçu de l'engrais azoté et à 4,9 t dans le cas où *S. rostrata* est utilisée comme engrais vert (tableau 17). Le rendement dans les parcelles traitées avec *A. afraspera*, 2,4 t/ha, correspond à un gain de rendement de seulement 20% par rapport au témoin.

1.2. Essais menés par les paysans

Les dispositifs utilisés, plus simples, se résument à des parcelles avec l'engrais vert *S. rostrata* et des parcelles témoins sans engrais vert. Ces expériences se sont étendues sur 4 années, 1986, 1987, 1988 et 1989. Les *Sesbania* ont été enfouies 5 semaines après le semis en 1986 et 1987 et seulement après 4 semaines en 1988.

- En 1986, les essais ont été effectués sur une surface de 3000m². Le rendement du riz est passé de 1,7 t/ha dans la parcelle témoin à 3,2 t/ha dans la parcelle ayant reçu l'engrais vert, soit un gain de rendement de 85% (tableau 18). La biomasse produite et enfouie est d'environ 25 t/ha et correspond à plus de 100 kg N/ha.

- En 1987, à Fanghote, les essais ont été effectués sur une surface beaucoup plus grande de 10.000m² (1 hectare). Au cours de cette année, la nodulation spontanée

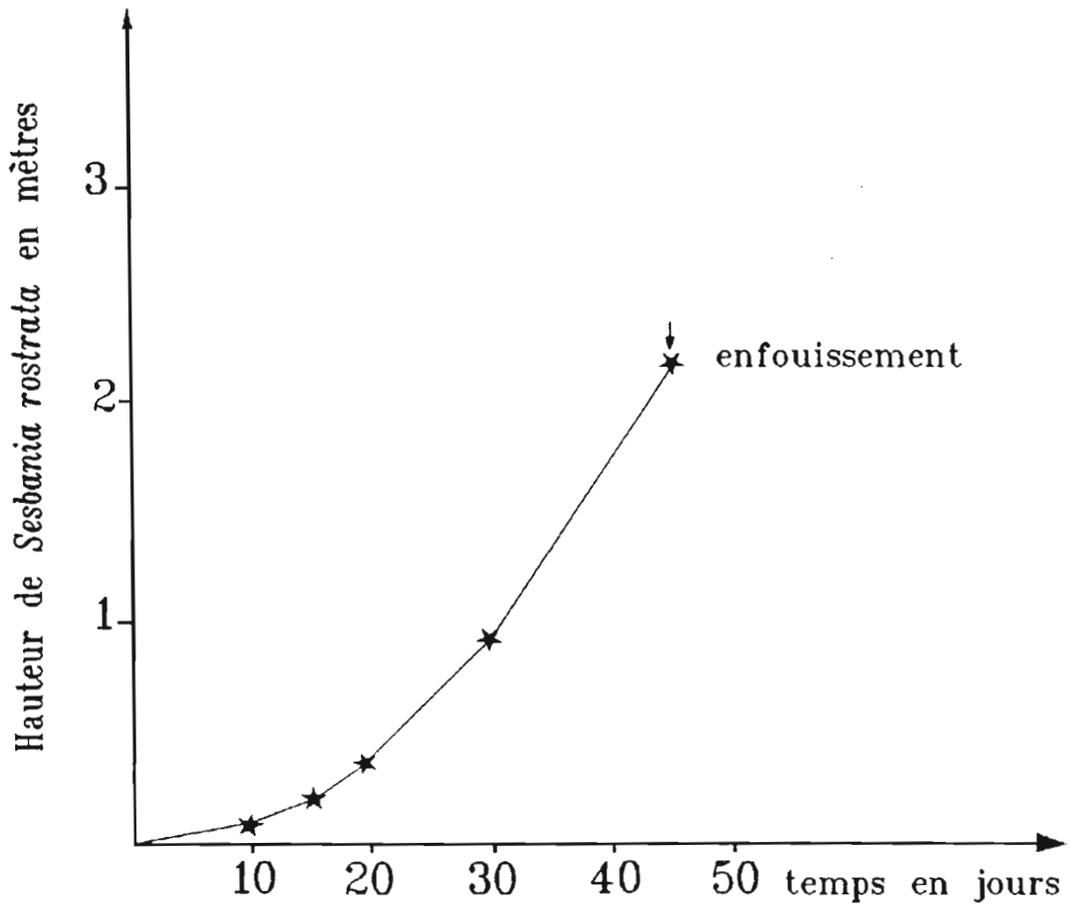


FIG. 54 Croissance de *Sesbania rostrata*
avant enfouissement

Tableau 17 : Influence de *Sesbania rostrata* comme engrais vert sur le rendement du riz (grains) = Essais sur parcelles expérimentales (1985).

Traitements	Biomasse T/ha	Equivalent azote total Kg/ha	Rendements	
			Kg/40m ²	T/ha
<i>Sesbania rostrata</i> (engrais vert)	37	153	19,83b	4,9b
<i>Aeschynomene afraspera</i> (engrais vert)	27	-	9,51a	2,4a
Fumure azotée (60 kg/N/ha)			11,55a	2,9a
Témoin (sans engrais vert)			8,21a	2,0a

Les chiffres (moyenne de 8 répétitions) affectés des mêmes lettres ne sont pas significativement différents au seuil de 5% (Test de NEWMAN et KEULS).

Tableau 18 : Influence de *S. rostrata* comme engrais vert sur le rendement du riz : Essais Paysans

Traitements	Rendement T/ha			
	Fanghote			Bayottes
	1986 ⁽¹⁾	1987	1988	1987
<i>Sesbania rostrata</i> (engrais vert)	3,2	4,3	3,4	2,5
Témoin (sans engrais vert)	1,7	2,2	2,1	1,3

(1) La Biomasse de l'engrais vert est de 25 t/ha et l'équivalent en azote enfoui de 110 kg/ha.

des tiges de *S. rostrata* étant limitée à la base de la tige, l'inoculation de la souche ORS 571 a été réalisée afin que les plantes puissent exprimer totalement leurs capacités de nodulation et de fixation. Dans ces conditions le rendement en riz s'est avéré de 2,2 t/ha dans la parcelle témoin à 4,3 t/ha dans le cas des parcelles à *S. rostrata* (tableau 18). Dans un autre village, les Bayottes, sur une surface plus réduite d'environ 1500 m², le rendement est passé de 1,3 t/ha dans la parcelle témoin à 2,5 t/ha dans la parcelle avec engrais vert.

- En 1988, à Fanghote la surface de la parcelle a été de 1000 m². Cette année là, aucune inoculation n'a été jugée nécessaire du fait de la présence d'*Azorhizobium* dans le sol. Le rendement de 2,1 t/ha dans la parcelle témoin, à 3,4 t/ha dans la parcelle avec engrais vert, a montré un gain de 62% (tableau 18).

2. Utilisation de *S. rostrata* comme fourrage

2.1. Productivité

Afin de mesurer la productivité de *Sesbania rostrata*, des essais de rendement ont été réalisés en saison des pluies en sol exondé argilo sableux à Sangalkam dans la région de Dakar. Les résultats obtenus montrent que *S. rostrata* a une bonne productivité, 25 t de matière verte par ha pour une période de 45 jours en comparaison de *S. sesban* qui ne produit que 12 t (tableau 19). En outre *S. rostrata* est assez prolifique du point de vue grainier. Coupé à 30 cm du sol, *S. rostrata* fournit en effet des rejets permettant une deuxième coupe. Les rendements obtenus sur deux coupes sont de 3,5 à 4 t de matière sèche alors que le niébé fourrager donne des rendements de 4,5 t et les fanes d'arachide 1,3 t (Roberges et Faye, 1983).

2.2. Valeur alimentaire de *S. rostrata*

Des études de digestibilité, d'ingestibilité et des analyses bromatologiques ont été réalisées sur du foin de *S. rostrata*. Les résultats sont représentés sur les tableaux 20 et 21. Le tableau 20 montre ainsi une teneur de la matière sèche du fourrage distribué de 879 g/kg brut, une digestibilité de 51-53% et une ingestibilité de 38g de M.S./jour et par kg de poids métabolique ou 26 g pour un mouton de 25 kg. Par comparaison, les fanes d'arachide vulgarisées offrent une digestibilité de la matière sèche de 56%

Tableau 19 : Productivité de *Sesbania rostrata* comme fourrage après 45 jours de croissance à Sangalkam.

Traitements	Biomasse T/ha
<i>S. rostrata</i>	25a
<i>S. sesban</i>	12b

Les chiffres (moyenne de 6 répétitions) affectés des mêmes lettres ne diffèrent pas au seuil de 5% (Test de NEWMAN et KEULS)

Tableau 20 : Teneur en cendres, composition de la matière organique et digestibilité des constituants (analyses faites à l'IEMVT, Maisons-Alfort, responsable H. GUERIN).

Constituants	Composition (g/kg MS)	Foin	Tiges	Feuilles	Digestibilité des constituants de la plante entière
Cendres		87	63	158	
Matière organique		913	937	842	54,7
Matières azotées totales		163	115	305	75,3
Cellulose brut		424	528	114	36,6
Extrait éthéré		17	9	42	-
E.N.A.		309	285	381	62,6
N D F		610	751	186	38,8
A D F		500	615	155	39,8
Lignine		98	118	38	0

Matière sèche du foin distribué : 879 g/kg brut

Digestibilité de la matière sèche : 52,2

Consommation de matière sèche/jour 38,1 g/kg P^{0,75}

soit 426 g pour un mouton de 25 kg.

digestibilité de la matière sèche de 56% et une ingestibilité de 75-100g par kg de poids métabolique équivalent à plus de 3kg de MS/jour pour 100 kg de poids vif (Roberges et Perrot, 1987) ; la consommation moyenne normale étant de 2,5 kg de MS/jour (Chenost, 1972). Pour le niébé fourrager cette consommation est d'environ 76g/kg de poids métabolique (Milford et Minson, 1965).

On notera chez *S. rostrata*, une digestibilité moyenne de la matière organique et une bonne digestibilité des matières azotées totales conforme à la teneur élevée en MAT de la plante entière (tableau 20).

Le tableau 21 donne la composition de la teneur en éléments minéraux de *S. rostrata*. Comparé aux besoins des animaux (Quittet, 1969) et à la teneur des fanes d'arachides (Rivière 1978) (tableau 22), l'apport de *S. rostrata* en éléments minéraux apparaît donc satisfaisant.

Tableau 21 : Composition minérale du *Sesbania rostrata*.

		Plante entière	Tiges	Feuilles
Cendres totales)	87	63	158
Insoluble chlorhydrique)	12,5	3,0	40,5
Ca) en	8,30	3,55	13,7
P) g/kg	3,15	3,05	3,45
K) MS	18,20	17,60	19,80
Mg)	1,87	1,35	3,40
Na)	2712	2861	2264
Cu)	7,54	6,75	9,9
Zn) ppm/kg MS	35,3	29,5	52,9
Mn)	61,8	24,3	174,2
Fe)	537	140	1730
Co)	0,25	0,13	0,63

Tableau 22 : Besoins des animaux en éléments minéraux des plantes consommées (QUITTET, 1969) et compositions minérales de fanes d'arachide (R. RIVIERE, 1978).

Besoins des animaux		Fanes d'arachides
Ca	2)	8
P	1,2)	1,2
K	10) en g/kg MS	13
Mg	2)	4,8
Na	0,8)	
Cu	10)	
Co	0,1) mg/kg/MS	
Mn	40)	
Fe	8)	
Zn	50)	

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours des 4 dernières années montrent que *S. rostrata* constitue un engrais vert tout à fait exceptionnel dans les sols inondés et en particulier dans les rizières. Dans tous les cas l'apport d'engrais vert a été supérieur à 100 kg d'azote à l'hectare. Les rendements du riz ont doublé dans les conditions de culture en milieu paysan. Ces résultats ont depuis, été confirmés dans de nombreux pays et en particulier en Asie du Sud Est, aux Philippines, et en Inde où l'apport en azote de *S. rostrata* est du même ordre de grandeur (Ladha *et al.*, 1988). L'apport d'engrais doublé d'un apport de matière organique et probablement d'une diminution de la population de nématodes phytoparasitaires, a donc permis de doubler les rendements du riz sans avoir recours aux engrais chimiques dont le coût élevé est incompatible avec les revenus modestes des paysans de ces pays.

Au Sénégal, *Sesbania rostrata* dont l'effet engrais vert est désormais reconnu, a toutefois du mal à être intégrée dans les pratiques culturales paysannes et être utilisée à grande échelle en riziculture. Plusieurs problèmes demeurent, contrairement aux paysans asiatiques qui, traditionnellement utilisent les engrais verts dans la riziculture, les paysans africains, en général et les sénégalais en particulier n'ont aucune pratique des engrais verts. L'introduction de *Sesbania rostrata* demande donc un effort multidirectionnel, allant de la modification des pratiques culturales à la prise en compte des aspects socio-économiques. En Casamance, les premières pluies débutant vers le mois de juin-juillet et le repiquage du riz s'effectuant généralement vers fin août et début septembre, la période intermédiaire comprise entre le 1er juillet et le 15 août devrait toutefois permettre la culture de *Sesbania rostrata* en rizière sans perturber le calendrier traditionnel de la riziculture.

L'enfouissement de l'engrais vert représente indéniablement la partie nécessitant le travail le plus intense. En Casamance, les paysans ayant l'habitude d'enfouir de grandes quantités d'herbe dans leur rizière, une différence de travail minime entre l'enfouissement des mauvaises herbes ou l'enfouissement de l'engrais vert serait nécessaire. Cet effort est fait par les paysans qui utilisent, à ce titre leur outillage traditionnel efficace pour traiter de petites surfaces. Le traitement de surfaces plus étendues demande en revanche la mise en place de moyens de mécanisation tractée ou attelée adaptée à l'enfouissement rapide de l'engrais vert dans les rizières.

Les résultats présentés dans ce mémoire montrent par ailleurs que les *Azorhizobium* une fois introduits sont capables de coloniser les rizières même dans le cas de sols acides comme ceux de Fanghote. Cette propriété observée également aux Philippines et en Inde (Watanabe et Ladha, Communication personnelle), permet donc aux paysans d'éviter toute pratique expérimentale liée à l'inoculation.

Un autre facteur limitant de l'emploi de *Sesbania rostrata* est la production de semences. Les paysans devront garder un certain nombre de plantes pour récolter des graines.

Notons, avec intérêt qu'à la suite des expériences menées depuis 1986, les paysans de Casamance ont bien maîtrisé la technologie de l'engrais vert *S. rostrata* qu'ils jugent supérieure, en rendements en riz à l'utilisation d'engrais chimiques azotés.

Dans le futur, l'utilisation à grande échelle de *Sesbania rostrata* au Sénégal dépendra d'une part, d'une collaboration accrue entre les différents Instituts de recherche, ISRA, ORSTOM, ADRAO et les organismes socio-éducatifs et de développement, et d'autre part, d'une réelle volonté politique du gouvernement. Il est urgent que l'engouement porté au *Sesbania rostrata* en Asie, le soit aussi au Sénégal. Il serait en revanche incompréhensible que les excellents résultats obtenus par l'utilisation de cette plante tant au plan fondamental qu'appliqué, soient exploités dans les pays asiatiques et non au Sénégal où la plante a été découverte.

Les résultats relatifs à l'utilisation de *S. rostrata* comme fourrage sec (foin) sont moins prometteurs. Un certain nombre de problèmes se posent :

(1) la sensibilité de *S. rostrata* aux insectes nécessitant des traitements chimiques constitue un inconvénient majeur pour sa vulgarisation.

(2) *S. rostrata* perd une très grande partie de ses feuilles qui se séparent des tiges en séchant et tombent sur le sol. La nécessité de peser les tiges et les feuilles pour reconstituer un fourrage complet distribué aux animaux, paraît inconcevable.

(3) Le dernier problème est la faible ingestibilité du fourrage. En effet, la consommation volontaire du fourrage de *S. rostrata* est faible par rapport aux légumineuses tropicales, qui en général, ont une ingestibilité assez élevée surtout en début de floraison (Roberges, Communication personnelle). Cette faible consommation est particulièrement due à la teneur élevée en constituants pariétaux

consommation est particulièrement due à la teneur élevée en constituants pariétaux des tiges (forte teneur en cellulose et en lignine) qui ne sont pas digestibles. C'est ainsi que sur des tiges hachées et distribuées, les taux de refus élevés atteignent environ 48%. Par rapport au foin brut, le poids des tiges représente 75% du poids total.

Il est clair qu'actuellement *S. rostrata* ne peut comme fourrage sec, concurrencer les niébés, et fanes d'arachides vulgarisés au Sénégal (Roberge *et al.*, 1984). Toutefois, les résultats ne sont pas exhaustifs et on pourrait se poser les questions suivantes ; pour une légumineuse à forte croissance comme le *S. rostrata*, ne faudrait-il pas l'exploiter en vert plutôt qu'en foin ?

CONCLUSION GENERALE

L'étude de la symbiose fixatrice d'azote entre *Azorhizobium*, *Rhizobium* et *Sesbania rostrata* a permis d'aborder plusieurs aspects fondamentaux et appliqués.

Dans une première partie, nous avons tout d'abord étudié les partenaires bactériens. Nous avons caractérisé 36 souches isolées de nodules de tige et de racine de *Sesbania rostrata* et de nodules de racine de plusieurs espèces de *Sesbania*. Par des études de taxonomie numérique, de tests physiologiques de culture *in vitro* et de nodulation croisée, nous avons confirmé que ces souches se répartissent en deux groupes appartenant aux genres *Azorhizobium* (19 souches) et *Rhizobium* (17 souches).

Les souches d'*Azorhizobium* représentent les souches typiques de la nodulation caulinaire de *Sesbania rostrata*. Elles forment toutes des nodules effectifs sur les racines et sur les tiges de *S. rostrata*. Elles sont d'autre part les seules capables de fixer l'azote en culture pure et de croître aux dépens de cet azote moléculaire. Par contre aucune souche d'*Azorhizobium* n'est capable de fixer l'azote sur les racines des autres espèces de *Sesbania*.

Nous avons aussi montré que les souches qui nodulent effectivement les racines des espèces de *Sesbania* testées autres que *S. rostrata* appartiennent toutes au genre *Rhizobium*. Ces souches présentent une spécificité d'hôte beaucoup plus large que les *Azorhizobium*.

L'inoculation des souches de *Rhizobium* sur la tige de *S. rostrata* nous a permis de mettre en évidence quatre classes de souches de *Rhizobium*.

- les souches qui forment des nodules effectifs comme les *Azorhizobium*
- les souches qui forment des nodules peu effectifs
- les souches qui forment des nodules ineffectifs
- les souches qui ne forment aucun nodule.

L'utilisation des souches de *Rhizobium* appartenant à ces quatre groupes devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la spécificité de la nodulation de tige.

Dans une deuxième partie, notre intérêt s'est porté sur l'étude des modalités de l'infection et du développement des nodules racinaires de *S. rostrata*. Il était important de préciser si le mode d'infection caulinaire était différent de celui de la racine.

Nous avons observé un mode d'infection équivalent à celui décrit sur la tige (Tsien *et al.*, 1983 ; Duhoux, 1984). Comme sur la tige, l'infection des racines de *S. rostrata* se fait uniquement sur des sites privilégiés. Donc, contrairement à la majorité des légumineuses tempérées comme la luzerne ou le trèfle, chez *S. rostrata* on connaît à l'avance les sites où les nodules vont se former. Ceci constitue donc un avantage certain dans les observations cytologiques. Ce mode d'infection par pénétration intercellulaire des bactéries est suivie de la formation de poches intercellulaires d'infection puis de la formation de cordons d'infection à partir de ces poches. Ce processus d'infection est unique parmi les légumineuses connues. Il apparaît donc comme une caractéristique de l'espèce *Sesbania*.

Notre étude nous a aussi permis d'observer pour la première fois chez une légumineuse, un mode original de libération des bactéries des cordons d'infection dans le cytoplasme de la cellule hôte. Nous avons montré que des gouttelettes d'infection s'échappant de l'extrémité du cordon d'infection sans paroi, véhiculent dans un premier temps les bactéries au sein du cytoplasme végétal ; la libération des bactéries se fait ensuite non pas par endocytose, mode très répandu chez les légumineuses tempérées, mais par division sélective de la membrane limitant les gouttelettes d'infection en autant de compartiments qu'il y a de bactéries incluses. Nous avons d'autre part observé un type de développement nodulaire encore jamais décrit à ce jour : en effet les nodules racinaires de *S. rostrata* présentent des caractéristiques intermédiaires de développement propres à la fois aux nodules de type indéterminé comme chez les légumineuses tempérées et aux nodules de type déterminé observés chez la majorité des légumineuses tropicales. Ces observations cytologiques devraient être un outil précieux dans l'étude de certains mutants d'*Azorhizobium* et de *Rhizobium*. Notre étude a permis de connaître le "timing" de différentes étapes de l'infection et du développement des nodules racinaires de *S. rostrata*. On pourra ainsi voir à quel stade ces mutations provoquent des arrêts dans le programme de développement des nodules racinaires de *S. rostrata*.

Dans une troisième partie, nous avons étudié la fixation d'azote par *Sesbania rostrata*. Nous avons montré que la nodulation de tige chez *S. rostrata* permet à cette plante de produire trois fois plus de nodules que *Sesbania sesban*, autre espèce de *Sesbania* sans nodules de tige, mais dont le développement végétatif est tout à fait comparable à celui de *S. rostrata*. Nous avons montré, en utilisant la méthode isotopique N-15 que *S. rostrata* fixe environ 110 kg d'azote par hectare en 60 jours.

Pour la même période *S. sesban* fixe de 7 à 18 kg d'azote par hectare. Le potentiel fixateur d'azote élevé de *S. rostrata* semble donc être lié à l'abondance des nodules de tige qui donnent surtout dans les conditions inondées un avantage compétitif à la plante.

Les résultats de plusieurs années d'expérience au champ sur l'utilisation de *Sesbania rostrata* comme engrais vert en riziculture ont montré qu'il était possible de faire passer les rendements en riz de 1,7 t à 4t/ha dans les conditions de riziculture en milieu paysan.

Nos résultats confirmés dans différentes régions d'Afrique et d'Asie suggèrent que l'engrais vert *Sesbania rostrata* équivaut à un apport d'engrais azoté de 100 kg/ha et peut donc être recommandé pour la fertilisation des sols pauvres de nos rizières et remplacer les engrais chimiques dont le coût élevé est incompatible avec le revenu des paysans. Nous avons montré que la technologie de l'engrais vert peut être maîtrisée par les paysans sénégalais. Mais le *Sesbania rostrata* dont l'effet engrais vert ne fait plus aucun doute peut-il passer dans les pratiques culturales paysannes et être utilisé à grande échelle dans la riziculture africaine et en particulier sénégalaise ? Si l'introduction de cette biotechnologie en Asie connaît actuellement un succès prometteur, par contre en Afrique, le système rencontre un certain nombre de limites qui restent à améliorer.

En effet, l'exigence photopériodique de *S. rostrata* constitue une limitation importante à son emploi dans les régions équatoriales, où jours et nuits ont la même longueur. Une percée majeure serait donc d'améliorer la plante hôte afin d'obtenir des lignées plus tolérantes à la photopériode.

En outre, l'utilisation de *S. rostrata* est souvent limitée aux sols submergés en raison de sa très grande sensibilité aux nématodes appartenant plus particulièrement au genre *Meloidogyne*. Il serait nécessaire de rechercher des cultivars résistants à ce parasite.

En Asie les paysans ont l'habitude d'utiliser traditionnellement des engrais verts, en Afrique cette pratique n'a jamais existé. L'insertion de cette technologie en milieu africain pose donc des problèmes socioculturels.

Sur le plan fondamental, nous avons confirmé le potentiel fixateur d'azote très élevé de *S. rostrata*. L'obtention récente de mutants de la plante sans sites de nodulation devrait donc faciliter l'étude des gènes de la plante responsables de la nodulation de tige et ainsi permettre le transfert de la nodulation de tige à des espèces

mieux adaptées aux conditions sahéliennes utilisables soit en agriculture soit en foresterie.

BIBLIOGRAPHIE

1. Agarwal, A.K. and Keister, D.L. (1983). Physiology of Ex-Planta Nitrogen Activity in *Rhizobium japonicum*. Appl. Environ. Microbiol., 45 : 1592-1601.
2. Alazard, D.(1985). Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. Appl. Environ. Microbiol., 50 (3) : 732-734.
3. Alazard, D. et Duhoux, E. (1987). Nitrogen-fixing stem nodules on *Aeschynomene afraspera*. Biol. Fert. Soils, 4 : 61-66.
4. Alazard, D. and Duhoux, E. (1988a). Diversity of stem nodulation sites in *Aeschynomene* spp. Plant. Physiol., 132, pp. 123- 125.
5. Alazard, D. and Duhoux, E. (1988b). Stem nodule development on *Aeschynomene afraspera*. J. Exp. Bot. (sous presse).
6. Alexandre, K., Norel, F., Desnoues, N., Kush, A., Salzano, G., and Elmerich, C. (1988). Characterization of the fix ABC region of *Azorhizobium caulinodans* ORS 571 and identification of a new nitrogen fixation gene. Mol. Gen. Genet., 214 : 496-502.
7. Allen, O.N. and Allen, E.K. (1981). The leguminosae. A source book of characteristics use and nodulation. The University of Wisconsin press. pp. 812.
8. Allen, O.N. and Allen, E.K. (1940). Response of the peanut plant to inoculation with rhizobia with special reference to morphological development of the nodules. Bot-Gaz, 102 : 121-142.
9. Appleby, C. (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. In Briggs, W.R. (ed). Ann. Rev. Plant. Physiol., 35 ; 443-478.
10. Arora, N. (1954). Morphological development of the root and stem nodules of *Aeschynomene indica* L. Phytomorphology, 4 : 911-916.
11. Bauer, W.D. (1981). Infection of legumes by *Rhizobium*. Ann. Rev. Plant Physiol., 32 : 407-409.
12. Bauer, W.D., Bhuvanewari, T.V., Calvert, H.E., Law, I.J., Malik, N.A.S., Vesper, S.J. (1985). Recognition and infection by slow growing rhizobia. In Nitrogen Fixation Research Progress, ed., H.J. Evans, P.J. Bottomley, W.E. Newton, pp: 247-253. Amsterdam. Nijhoff.
13. Bedmar, E.J. and Olivares, J. (1979). Nitrogen fixation (acetylene reduction) by free-living *Rhizobium meliloti*. Curr. Microbiol., 2 : 11-13.
14. Bender, G.L., Plazinski, J. and Rolfe, B.G. (1986). A symbiotic acetylene reduction by a fast-growing cowpea *Rhizobium* strain with nitrogen structural genes located on a symbiotic plasmid. Environ. Microbiol., 51 : 868-871.
15. Bergersen, F.J. and Briggs, M.J. (1958). Studies of the bacterial component of soybean root nodules : cytology and organisation in the host tissue J. Gen. Microbiol., 19 : 482-490.

16. Bergersen, F.J. and Turner, G.L. (1980). Properties of terminal oxidase systems of bacteroids from root nodules of soybean and cowpea and of N₂-fixing bacteria grown in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.*, **118** : 235-252.
17. Bergman, K., Gulash-Hofee, M., Hovestadt, R.E., Larosiliere, R.C., Ronco, P.G. and Su, L. (1988). Physiology of behavioral mutants of *Rhizobium meliloti* : evidence for a dual chemotaxis pathway. *J. Bacteriol.*, **170** : 3249-3254.
18. Berhaut, J. (1971). Flore illustrée du Sénégal. Dicotyledones. Tome V. Legumineuses papillonacées. Clairafrique, Dakar.
19. Bhuvaneswari, T.V., Turgeon, B.G. and Bauer, W.D. (1980). Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Mer.) by *Rhizobium japonicum* : Localisation of infectible root cells. *Plant Physiol.*, **66** : 1027-1031.
20. Bhuvaneswari, T.V., Bhagwat, A.A., Bauer, W.D. (1981). Transient susceptibility of root cells in four common legumes to nodulation by rhizobia *Plant. Physiol.*, **68** : 1144-1149.
21. Bhuvaneswari, T.V. and Solheim, B. (1985). Root hair deformation in the white clover *Rhizobium trifolii* symbiosis. *Physiol. Plant.*, **63** : 25-34.
22. Bieberdorf, F.W. (1938). The cytology and histology of root nodules of some leguminosae. *J. Am. Soc. Agron.*, **30** : 375-389.
23. Boudet, G. et Rivière, R. (1968). Emploi pratique des analyses fourragères pour l'appréciation des paturages tropicaux. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays tropicaux*, **21** (2): 227-266.
24. Bremmer, J.M. (1977). Use of nitrogen-tracer techniques for research on nitrogen fixation. In *Biological Nitrogen Fixation in Farming systems of the Tropics* (A. Ayanaba and P.J. Dart, Eds), pp.: 335-352. Wiley, Clichester.
25. Brewbaker, J.P. and Glover, N. (1988). Woody species as green manure crops in rice based cropping systems. In *sustainable agriculture ; green manure in rice farming*, pp : 29-44. IRRI, Los Baños.
26. Broughton, W. (1978). Control of specificity in legume - *Rhizobium* interactions. *J. Appl. Bacteriol.*, **45** : 165-194.
27. Caetano-anolles, G., Crist-Estes, D.K. and Bauer, W.D. (1988). Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J. Bacteriol.*, **170** : 3166-3169.
28. Callaham, D.A. and Torrey, J.G. (1981). The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can J. Bot.*, **59** : 1647-1664.
29. Cervantes, E., Sharma, S.B., Maillet, F., Vasse, J., Truchet, G. and Rosenberg, C. (1989). The *Rhizobium meliloti* host range nod q genes encodes a proteine which shares homology with translation elongation and initiations factors. *M. Microbiol.*, **3** : 745-755.

30. Chandler, M.R. (1978). Some observations on the infection of *Arachis hypogea* L by *Rhizobium*. J. Exp. Bot., 29 : 749-755.
31. Chandler, M.R., Date, R.A. and Roughley, R.J. (1982). Infection and root nodule development in *Stylosanthes* species by *Rhizobium*. J. Exp. Bot., 33 : 47-57.
32. Chenost, M. (1972). Observations préliminaires sur la comparaison du potentiel digestif et de l'appétit des caprins et des ovins en zone tropicale et en zone tempérée. Ann. Zootechn., 21 (1) : 107-111.
33. Cornet, F., Otto, C., Rinaudo, G., Diem, H.G. and Dommergues, Y.R. (1985). Nitrogen fixation by *Acacia holosericea* grown in field- simulating conditions. Oecologia. Plantarum., 6 : 211-218.
34. Dart, P. (1977). Infection and development of leguminous nodules. In R.W.F. Hardy and W.S. Silver (ed.) A treatise on dinitrogen fixation, vol. III. John Wiley & Sons. New York, 367-372.
35. Davis, E.O., Evans, I.J. and Johnston, A.W.B. (1988). Identification of *nodx*, a gene that allows *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae strain to nodulate Afganistan peas. Mol. Gen. Genet., 212 : 513-535.
36. Dazzo, F.B. and Truchet, G. (1983). Interactions of lectins and their saccharide receptors in the *Rhizobium* - legume symbiosis. J. Memb. Biol., 73 : 1-16.
37. Dazzo, F.B., Truchet, G.L., Sherwood, J.E., Hrabak, E.M., Abe M. and Pankratz, S.H. (1984). Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii* clover symbiosis. Appl. Environ. Microbiol., 48 : 1140-1150.
38. Dazzo, F.B., Hollings worth, R.L., Sherwood, J.E., Abe, M., Hrabak, E.M. et al. (1985). Recognition and infection of clover root hairs by *Rhizobium trifollii*. In Nitrogen Fixation Research Progress, eds : H.J. Evans, P.J. Bottomley, W.E. Newton, pp : 239-245. Amsterdam. Nijhoff.
39. Debelle, F., Rosenberg, C., Vasse, J., Maillet, F., Martinez, E., Denarie, J. and Truchet, G. (1986). Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (nod) genetic loci of *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol., 168 : 1075- 1086.
40. Debelle, F. and Sharma, S.B. (1986). Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* RCR 2011 genes involved in host specificity of nodulation. Nucl. Acids Res., 14 : 7453-7472.
41. de Bruijn, F.J., Pawlowski, K., Ratet, P., Hilgert, V., Wong, C.H., Meyer, Z.A.H. and Schell, J. (1988). Molecular genetics of nitrogen fixation by *Azorhizobium caulinodans* ORS 571, the diazotrophic stem-nodulation symbiont of *Sesbania rostrata*. In Nitrogen Fixation : Hundred years after. Bothe, H., de Bruijn, F.J. and Newton, W.E. (eds). Stuttgart : Gustav. Fischer, pp. 351-355.

42. de Bruijn, F.J. (1989). The unusual symbiosis between the diazotrophic stem nodulating bacterium *Azorhizobium caulinodans* ORS 571 and its host, the tropical legume *Sesbania rostrata*. In plant. Microbe interactions. Vol. III. Nester, E. and Kosuge, T., (eds). New York : Mc Graw Hill, in press.
43. Delauney, A. and Verma, D.P.S. (1988). Cloned nodulin genes for symbiotic nitrogen fixation. Plant. Mol. Biol. Rep., 6 : 279-285.
44. Delwiche, C.C. and Steyn, P.L. (1970). Nitrogen isotope fractionation in soils and microbial reactions. Environmental Sci. Technol., 4 : 929-935.
45. Deneffe, P., Kush, A., Norel, F., Paquelin, A., Elmerich, C. (1987). Biochemical and genetic analysis of the nifHDKE region of *Rhizobium* ORS 571. Mol. Gen. Genetic., 207 : 280-287.
46. Diack, M. (1987). Multiplication de *Sesbania rostrata* et son effet sur la production de riz. In : Les arbres fixateurs d'azote. L'amélioration biologique de la fertilité des sols. ORSTOM (ed), 343- 355.
47. Diaz, C.L., Melchers, L.S., Hooykaas, P.J.J., Lugtenberg, B.J.J. and Kijne, J.W. (1989). Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Nature, 338 : 579-591.
48. Dilworth, M.J. (1966). Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. Biochim, Biophys. Acta, 127 : 285-294.
49. Dixon, R.O.D. (1964). The structure of infection threads, bacteria and bacteroids in pea and clover root nodules. Arch. Microbiol., 48 : 166-178.
50. Djordjevic, M.A., Redmond, J.W., Batley, M., Rolfe, B.G. (1988). Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress nod gene expression in *Rhizobium trifolii*. EMBO J. , 6 1173-1179.
51. Dreyfus, B.L. and Dommergues, Y.R. (1981). Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stems of the tropical legume *Sesbania rostrata*. FEMS Microbiol. Lett., 10 : 313-317.
52. Dreyfus, B.L. (1982). La symbiose entre *Rhizobium* et *Sesbania rostrata*, légumineuse à nodules caulinaires. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Paris VII.
53. Dreyfus, B.L., Elmerich, C. and Dommergues, Y.R. (1983). Free living *Rhizobium* strain able to grow on N₂ as the sole nitrogen source. Applied. Environmental Microbiology, 45 : 711-713.
54. Dreyfus, B.L., Alazard, D. and Dommergues Y.R. (1984). Stem- nodulating rhizobia. In : Current Perspectives of Microbiol Ecology (M.G. Klug and C.E. Reddy, eds), pp : 161-169 ; American Society of Microbiology, Washington, DC.
55. Dreyfus, B.L., Rinaudo, G. and Dommergues, Y.R. (1985). Observation on the use of *Sesbania rostrata* as green manure in paddy fields. Mircen Journal, 1 : 111-121.

56. Dreyfus, B.L., Garcia, J.L. and Gillis, M. (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. International Journal of Systematic Bacteriology, **38** : 89-98.
57. Dudley, M.E., Jacobs, T.W., Long, S.R. (1987). Microscopy studies of cell divisions induced in alfalfa roots by *Rhizobium meliloti*. Planta, **171** : 289-301.
58. Duhoux, E. et Dreyfus, B.L. (1982). Nature des sites d'infection par le *Rhizobium* de la tige de la légumineuse *Sesbania rostrata* Brem. C.R. Hebd. Séances. Acad. Sci., **294** : 407-411.
59. Duhoux, E. (1984). Ontogénèse des nodules caulinaires de *Sesbania rostrata* (légumineuse). Can. J. Bot., **62** : 982-994.
60. Dylan, T., Lelpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanofsky, M., Nester, E., Helsinki, D.R. and Ditta, G. (1986). *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. PROC. Natl. Acad. Sci. USA, **83** : 4403-4407.
61. Earl, C.D., Ronson, C.W. and Ausubel, F.M. (1987). Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti* fix A, fix B, fix C and fix X genes. J. Bacteriol., **169** : 1127-1136.
62. Elmerich, C., Dreyfus, B.L., Reysset, G. and Aubert, J.P. (1982) Genetic analysis of nitrogen fixation in a tropical fast-growing *Rhizobium*. EMBO J., **1** : 499-503.
63. Faria, S.M., Hay, G.T. and Sprent, J.I. (1988). Entry of rhizobia into roots of *Mimosa scabrella* Benthham occurs between epidermal cells. J. Gen. Microbiol., **134** : 2291-2296.
64. Fiedler, R. and Proksch, G. (1975). The determination of nitrogen - 15 by emission and mass spectrometry in biochemical analysis : a review. Analytica Chemica Acta, **78** : 1-62.
65. Finan, T.M., Hirsch, A.M., Leigh, J.A., Johansen, E., Kuldau, G.A., Deegam, S., Walker, G.C. and Signer, E.R. (1985). Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. Cell, **40** : 869-877.
66. Finan, T.M., Kunkel, B., Devos, G. and Signer, E.R. (1986). Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharid and thiamine synthesis genes. J. Bact., **167** : 66-72.
67. Fried, M. and Broeshart, H. (1975). An independent measurement of the amount of nitrogen fixed by a legume crop. Plant and Soil, **43** : 707-711.
68. Fried, M. and Middelboe, V. (1977). Measurement of amount of nitrogen fixed by a legume. Plant and Soil, **47** : 713-715.
69. Fried, M., Danso, S.K. and Zapata, F. (1983). The methodology of measurement of N₂ fixation by non legumes as inferred from field experiments with legumes. Canadian Journal of Microbiology, **29** : 1053-1062.

70. Gauthier, D., Diem, H.G., Dommergues, Y.R. and Ganry, F. (1985). Assessment of N₂ fixation by *Casuarina equisetifolia* inoculated with *Frankia* ORS 021001 using ¹⁵N methods. *Soil. Biol. Biochem.*, **17** : 375-379.
71. Gibbins, A.M. and Gregory, K.F. (1972). Relatedness among *Rhizobium* and *Agrobacterium* species determined by three methods of nucleic acid hybridization. *J. Bacteriol.*, **111** : 129- 141.
72. Gibson, A.H. (1963). In : Manual for the practical study of root nodules bacteria. IBP Handbook n°15. Blackwell Sci. Publications. London.
73. Goethals, K., Gao, M., Tomekpe, P., Van Montagu, M. and Holsters, M. (1989). Common nodABC genes in nod locus 1 of *Azorhizobium caulinodans* : nucleotide sequence and plant-inductible expression. *Mol. Gen. Genet.*, (sous presse).
74. Gibson, A.H. (1977). The influence of the environment and managerial practices on the legume - *Rhizobium* symbiosis. In : "A treatise on dinitrogen fixation. " Section IV Agronomy & Ecology. Hardy RWF & Gibson AH (eds). **11** : 394-438.
75. Gourret, J.P. and Arias, H.F. (1974). Etude ultrastructurale et cytochimique de la différenciation des bactéroïdes de *Rhizobium trifolli* Dangeard dans les nodules de *Trifolium repens* L. *Can. J. Microbiol.*, **20** : 1169-1181.
76. Gourret, J.P. (1975). Une étude ultrastructurale comparative des mycoplasmes phytopathogènes des bactéries des nodules racinaires et des plastes. Thèse d'Etat C. 207-59, Rennes.
77. Govers, F. (1987). Nodulin expression in the developing pea root nodule. Ph. D. Thesis, Wageningen University.
78. Guiraud, G. (1984). Contribution du marquage isotopique à l'évaluation des transferts d'azote entre les compartiments organiques et minéraux dans les systèmes sol-plante. Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences Naturelles, Université Pierre et Marie Curie.
79. Gunning, B.E.S. (1970). *J. Cell. Sci.*, **7**, 307.
80. Hanus, F.J., Albrecht, S.L., Zablutowicz, R.M., Elmerich, D.W., Russel, S.A. and Evans, H.J. (1981). Yield and N content of soybean as influence by *Rhizobium japonicum* inoculants possessing the hydrogenase characteristic. *Agron. J.*, **73** : 368-372.
81. Hardy, R.W.F., Burns, R.C. et Holston, R.D. (1973). Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of N₂ fixation. *Soil. Biol. Biochem.*, **5** : 47-81.
82. Horvath, B., Kondorosi, E., Johnson, M., Schmidt, J., Torok, I., Györgypal, Z., Barabas, I., Wieneke, V., Schell, J. and Kondorosi, A. (1986). Organization structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa. *Cell*, **46** : 335-343.
83. Huber, J.D., Parker, F., Odland, G.F. (1968). A basin fushin and alkalised methylene blue rapid stain for epoxy embedded tissue. *Stain. Technol.*, **43** : 83-87.

84. Jarvis, B.D.W., Gillis, M. and Deley, J. (1986). Intra and intergeneric similarities between ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species and some related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36** : 129-138.
85. Jordan, D.C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* buchanam 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **32** : 136-139.
86. Jordan, D.C. (1984). family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In : N.R. Krieg and J.G. Holt (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol.1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. pp. 234-244.
87. Kato, G., Maruyama, Y., Nakamura, M. (1981). Involvement of lectins in *Rhizobium* pea symbiosis. *Plant Cell. Physiol.*, **22** : 759-771.
88. Keister, D.L. (1975). Acetylene reduction by pure cultures of rhizobia. *J. Bacteriol.*, **123** : 1265-1268.
89. Kidby, D.K. and Goodchild, D.G. (1966). Host influence on the ultrastructure of root nodules of *Lupinus luteus* and *ornithopus sativus*. *J. Gen. Microbiol.*, **45** : 147-152.
90. Kijne, J.W. (1975). The fine structure of pea root nodules vascular changes after endocytotic host cell infection by *Rhizobium leguminosarum*. *Physiol. Plant. Pathol.*, **5** : 75-79.
91. Kijne, J.W., Smit, G., Diaz, G.L., Lugtenberg, B.J.J. (1986). Attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. In : Lugtenberg, B (ed) *Recogniton in microbe-plant symbiotic and pathogenic interactions*, pp: 101-112. Springer Verlag. Heidelberg, Berlin.
92. Kohl, D.H., Shearer, G. and Harper, J.E. (1980). estimates of N₂ fixation based on differences in the natural abundance of ¹⁵N in nodulating and non nodulating isolines of soybeans. *Plant. Physiol.*, **66** : 61-65.
93. Kurz, W.G.M. and Larue, T.A. (1975). Nitrogenase activity in rhizobia in absence of plant host. *Nature*, **256** : 407-408.
94. Ladha, J.K., Watanabe, I. and Saono, S. (1988). Nitrogen fixation by leguminous green manure and practices for its enhancement in tropical lowland rice. In *sustainable agriculture ; green manure in rice farming*, pp: 165-183. IRRI, Los Baños.
95. Lancelle, S.A. and Torrey, J.G. (1984). Early development of *Rhizobium* induced root nodules of *Parasponia rigida*. I. Infection and early nodule initiation.
96. Lancelle, S.A. and Torrey, J.G. (1985). Early development of *Rhizobium* induced root nodules of *Parasponia rigida*. II. Nodule morphogenesis and symbiotic development. *Can. J. Bot.*, **63** : 25- 35.
97. Larue, T.A. and Patterson, T.G. (1981). How much nitrogen do legumes fix ? *Advances in Agronomy*, **34** : 15-38.

98. Legg, J.O. and Sloger, C. (1975). A tracer method for determining symbiotic nitrogen fixation in field studies. In Proceeding of the Second International Conference on Stable Isotopes (E.R. Klein and P.D. Klein, Eds), pp : 661-666. Oak Brook, Illinois.
99. Leigh, J.A., Signer, E.R. and Walker, G.C. (1985). Exopolysaccharide deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodule. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82 : 6231-6235.
100. Leigh, J.A., Reed, J.W., Hanks, J.F., Hirsch, A.M. and Walker, G.C. (1987). *Rhizobium meliloti* mutants that fail to succinylate their calcofluor-binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. Cell, 51 : 579-587.
101. Libbenga, K.R.F., Iren, V., Bogers, R.J., Lamers, S. (1973). The role of hormones and gradients in the initiation of cortex proliferation and nodule formation in *Pisum sativum* L. Planta, 114 : 129-139.
102. Libbenga, K.R.F. and Harkes, P.A.A. (1973). Initial proliferation of cortical cells in the formation of root nodules in *Pisum sativum* L. Planta, 114 : 17-28.
103. Long, S.R. (1989). *Rhizobium*-legume nodulation : life together in the underground. Cell, 56 : 203-214.
104. Lovelace, T.E. and Colwell, R.R. (1968). A multipoint inoculation for petri-dishes. Appl. Microbiol., 18 : 944-945.
105. Mariotti, A., Mariotti, F. et Amarger, N. (1983). Utilisation du traçage isotopique naturel ^{15}N pour la mesure du taux d'azote fixé symbiotiquement par les légumineuses. Physiol. Vég., 21 (2) : 279-291.
106. Milford, R., and Minson, D.J. (1966). The feeding value of tropical pastures. Tropical Pastures, P: 106-114, Eds. W. Davis and C.L. Skidmore. London.
107. Mohapatra, S.S., Bender, G.L., Shine, J., Rolfe, B.G. and Gresshoff, P.M. (1983). In vitro expression of nitrogenase activity in *Parasponia Rhizobium* strain ANU 289. Arch. Microbiol., 134 : 12-16.
108. Napoli, C.A., Dazzo, F.B. and Hubbel, D.H. (1975). Ultrastructure of infection and "Common antigen" relationships in *Aeschynomene* (Abstract). In 5th Aust. Legume Nodulation Conf., Queensland.
109. Ndoye, I. (1988). Utilisation de *Sesbania rostrata* comme engrais vert et fourrage. In : *Sesbania rostrata* ; Recherches Fondamentales et Applications à l'Agriculture ORSTOM/CTA (sous presse).
110. Ndoye, I. and Dreyfus, B.L. (1988). N_2 fixation by *Sesbania rostrata* and *Sesbania sesban* estimated using ^{15}N and total N difference methods. Soil. Biol. Biochem., 20 : 209-213.
111. Newcomb, W., Spippell, D. and Peterson, R.L. (1979). The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. Can. J. Bot., 57 : 2603-2616.

112. Newcomb, W. (1981). Nodule morphogenesis and differentiation. In *Biology of the Rhizobiaceae*. pp : 247-298. Edited by K.L. Giles and A.G. Atherley. Academic Press, New York.
113. Newcomb, W. and MC Intyre, L. (1981). Development of root nodules of mungbean (*Vigna radiata*) : A reinvestigation of endocytosis. *Can. J. Bot.*, **59** : 2478-2499.
114. Newcomb, E.H., Tandon, S.R., Kowal, R.R. (1985). Ultrastructural specialization for ureide production in uninfected cells of soybean root nodules. *Protoplasma*, **125** : 1-12.
115. Norel, F., Desnoues, N. and Elmerich, C. (1985). Characterization of DNA sequences homologous to *Klebsiella pneumoniae* nifH, D, K and E in the tropical *Rhizobium* ORS 571. *Mol. Gen. Genet.*, **199** : 352-356.
116. Nutman, P.S. (1956). The influence of the legume in root nodule symbiosis. *Biol. Rev.*, **31** : 109-151.
117. Nutman, P.S. (1981). Hereditary host factors affecting nodulation and nitrogen fixation. In Gibson, A.H. and Newton W.E. (eds) *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. Elsevier, North Holland, pp: 194- 204.
118. Olson, J.E. and Rolfe, B.G. (1985). Stem and root nodulation of the tropical legume *Sesbania rostrata* by *Rhizobium* strain ORS 571 and WE7. *J. Plant. Physiol.*, **121** : 199-210.
119. Pariselle, A. (1987). Comportement du nématode *Hirschmanniella oryzae* (Van Breda de Haan) dans les racines de la légumineuse *Sesbania rostrata* Brem. *Revue Nématol.*, **10** (3) : 333-336.
- 120 Pariselle, A. and Rinaudo, G. (1988). Etude des interactions entre *Sesbania rostrata*, *Hirschmanniella oryzae* et les rendements du riz. *Revue Nématol.*, **11** (1) : 83-87.
121. Pate, J.S. (1977). Functional biology of dinitrogen fixation by legumes. In : Hardy RWF, Silver W S (eds). *A treatise on dinitrogen fixation vol. 3*. John Wileys, New York, pp: 473.
122. Patnaik, S. and Murty, M.V. (1979). Sources of nitrogen for rice production. In : *Nitrogen and Rice*, International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines, pp: 25-43.
123. Pawlowski, K., Ratet, P., Schell, J., de Bruijn, F.J. (1987). Cloning and characterization of *nifA* and *ntrC* genes of the stem-nodulating bacterium ORS 571, the nitrogen-fixing symbiont of *Sesbania rostrata* : regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes in the free-living versus symbiotic state. *Mol. Gen. Genet.*, **206** : 207-219.
124. Pladys, D., and Rigaud, J. (1988). Lysis of bacteroids in vitro and during the senescence in *Phaseolus vulgaris* nodules. *Plant. Physiol., Biochem.*, **26** (2) : 179-186.

125. Pueppke, S.G. (1983). *Rhizobium* infection threads in root hairs of *Glycine max* (L) Merr., *Glycine soja* Sieb & Zucc., and *Vigna unguiculata* (L) Walp. Can. J. Microbiol., **29** : 69-76.
126. Quispel, A. (1974). The biology of nitrogen fixation. North Holland. Publishing Co, Amsterdam & New York.
127. Quittet, E. (1969). Agriculture III. Elevage. Paris, Dunod.
128. Rango Rao, V. (1977). Effect of root temperature on the infection process of *Lotus* and *Stylosanthes*. J. exp. Bot., **28** : 241-259.
129. Ratet, P., Pawlowski, K., Z.A.H., Schell, J. and de Bruijn, F.J. (1988). Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azorhizobium caulinodans* ORS 571 in culture and in planta. J. Plant. Physiol., **132** : 405-411.
130. Rennie, R.J. and Rennie, D.A. (1983). Techniques for quantifying N₂ fixation in association with non legumes under field and greenhouse conditions. Can. J., **29** : 1022-1035.
131. Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol., Tokyo, **17** : 208-213.
132. Rinaudo, G. (1970). Fixation biologique de l'azote dans trois types de sols de rizières de Côte d'Ivoire. Thèse de Docteur Ingénieur, Université de Montpellier
133. Rinaudo, G., Dreyfus, B.L. and Dommergues, Y.R. (1982). Influence of *Sesbania rostrata* green manure on the nitrogen content of rice crop and soil. Soil. Biol. Biochem., **15** 111-113.
134. Rinaudo, G. , Dreyfus, B. and Dommergues, Y.R. (1982). *Sesbania rostrata* as a green manure for rice in West Africa. In : B.N.F. Technology for Tropical Agriculture, P.H. Graham and S.C. Harris (Eds), 441-445.
135. Rinaudo, G., Moudiongui, A. (1985). Fixation d'azote par *Sesbania rostrata* : son utilisation comme engrais vert. Bull. rech. Agron. Gembloux., **20** : 833-849.
136. Rivière, R. (1978). Manuel d'alimentation des ruminants domestiques en milieu tropical (2ème édition). Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux.
137. Roberge, G. et Faye, A. (1983). Note technique sur le niébé fourrager. ISRA/LNERV/CNRA, Bambey. 7p.
138. Roberge, G., Friot, D., Guerin, H., Mbaye, N. (1984). Note sur la valeur alimentaire des fanes de légumineuses cultivées au Sénégal. L.N.E.R.V., ISRA. Ref. n°003/Physio/CF.
139. Roberge, G. et Perrot, C. (1987). La recherche sur l'utilisation fourrager du niébé au Sénégal. Séminaire de Ngadoure. 16-20/11/87, 9p.

140. Robertson, J.G., Lyttleton, P., Bullivan, S. and Grayston, G.F. (1978). Membranes in lupin root nodules. The role of golgi bodies in the biogenesis of infection thread and peribacteroids membranes. *J. Cell. Sci.*, **30** : 129-149.
141. Roger, P.A. and Watanabe, I. (1986). Technologies for utilizing biological nitrogen fixation in wetland rice : potentialities, current usage, and limiting factors. *Fertil. rev.*, **9** : 39-77.
142. Rolfe, B. and Gresshoff, P. (1988). Genetic analysis of legume nodule initiation. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, **39** : 297-319.
143. Schaede, R. (1940). Die Knollchen der adventive wasserwurzeln von *Neptunia oleacea* und ihre Bakterien symbiose. *Planta*, **31** : 1-21.
144. Sindhu, S.S. and Dardawal, K.R. (1986). Ex planta nitrogenase induction and uptake hydrogenase in *Rhizobium* sp. (Cowpea miscellany). *Soil. Biol. Biochem.*, **18** : 291-295.
145. Singh, N.T. (1984). Green manures as source of nutrients in rice production. In : Organic matter and rice. The International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines, 217-228.
146. Skerman, P.J. (1977). Tropical forage legumes. FAO, Plant Production and Protection. Series n°2. Technical Editor : Fernando Riveros.
147. Sloger, C., Bezdicek, D., Milberg, R. and Boonferd, N. (1975). In : Nitrogen fixation by free-living microorganisms. Stewart WDP (ed), University Press London, Vol. 6, pp: 271-284.
148. Smit, G., Kijne, J.W., Lutenberg, B.J.J. (1987) Involvement of both cellulose fibrils and a Ca^{++} dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs tips. *J. Bacteriol.*, **169** : 4294-4301.
149. Stam, H., Verseveld, H.W. and Stouthamer, A.H. (1983). Derepression of nitrogenase in chemostat cultures of the fast growing *Rhizobium leguminosarum*. *Arch. Microbiol.*, **135** : 199-204.
150. Talbot, H.J., Kenworthy, W.J. and Legg, J.O. (1982). Field comparison of nitrogen-15 and difference methods of measuring nitrogen fixation. *Agronomy Journal*, **74** : 799-804.
151. Thummler, F. and Verma, D.P.S. (1987). Nodulin 100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free hemes in nodules. *J. Biol. Chem.*, **262** : 14730-14736.
152. t' Mannetje, Z. (1967). A re-examination of the genus *Rhizobium* and related genera using numerical analysis. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.*, **33** : 477-491.
153. Trinick, M.J. (1979). Structure of nitrogen fixing nodules formed by *Rhizobium* on roots of *Parasponia andersonii*. *Planck. Can. J. Microbiol.*, **25** : 565-578.

154. Trinick, M.J. (1980). Relationships among the fast growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *J. Appl. Bacteriol.*, **49** : 39-53.
155. Truchet, G. (1973). Contribution à l'étude des nodosités produites sur le pois (*Pisum sativum*) par le *Rhizobium leguminosarum*. Etude infrastructurale et localisation enzymatique. Notion de symbiose. Thèse de spécialité. C.U. Luminy - Université d'Aix Marseille II. France.
156. Truchet, G. et Coulomb, P. (1973). Mise en évidence et évolution du système phytolysosomal dans les cellules des différentes zones de nodules racinaires de pois (*Pisum sativum* L.). Notion d'hétérophagie. *J. Ultr. Res.*, **43**, 36.
157. Truchet, G. (1976). Processus séquentiel du développement des nodules symbiotiques de légumineuses. Thèse de Doctorat d'Etat.
158. Truchet, G. (1978). Sur l'état diploïde des cellules du méristème des nodules racinaires de légumineuses. *Ann. Sci. Nat., Bot. Biol., Veg.*, **19** : 338.
159. Truchet, G., Michel, M. and Denarie, J. (1980). Sequential analysis of the organogenesis of lucerne (*Medicago sativa*) root nodules using symbiotically defective mutants of *Rhizobium meliloti*. *Differentiation*, **16** : 163-172.
160. Truchet, G., Rosenberg, C., Vasse, J., Camut, S. and Denarie, J. (1984). Transfer of *Rhizobium meliloti* pSym genes into *Agrobacterium tumefaciens*. Host specific nodulation by atypical infection. *J. Bacteriol.*, **157** : 134-142.
161. Truchet, G., Debelle, F., Vasse, J., Terzaghi, B., Garnerone, A.M., Rosenberg, C., Batut, C., Maillet, F., Denarie, J. (1985). Identification of a *Rhizobium meliloti* pSym 2011 region controlling the host specificity of root hair curling and nodulation. *J. Bacteriol.*, **164** : 1200-1210.
162. Truchet, G., Camut, S., de Billy, F., Odorico, R. and Vasse, J. (1989). The *Rhizobium* legume symbiosis. Two methods to discriminate between nodules and other root derived structures. *Protoplasma*, **149** : 82-88.
163. Tsien, H.C., Dreyfus, B.L. and Schmidt, E.L. (1983). Initial stages in the morphogenesis of nitrogen fixing stem nodules of *Sesbania rostrata*. *J. bact.*, 888-897.
164. Turgeon, B.G. and Bauer, W.D. (1982). Early events in the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. Time course and cytology of the initial infection process. *Can. J. Bot.*, **60** : 152-161.
165. Turgeon, B. and Bauer, W.D. (1985). Ultrastructure of infection thread development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Planta*, **163** : 328-349.
166. Turgey, S.V., Walker, E.L. and Coruzzi, G. M. (1987). Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. *EMBO. J.*, **6**: 1-9.

167. Turner, G.L. and Bergersen, F.G. (1980). Evaluating methods for the determination of ^{15}N in nitrogen fixation studies. In current perspectives in nitrogen fixation. Proceedings of the 4th International Symposium of N_2 -fixation, Canberra, Australia, A.H. Gibson and N.E. Newton, eds., The Australian Academy of Science, 482.
168. Turner, G.L. and Gibson, A.H. (1980). Methods for evaluating biological nitrogen fixation. F.J. Bergersen, ed., John Wiley & Son Ltd.
169. Urban, J.E., Davis, L.C. and Brown, S.J. (1986). *Rhizobium trifolii* 0403 is capable of growth in the absence of combined nitrogen. Appl. Environ. Microbiol., **52**: 1060-1067.
170. Vachhani, M.V. and Murty, K.S. (1964). Green manuring for rice. Indian Council of Agric. Res. Rep. Ser., n°17, 50 p.
171. Vandenbosch, K.A., Dalenoel, K., Kaneko, Y. and Newcomb, E.H. (1985). Nodule initiation elicited by non infective mutants of *Rhizobium phaseoli*. J. Bacteriol., **162** : 950-959.
172. Vandenbosch, K.A. and Newcomb, E.H. (1986). Immunogold localization of nodule - specific uricase in developing soybean root nodules. Planta., **167** : 425-436.
173. Van den Eede, G., Dreyfus, B., Goethals, K., Van Montagu, M. and Holsters, M. (1987). Identification and cloning of nodulation genes from the stem nodulating bacterium ORS 571. Mol. Gen. Genet., **206** : 291-299.
174. Vasse, J.M. and Truchet, G. (1984). The *Rhizobium* legume symbiosis : observations of root infection by bright-field microscopy after staining with methylene blue. Planta, **161** : 487-489.
175. Vaugh, C.K. and Elmore, D.C. (1985). Ultrastructural characterization of nitrogen-fixing stem nodules on *Aeschynomene indica*. Cytobios., **42** : 49-62.
176. Verma, D.P.S., Kazazian, V., Zogbi, V. and Bal, A.K. (1978). Isolation and characterization of the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. J. Cell. Biol., **78** : 919-936.
177. Verma, D.P.S. and Long, S.R. (1983). The molecular biology of *Rhizobium* - legume symbiosis. In : Jeon K. (ed) Intracellular symbiosis, pp: 211-245. Academic Press, New York.
178. Vincent, J.M. (1970). A manual for the practical study of root nodule bacteria. Balckwell, Oxford.
179. Vincent, J.M. (1980). Factors controlling the legume - *Rhizobium* symbiosis. In : Newton, W.E., Orme - Johnson (eds). Nitrogen fixation, pp : 103-129. Univ. Park. Press. Baltimore.

180. Vose, P.B., Ruschel, A.P., Victoria, R.L., Saito, S.M.T. and Matsui, E. (1982). ^{15}N as a tool in biological nitrogen fixation research. In : Biological Nitrogen Fixation Technological for Tropical Agriculture (P.H. Graham and S.C. Harris, eds), pp: 575-592. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Calif.
181. Wagner, G.H. and Zapata, F. (1982). Field evaluation of reference crops in the study of nitrogen fixation by legumes using isotope techniques. *Agronomy Journal*, 74 : 607-612.
182. Watanabe, I. and App. A. (1979). Research needs for management of nitrogen fixation in flooded rice crop system. In : Nitrogen and Rice, International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines, pp: 485-490.
183. Weber, C.R. (1966). Nodulating and non-nodulating soybean isolines. I. Agronomic and chemical attributes. *Agron. J.*, 58 : 43-46.
184. Werner, D. and Morschel, E. (1978). Differentiation of nodules of *Glycine max*. Ultrastructural studies plant cells and bacteroids. *Planta*, 141 : 169-177.
185. William, W.A., Jones, M.B. and Delwiche, C.C. (1977). N_2 fixation measurement by total N differences and ^{15}N A values in lysimeters. *Agronomy Journal*, 69 : 1023-1024.
186. Witty, J.F. (1983). Estimating N_2 fixation in the field using ^{15}N labelled fertilizer: some problems and solutions. *Soil. Biol. Biochem.*, 15 : 631-639.
187. Witty, J.F. (1984). The use of slow release ^{15}N fertilizer formulations in measuring N_2 fixation by isotope dilution. *Soil. Biol. Biochem.*, 16 : 657-661.
188. Yao, P.Y., Vincent, J.M. (1976). Factors responsible for the curling and branching of clover root hairs by *Rhizobium*. *Plant and Soil*, 45 : 1-16.
189. Yatazawa, M. and Yoshida, S. (1979). Stem nodules in *Aeschynomene indica* and their capacity of nitrogen fixation. *Plant. Physiol.*, 45 : 293-295.
190. Yatazawa, M., Yoshida, S. and Maeda, M. (1984). Fine structure of root nodules of *Aeschynomene indica* L. *Soil. Sci. Plant. Nutr.*, 30 (3) : 405-416.
191. Zaat, S.A.J., Van Brussel, A.A.N., Tak, T., Pees, E., Lugtenberg, B.J.J.(1987). Flavonoids induce *Rhizobium leguminosarum* to produce nod D A B C gene - related factors that cause thick, short roots and root hair responses on Common vetch. *J. Bacteriol.*, 169 : 3388-3391.

PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES

PLANCHE 1

Fig. 2A et 2B *Sesbania rostrata*

Fig. 2A. *Sesbania rostrata*, la plante entière. T = tige ; S.R. = système racinaire ;
Flèches = nodules de tige

Fig. 2B. Agrandissement du système racinaire de *Sesbania rostrata*. R.S. = ra-
cines secondaires ; têtes de flèches = nodules de racine.

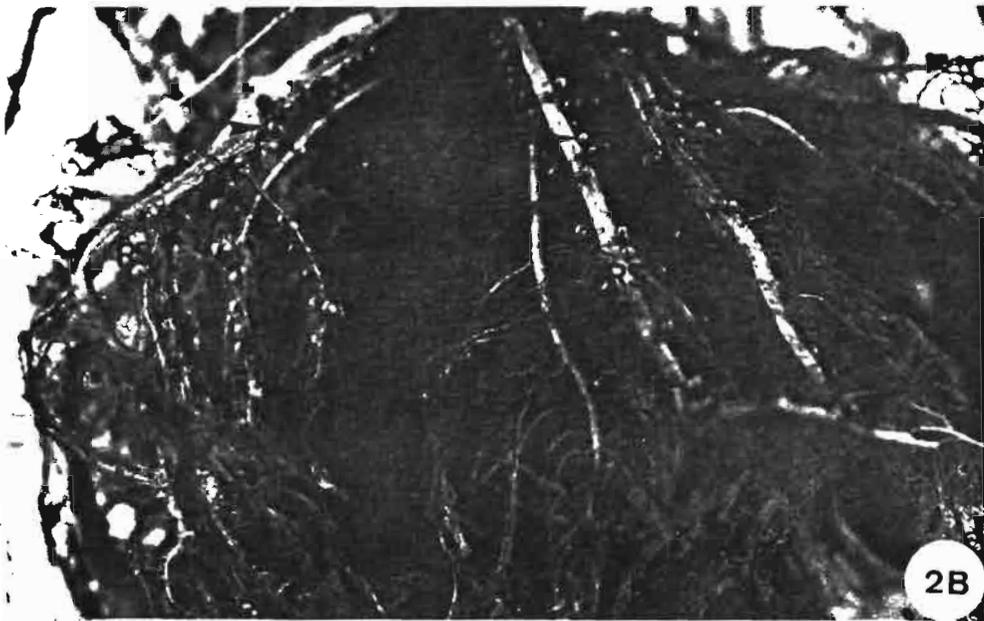
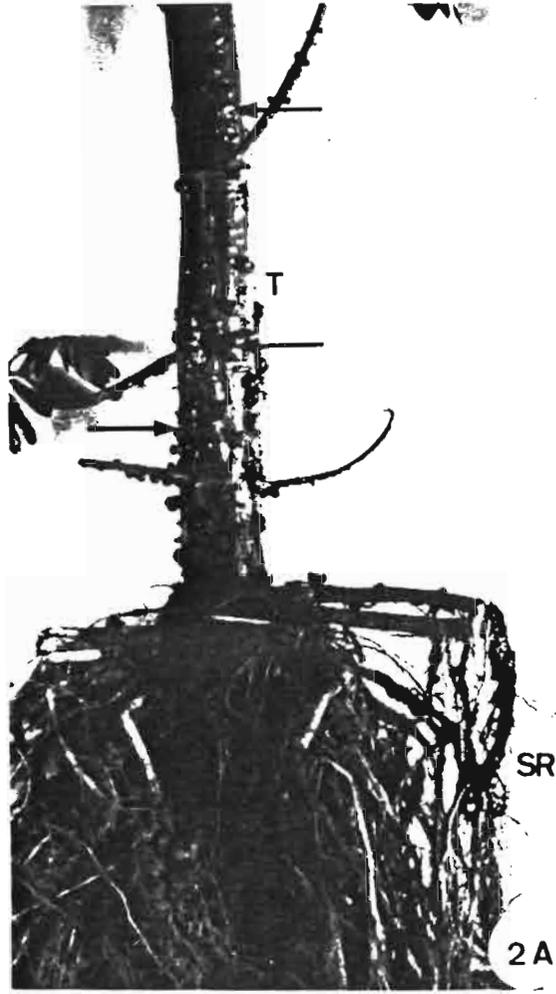


PLANCHE 2

Fig. 3, 4 et 5 : Racines de *S. rostrata* éclaircies à l'hypochlorite de sodium avant (Fig. 3) ou après dissection du cortex de la racine principale (Fig. 4 et 5). Les renflements (astérisques) à la base des racines latérales représentent des ébauches nodulaires 24 h (Fig. 4) et 48 h (Fig. 5) après l'inoculation.

Fig. 4 et 5 : Les flèches localisent les poils absorbants du fragment de la radicelle enfouie dans le cortex de la racine principale.

(Grandissements : Fig. 3 : x 100 ; Fig. 4 : x 80 ; Fig. 5 : x 80).

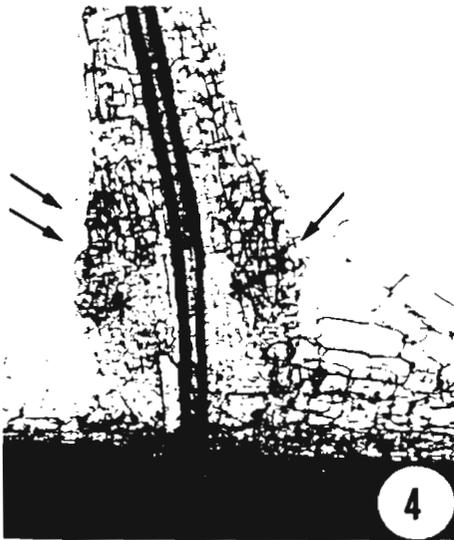
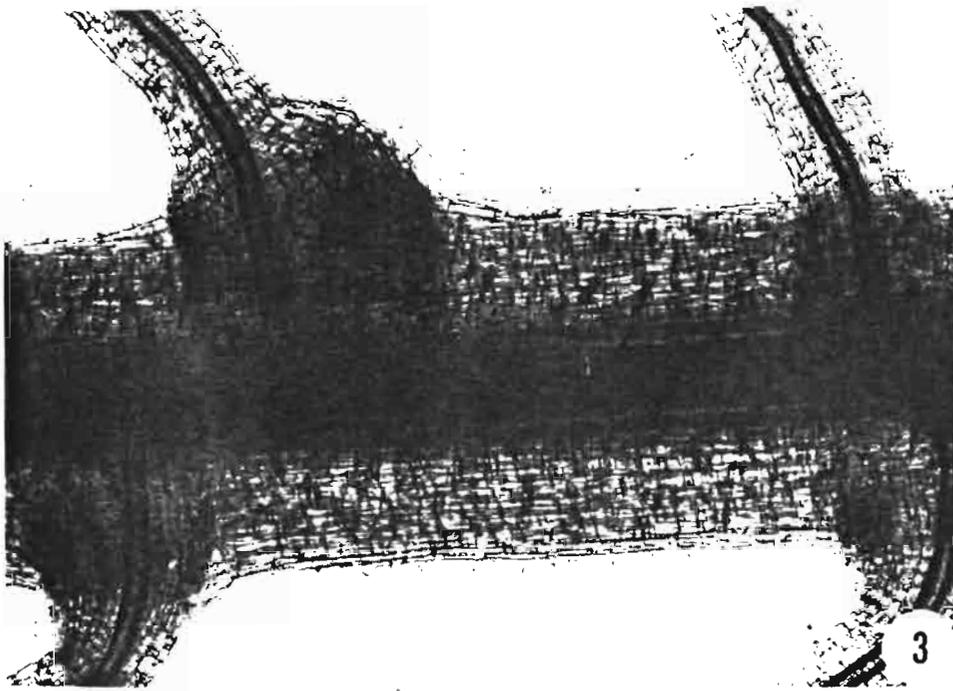


PLANCHE 3

Fig. 6, 7 et 8. Infection de la racine de *S. rostrata* par la souche d'*Azorhizobium caulinodans* ORS 571.

Fig. 6. Infection à la base d'un poil absorbant (astérique) en contact avec une autre cellule hors du plan de mise au point (flèche) ; tête de flèche : filament d'infection.

Fig. 7. Filament d'infection (flèche) au niveau des cellules épidermiques racinaires.

Fig. 8. Relation entre une poche intercellulaire d'infection (flèche) et un filament d'infection (têtes de flèches).

[coloration par le bleu de méthylène des racines entières sans traitement par l'hypochlorite de sodium (fig. 6 et 8) ou après éclaircissement (fig. 7).]

(Grandissements : Fig. 6 : x 370 ; Fig. 7 : x 340 ; Fig. 8 : x 160).



PLANCHE 4

Fig. 9, 10 et 11 : Infection intercellulaire de *S. rostrata* par *Azorhizobium caulino-*
dans ORS 571 (16 h après inoculation)

Infection intercellulaire (flèche), poches intercellulaires d'infection (doubles
flèches) et filaments d'infection (têtes de flèches).

(Coupes semi-fines ; coloration par la fuchsine basique et le bleu de méthylène).

(Grandissements : Fig. 9 : x 450 ; Fig. 10 : x 500 ; Fig. 11 : x 500).

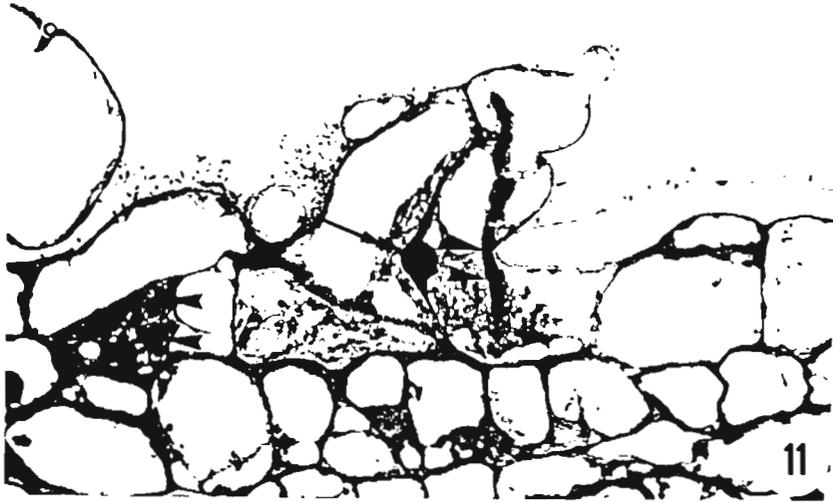
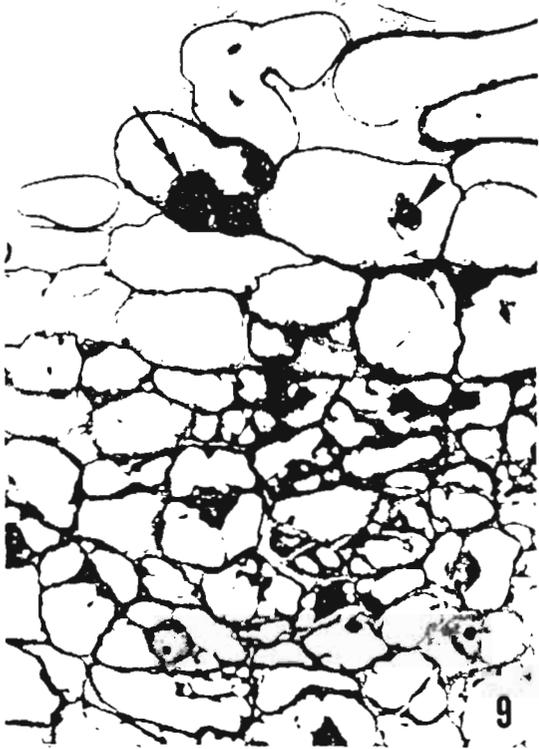


PLANCHE 5

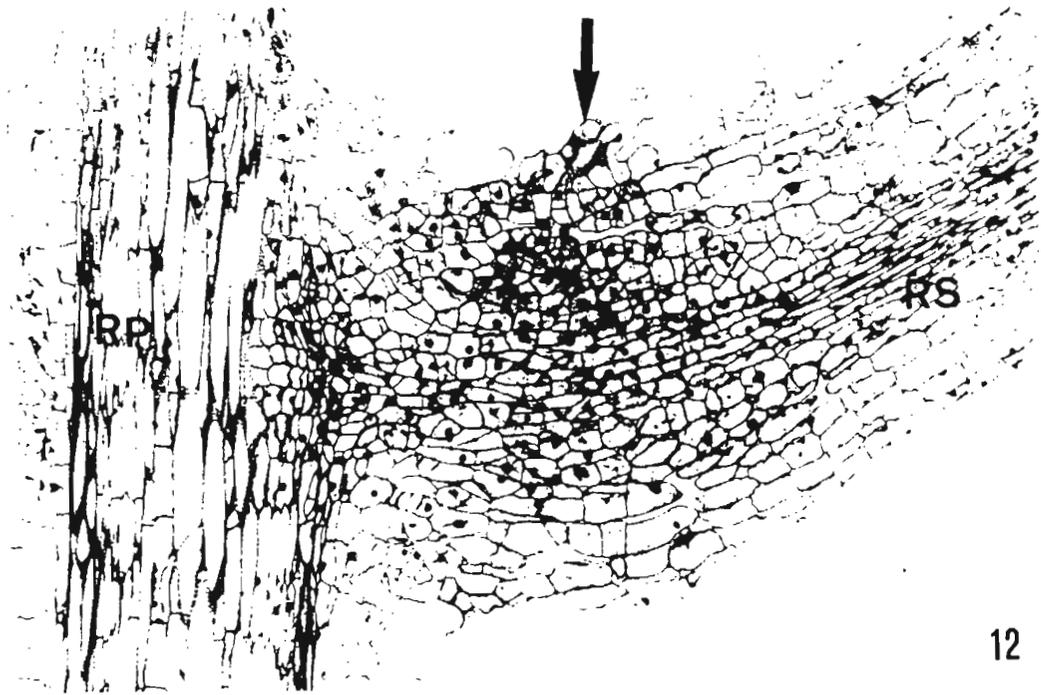
Fig. 12 et 13 : Initiation d'un méristème nodulaire par dédifférenciation des cellules corticales de la racine (16 h après l'inoculation).

Fig. 12 : Vue générale montrant le début de la dédifférenciation corticale. RP : racine principale ; RS : racine secondaire.

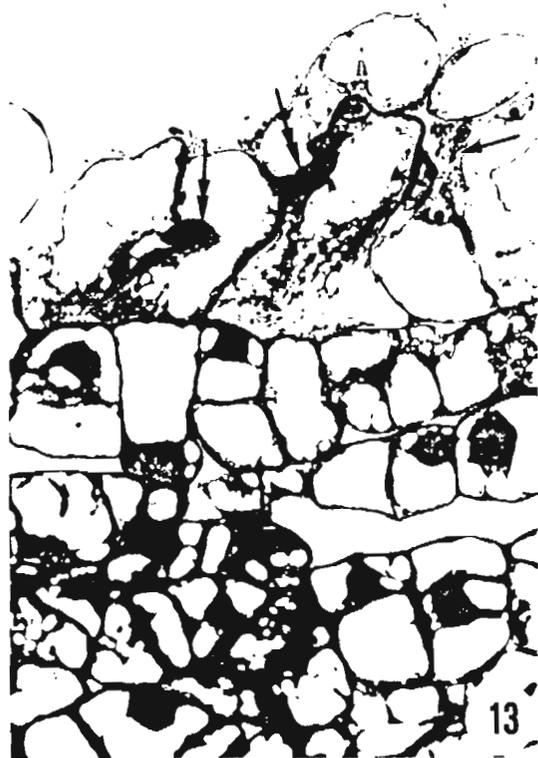
Fig.13 : Agrandissement de la zone infectée localisée par une large flèche sur la figure 12. Infection intercellulaire (flèche) et poches intercellulaires d'infection (doubles flèches) sont visibles.

(Coupes semi-fines, coloration par la fuchsine basique et le bleu de méthylène).

(Grandissements : Fig. 12 : x 120 ; Fig. 13 : x 450).



12



13

PLANCHE 6

Fig. 14, 15, 16 et 17 : Développement nodulaire (24 h à 36 h après l'inoculation).

Fig. 14 et 15 : Organisation en corbeille du méristème (flèches) autour de la trace infectieuse centrale (large flèche).

Noter le début de la différenciation des traces vasculaires du nodule (flèches courbes) sur la figure 15

Fig. 16 et 17 : Agrandissement des goulets d'infection localisés par de larges flèches sur les figures 14 et 15.

Les poches d'infection intercellulaires (flèches) et filaments d'infection (têtes de flèches) sont visibles.

(Coupes semi-fines ; coloration par la fuchsine basique et le bleu de méthylène).

(Grandissements : Fig. 14 : x 100 ; Fig. 15 : x 80 ; Fig. 16 : x 280 ; Fig. 17 : x 280).

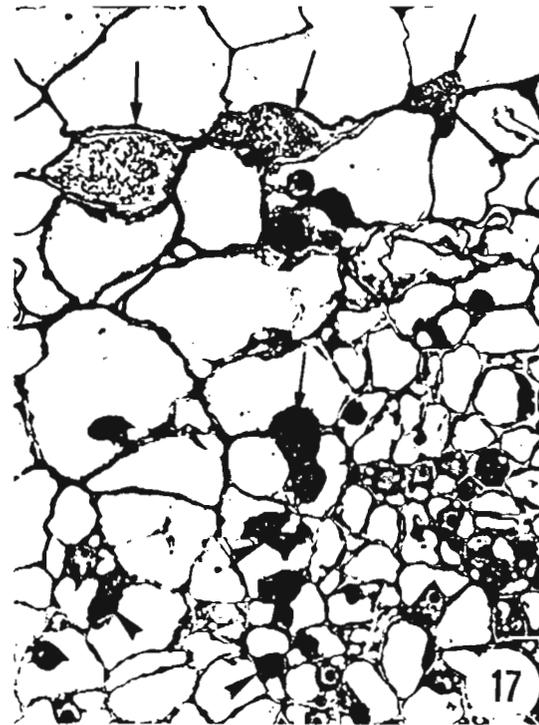
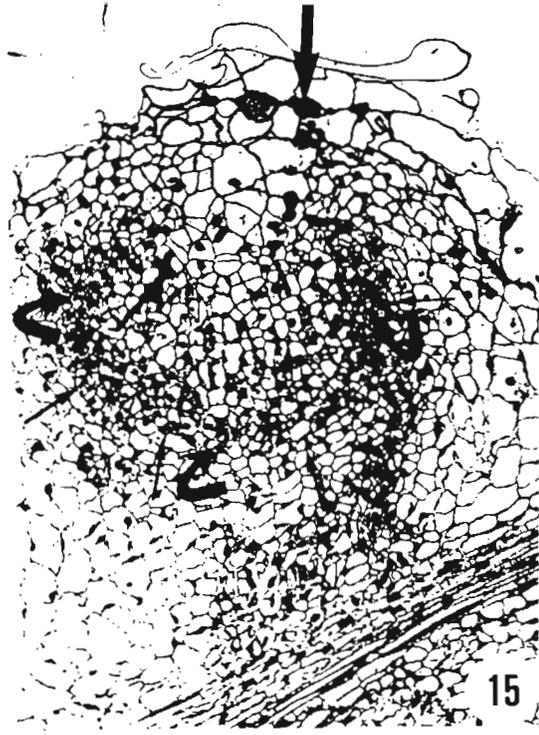
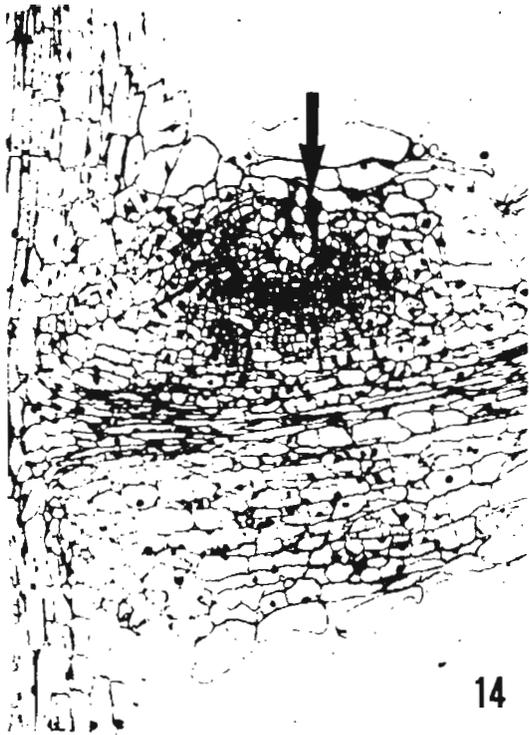


PLANCHE 7

Fig. 18, 19, 20 et 21: Développement nodulaire (48 à 72 h après l'inoculation).

Fig. 18: Goulet central d'infection (large flèche) et tissu central envahi (astérisque).

Fig. 19: Agrandissement de la figure 18. Goulet central et filaments d'infection dans le tissu central.

Fig. 20: Essaimage du réseau infectieux.

Fig. 21: Différenciation centrifuge. Les cellules méristématiques périphériques (flèches) et les traces vasculaires tout autour du nodule (têtes de flèches) sont visibles.

Fig. 18 et 20: Sections de 100 μm , éclaircies par l'hypochlorite de sodium et colorées par le bleu de méthylène ; Fig. 21: coupe semi-fine, coloration par la fuschine basique et le bleu de méthylène).

(Grandissements : Fig. 18 : x 60 ; Fig. 19 : x 120 ; Fig. 20 : x 300 ; Fig. 21 : x 70).

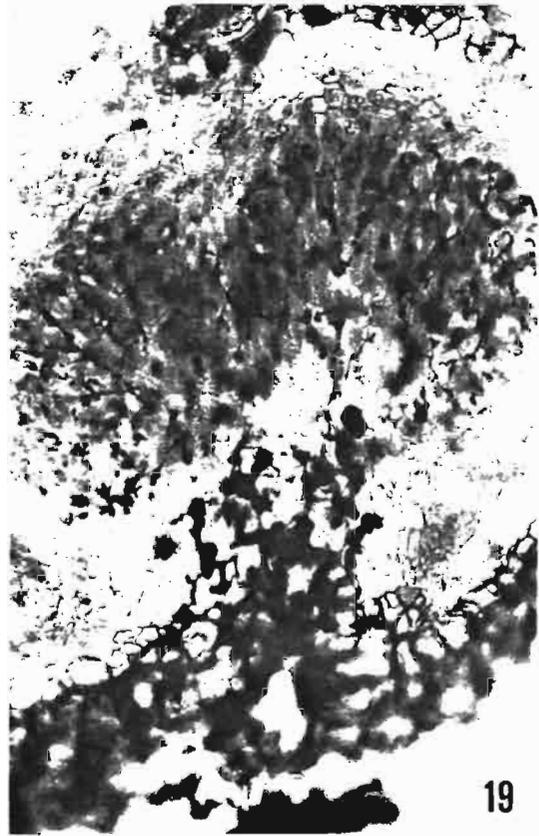


PLANCHE 8

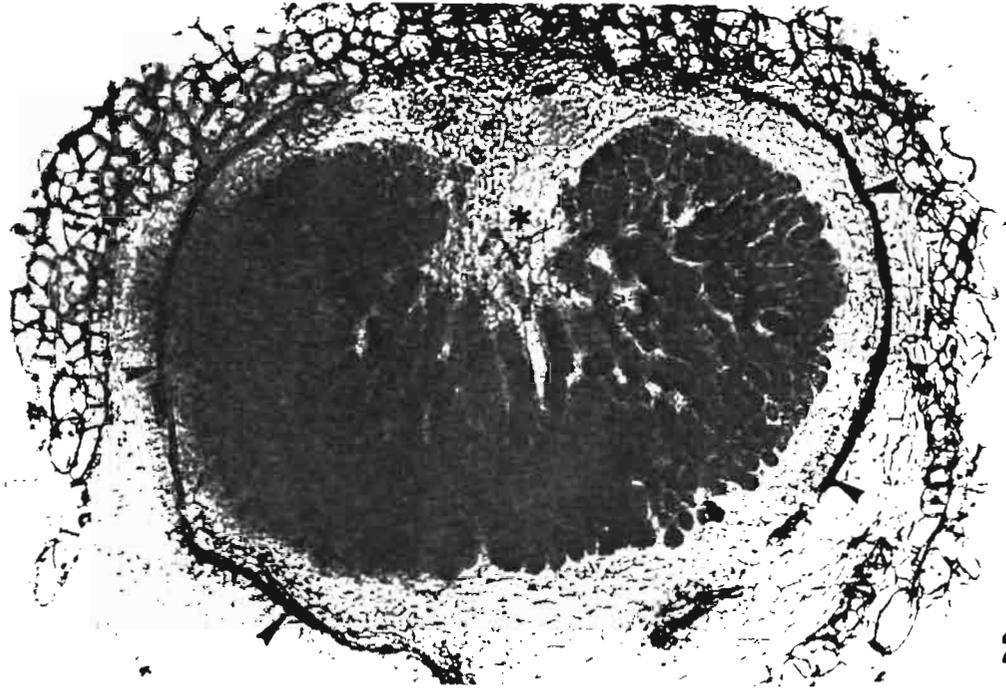
Fig. 23 et 24 : Développement nodulaire (5 à 7 jours après l'inoculation)

Fig. 23 : Goulet central d'infection (astérique) et différenciation en corbeille.
Têtes de flèches : Traces vasculaires du nodule.

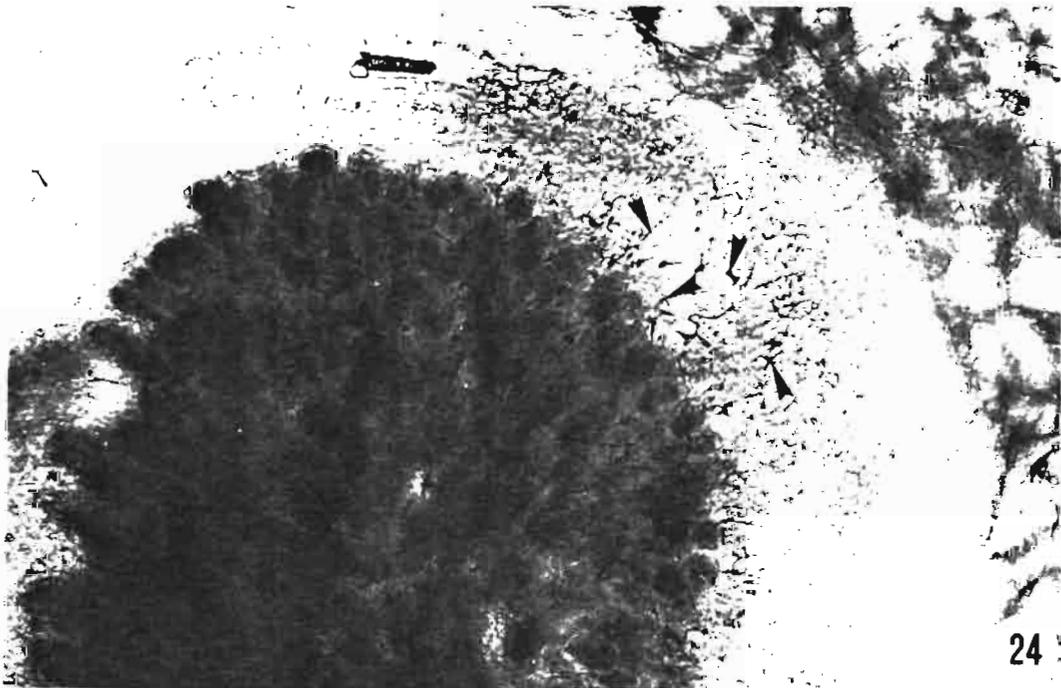
Fig. 24 : Zone méristématique périphérique d'un nodule montrant la présence de filaments d'infection (têtes de flèches).

(Sections de 100 μm , éclaircies et colorées par le bleu de méthylène).

(Grandissements : Fig. 23 : x 100 ; Fig. 24 : x 200).



23



24

PLANCHE 9

Fig. 25 et 26 : Nodule mature (14 jours après l'inoculation).

Fig. 25 : Vue générale montrant la dépression centrale (astérique) et le tissu central en corbeille.

Fig. 26 : Agrandissement de la figure 25.

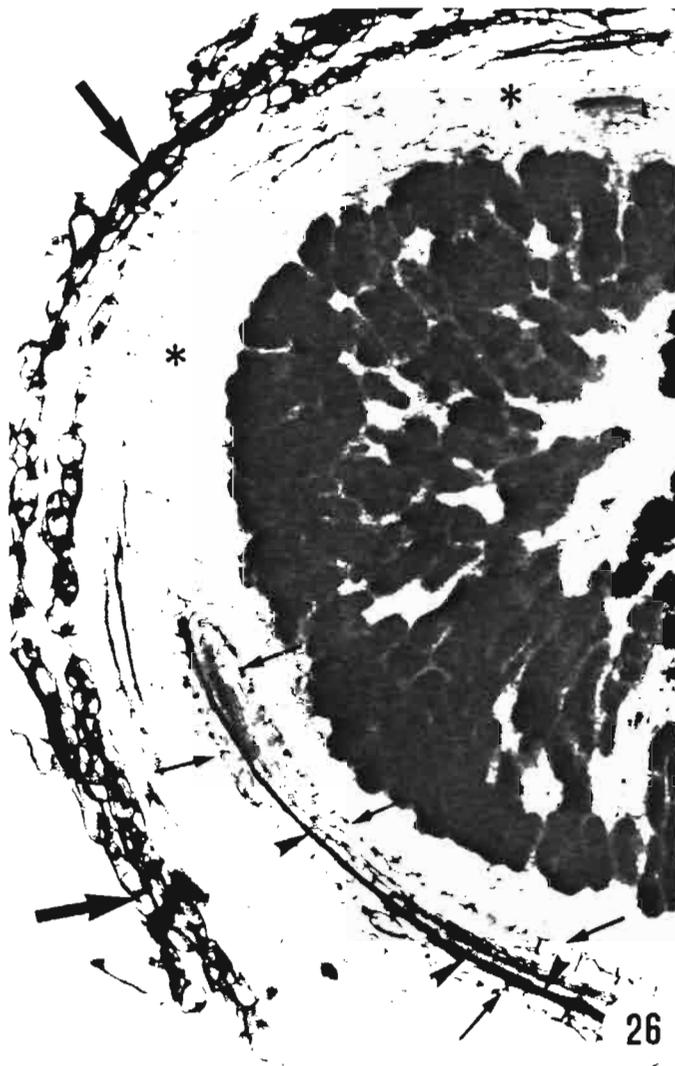
Tissus périphériques du nodule. Têtes de flèches : traces vasculaires ; flèches : endoderme vasculaire ; astérique : parenchyme nodulaire ; larges flèches : endoderme nodulaire périphérique.

(Sections de 100 μm éclaircies et colorées par le bleu de méthylène).

(Grandissements : Fig. 25 : x 100 ; Fig. 26 : x 250).



25



26

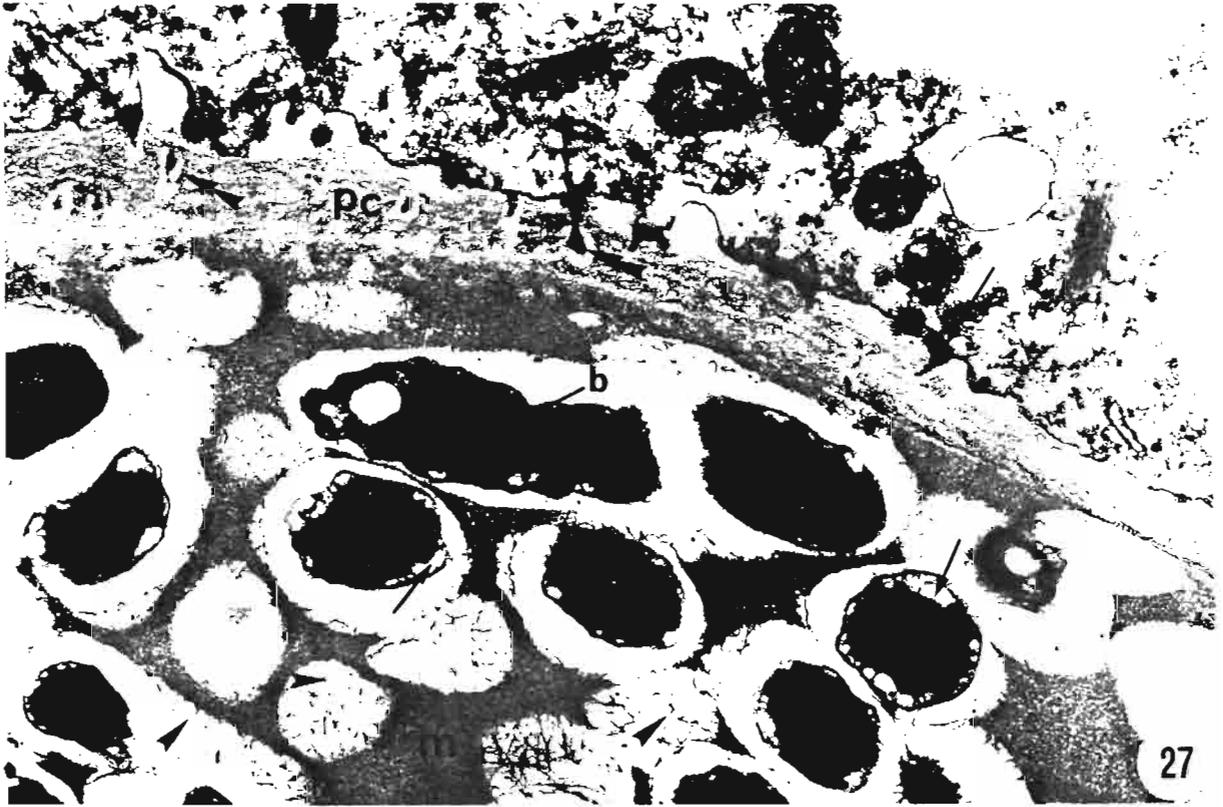
PLANCHE 10

Fig. 27 : Poche intercellulaire d'infection. Les bactéries (b) sont incluses dans un mucilage (m) de nature fibrillaire (têtes de flèches).

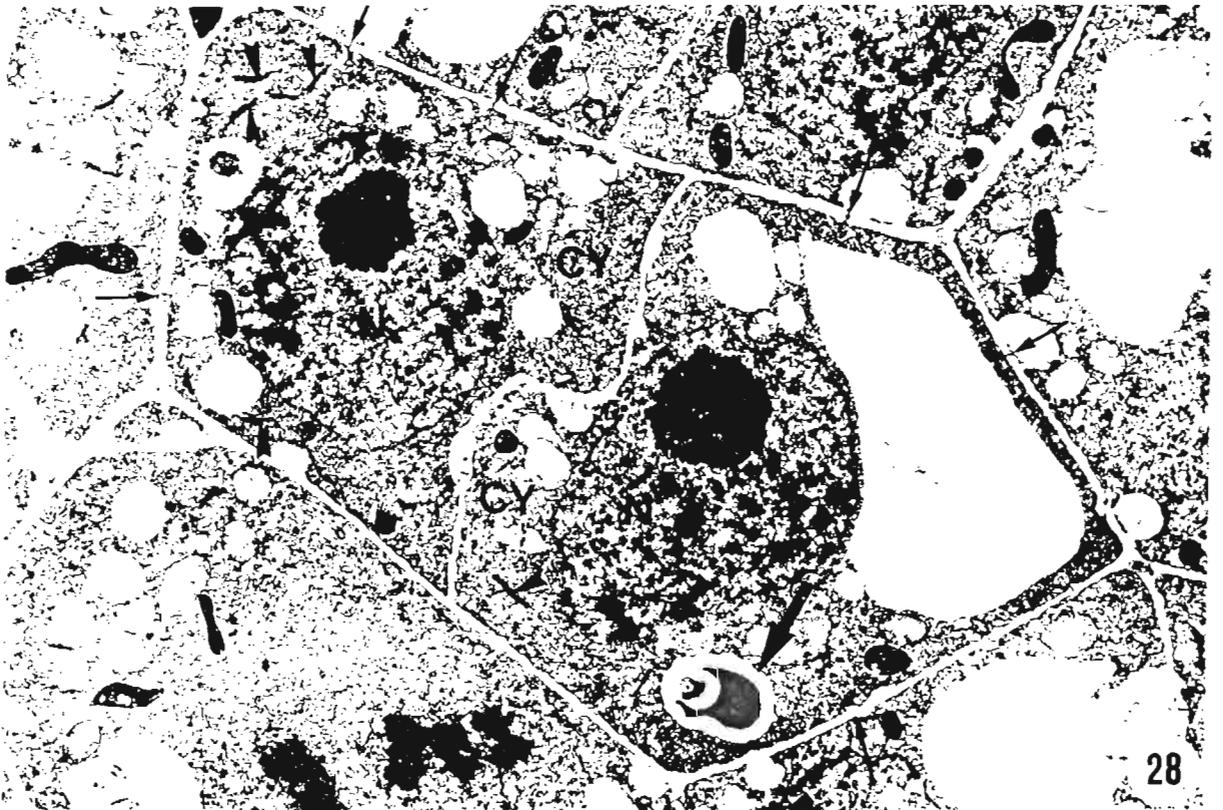
Noter dans les bactéries, l'espace périplasmique important (flèches), et dans la cellule végétale, la fusion de gouttelettes électroniquement denses dans le plasma-lemme (doubles flèches) ; ces gouttelettes se retrouvent ensuite dans le matériel cellulosique de la paroi cellulaire (Pc) (doubles têtes de flèches)

Fig. 28 : Cellules méristématiques issues de la dédifférenciation du cortex végétal. CY = cytoplasme ; N = Noyau ; flèches = plasmodesmes ; têtes de flèches = dictyosomes ; large flèche = filament d'infection.

(Grandissements : Fig. 27 : x 29000 ; Fig. 28 : x 6000).



27



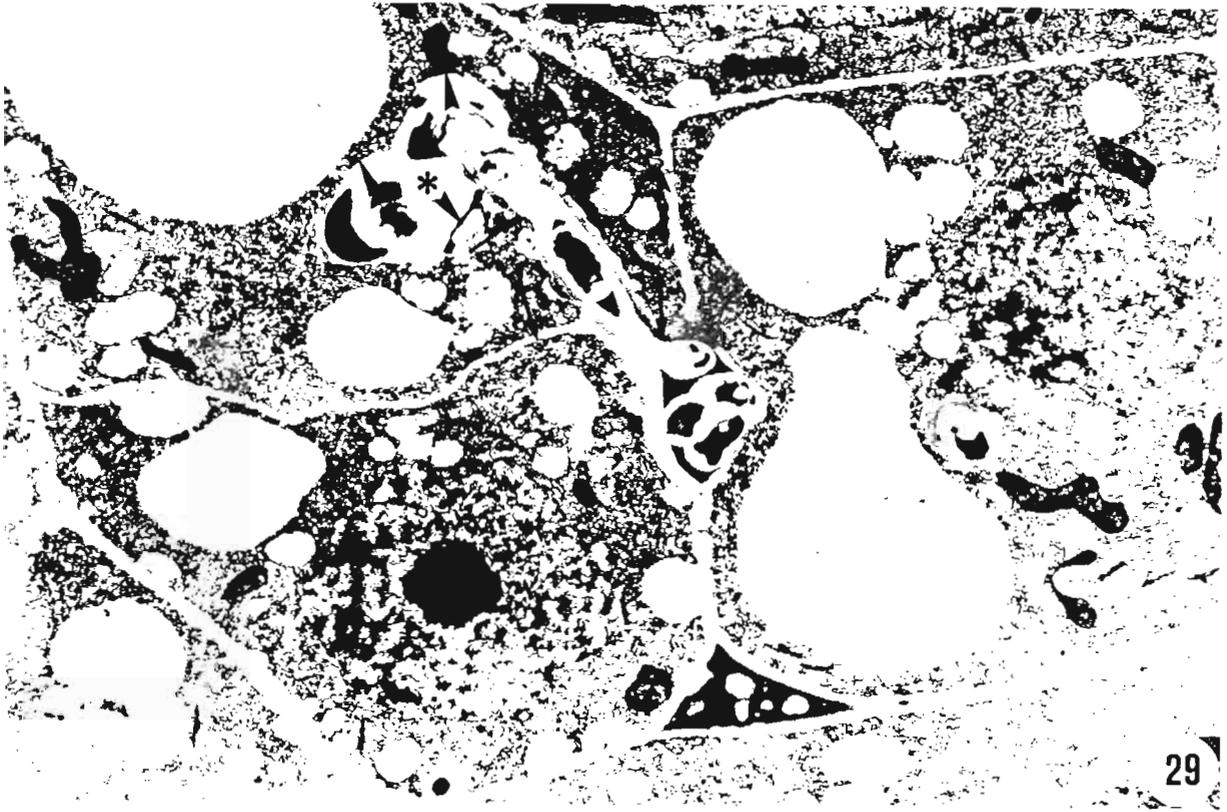
28

PLANCHE 11

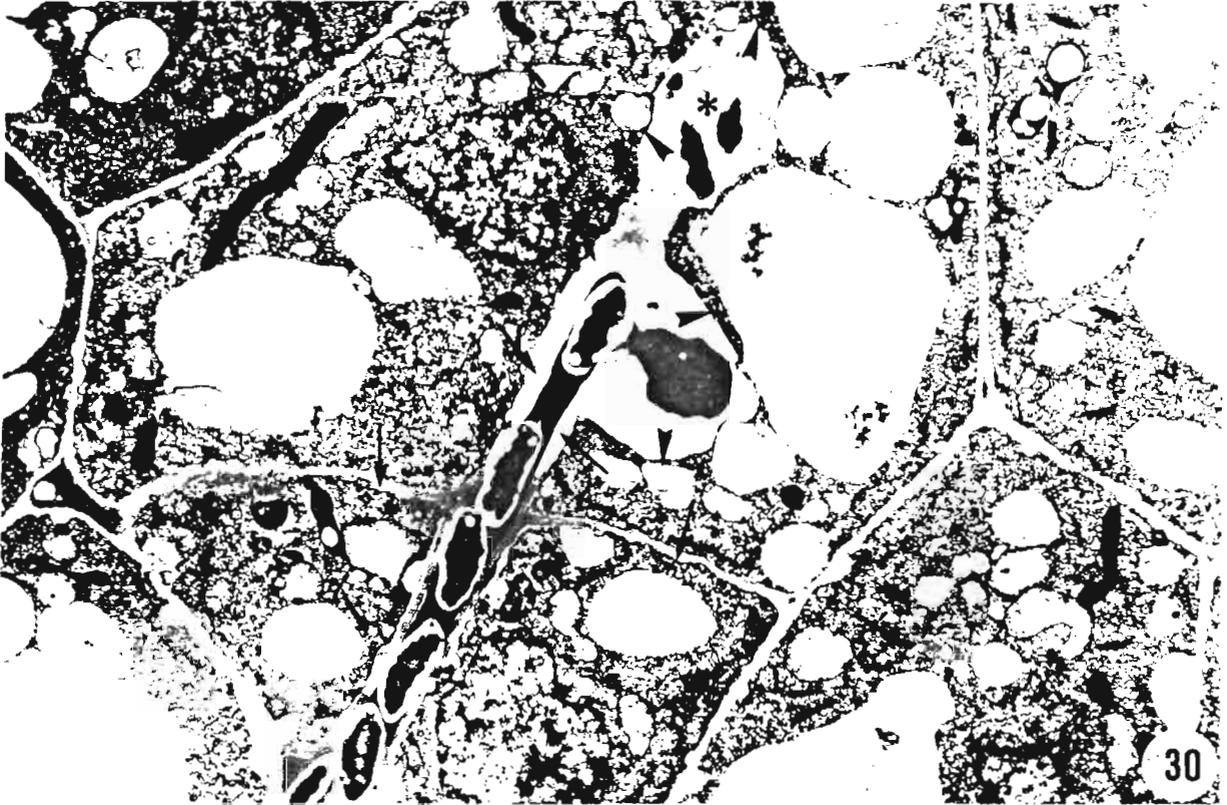
Fig. 29 et 30 : Filaments d'infection. Noter la continuité entre la paroi cellulaire et la paroi des filaments d'infection (flèches) et l'absence de gaine cellulosique à l'extrémité des filaments d'infection (astérisques) - b = bactérie ; m = mucilage.

Les têtes de flèches localisent le plasmalemme de la cellule hôte.

(Grandissements : Fig. 29 : x 7000 ; Fig. 30 : x 7000).



29



30

PLANCHE 12

Fig. 31, 32, 33 et 34 : Gouttelettes d'infection dont certaines montrent une partie limitée par une paroi (larges flèches) et une autre libre de toute entrave (astérique). Les flèches et les têtes de flèches montrent les vestiges du mucilage (Fig. 31 - 34) et de la paroi du filament d'infection (Fig. 32).

V = vacuoles.

(Grandissements : Fig. 31 : x 9000 ; Fig. 32 : x 12000 ; Fig. 33 x 6000 ; Fig. 34 : x 5000).

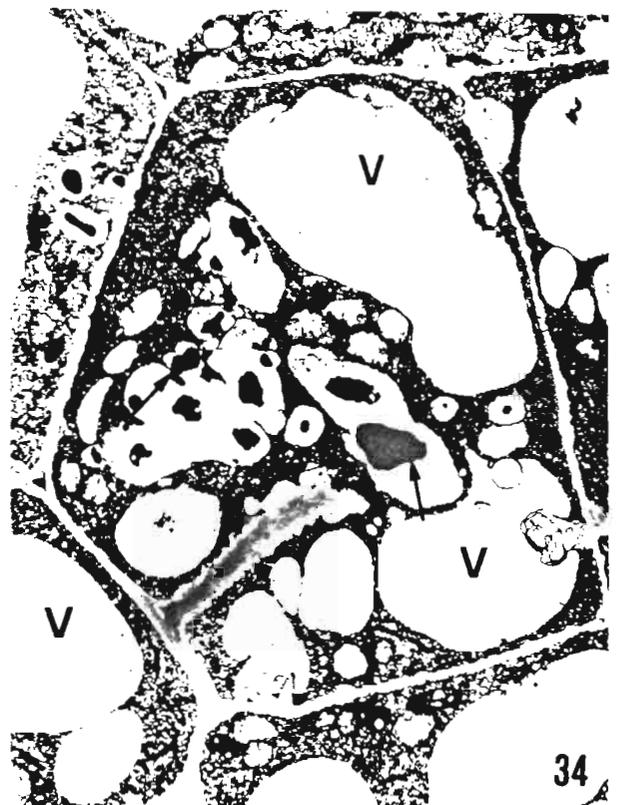
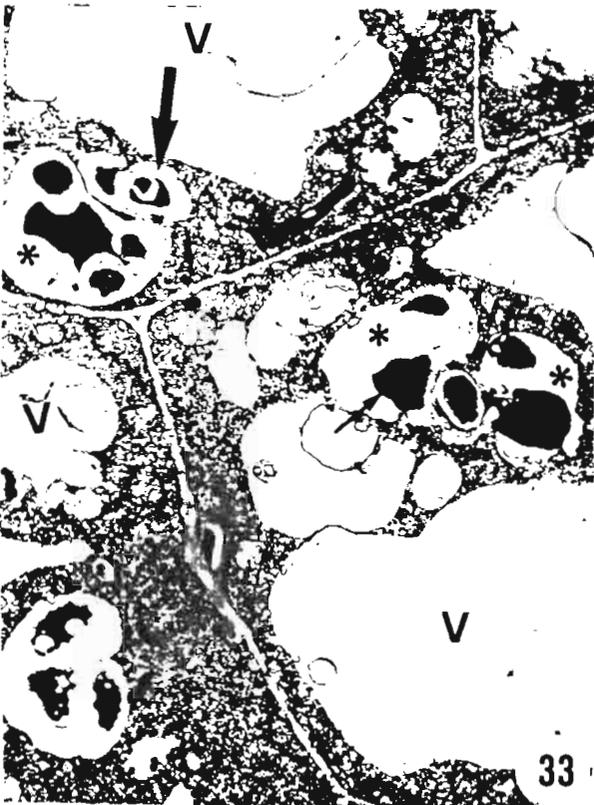
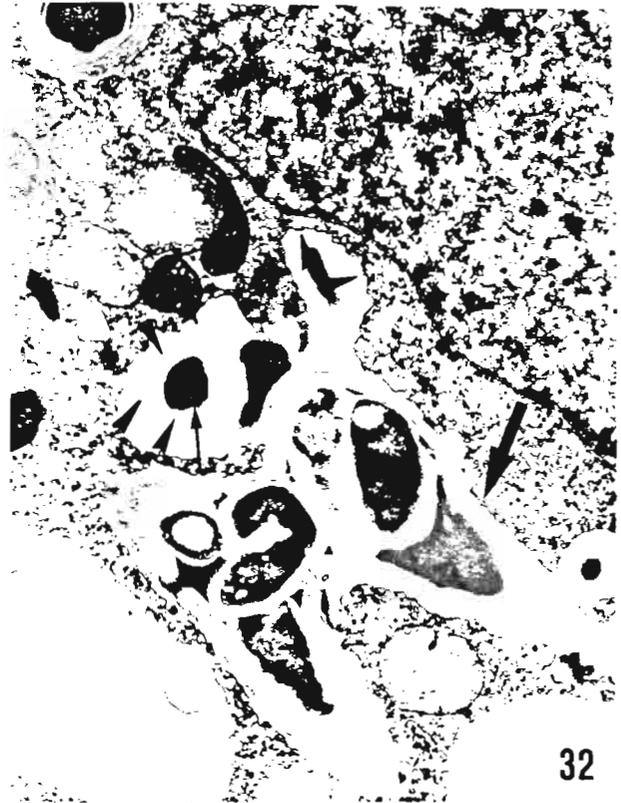


PLANCHE 13

Fig. 35 et 36 : Cellules végétales envahies - Bactéroïdes intracellulaires individuels ou à plusieurs (larges flèches) dans un même sac pér bactéroïdien (flèches).

Noter la richesse du cytoplasme végétal en dictyosomes (têtes de flèches ; Fig. 35) et la présence d'une cellule non envahie (astérique) au milieu des cellules à bactéroïdes (Fig. 36).

(Grandissements : Fig. 35 : x 5000. 36 : x 7000).

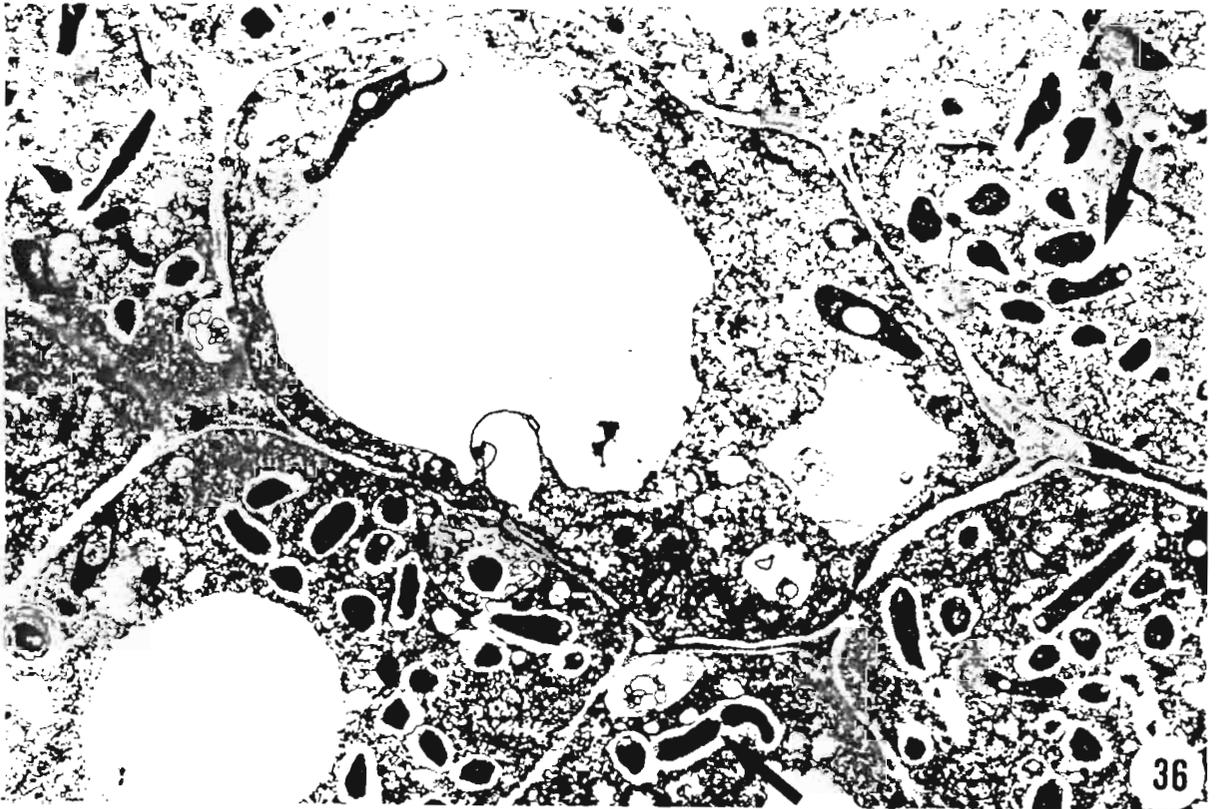
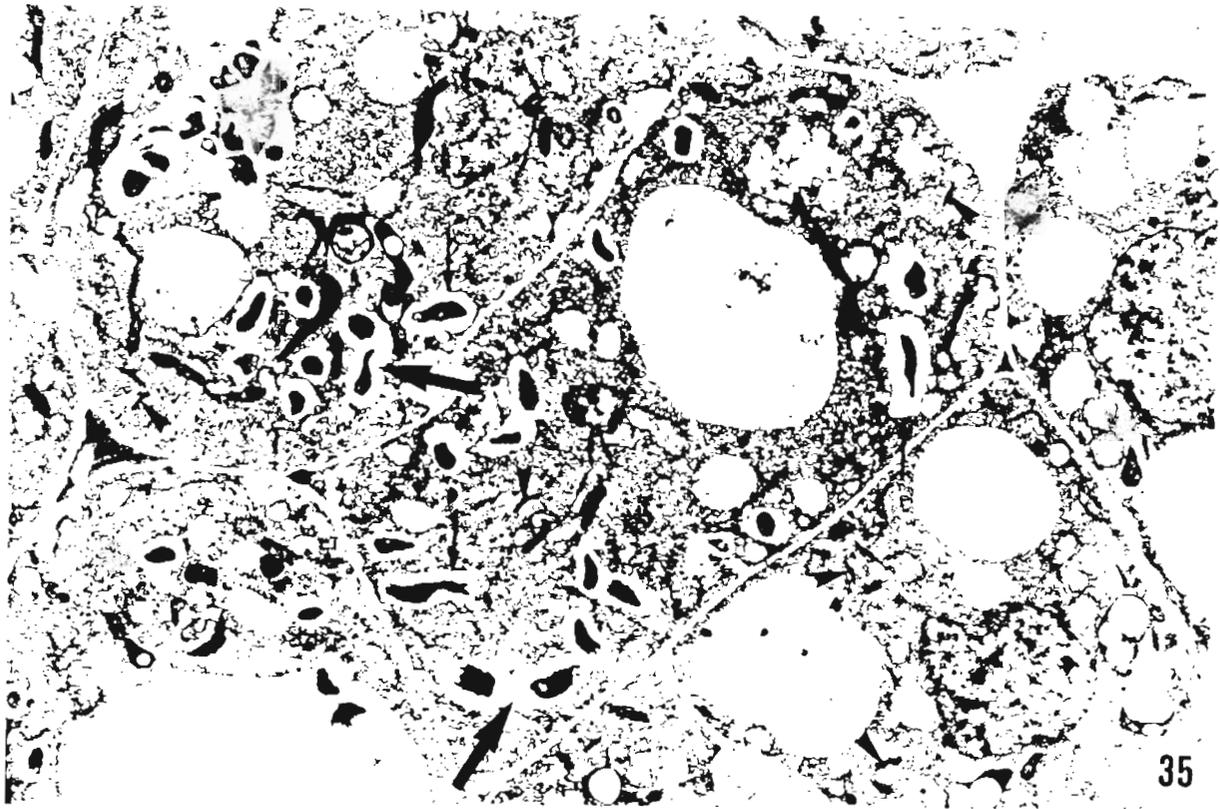


PLANCHE 14

Fig. 37 et 38 : Différenciation du tissu fixateur (1ère étape).

Aspect irrégulier du couple bactéroïde - membrane pér bactéroïdienne. Les têtes de flèches soulignent les vésicules cytoplasmiques dont certaines fusionnent à la membrane séquestrante des bactéroïdes (flèches). Les deux figures montrent la richesse du cytoplasme végétal en ribosomes, en profils réticulaires et en dictyosomes. Double flèche = bactéroïde en division.

(Grandissements : Fig. 37 : x 20000 ; Fig. 38 ; x 20000).

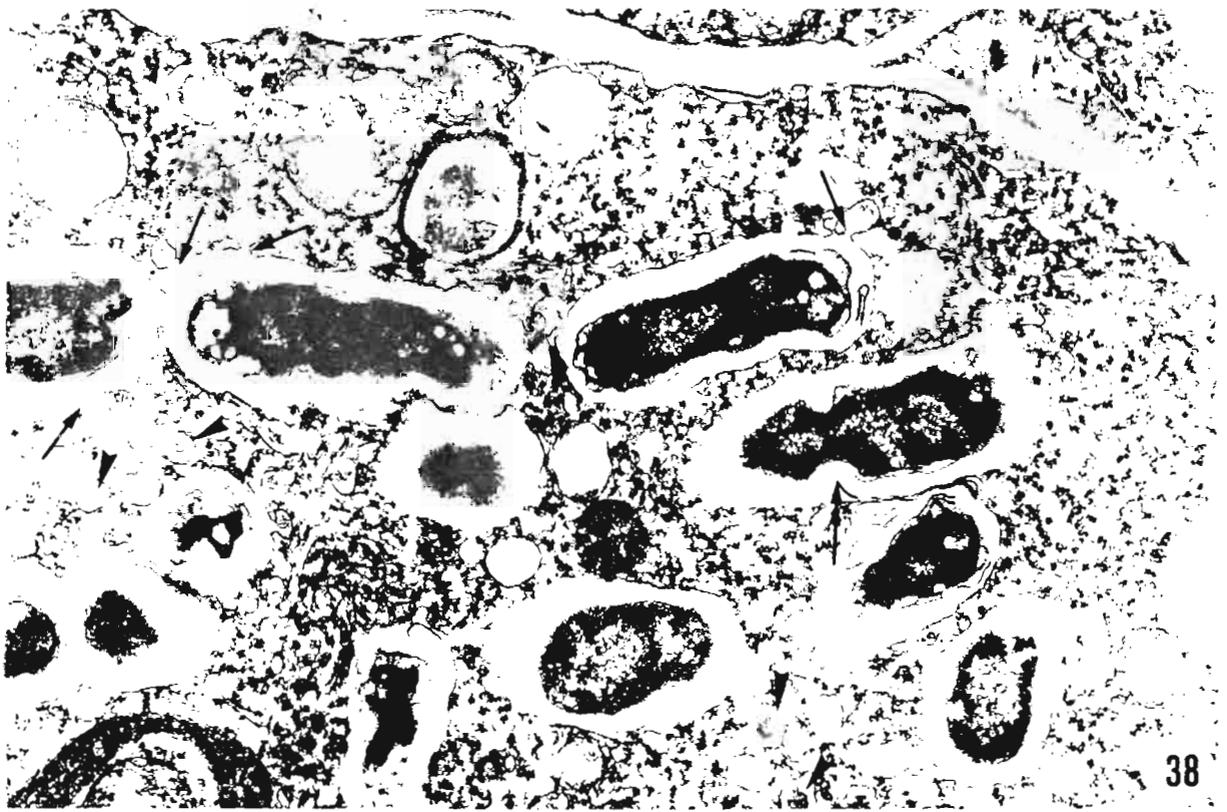
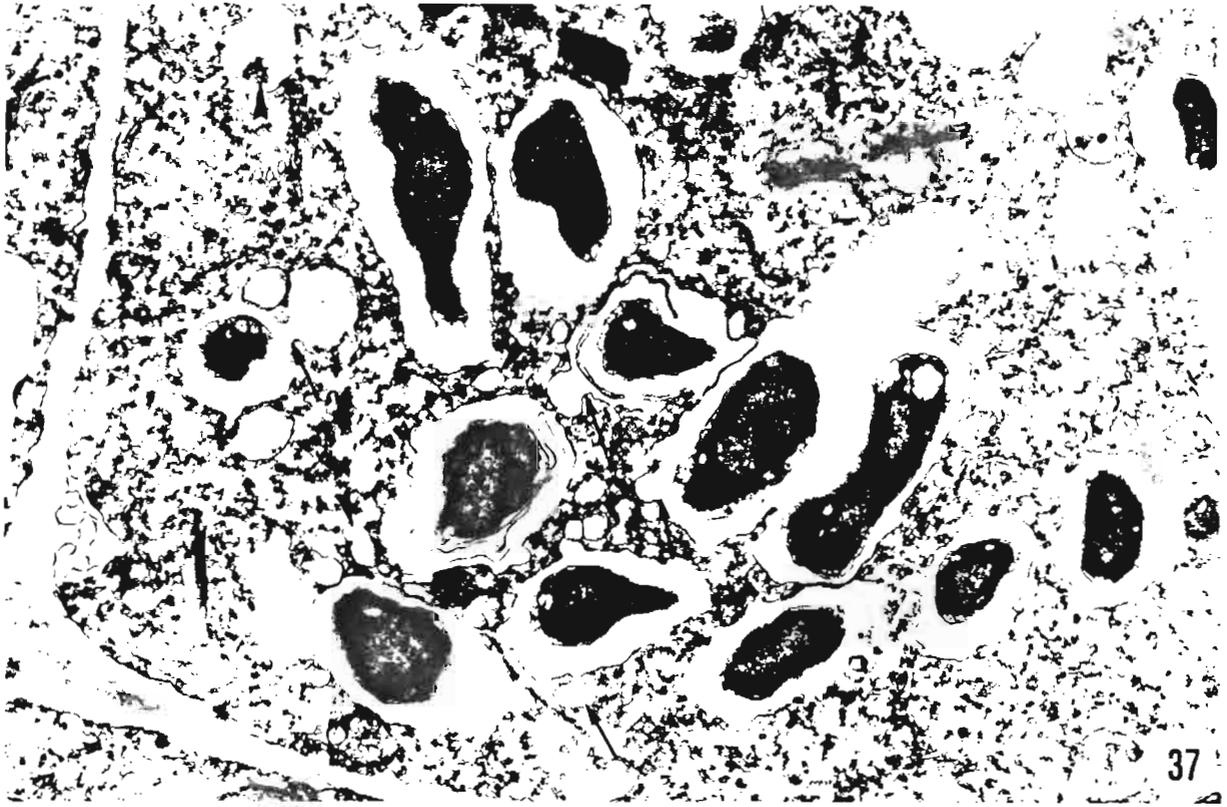


PLANCHE 15

Fig. 39 et 40 : Différenciation du tissu fixateur (2ème étape).

Fig. 39 : Vue générale montrant l'évolution de l'ultrastructure bactéroïdienne au cours de la maturation des cellules envahies. Noter l'allongement des bactéroïdes dans les cellules les plus différenciées (partie droite de la figure).

Fig. 40 : Bactéroïdes en cours de différenciation montrant un profil plus régulier et une réduction de leur espace périplasmique. Noter les zones de contact entre membranes séquestrantes (flèches) et la présence d'un filament d'infection (large flèche) dans le cytoplasme végétal.

(Grandissements : Fig. 39 : x 5000 ; Fig. 40 : x 19000).

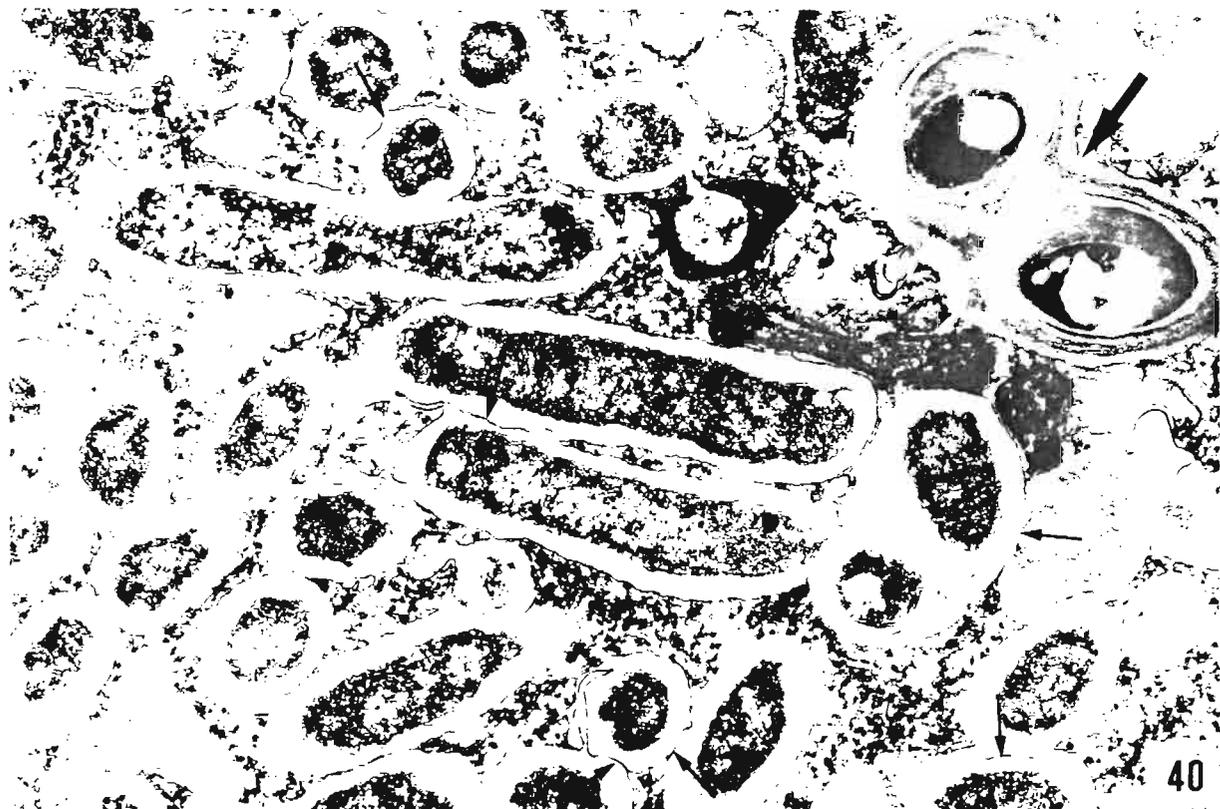
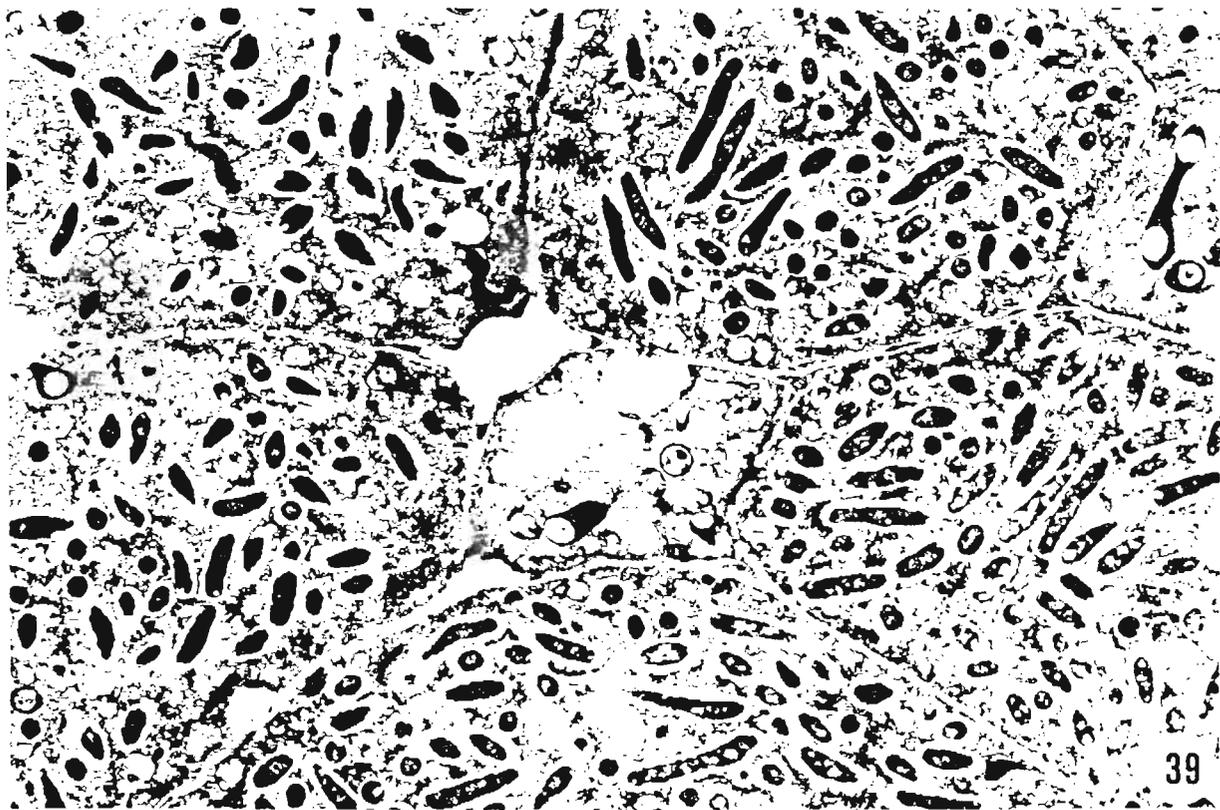


PLANCHE 16

Fig. 41 : Différenciation du tissu fixateur (3ème étape).

Vue générale de cellules envahies par les bactéroïdes, et vue partielle de deux cellules non envahies montrant un compartiment vacuolaire important (V) et la présence de péroxysomes (flèches) dans le cytoplasme.

(Grandissement : Fig. 41 : x 7000).

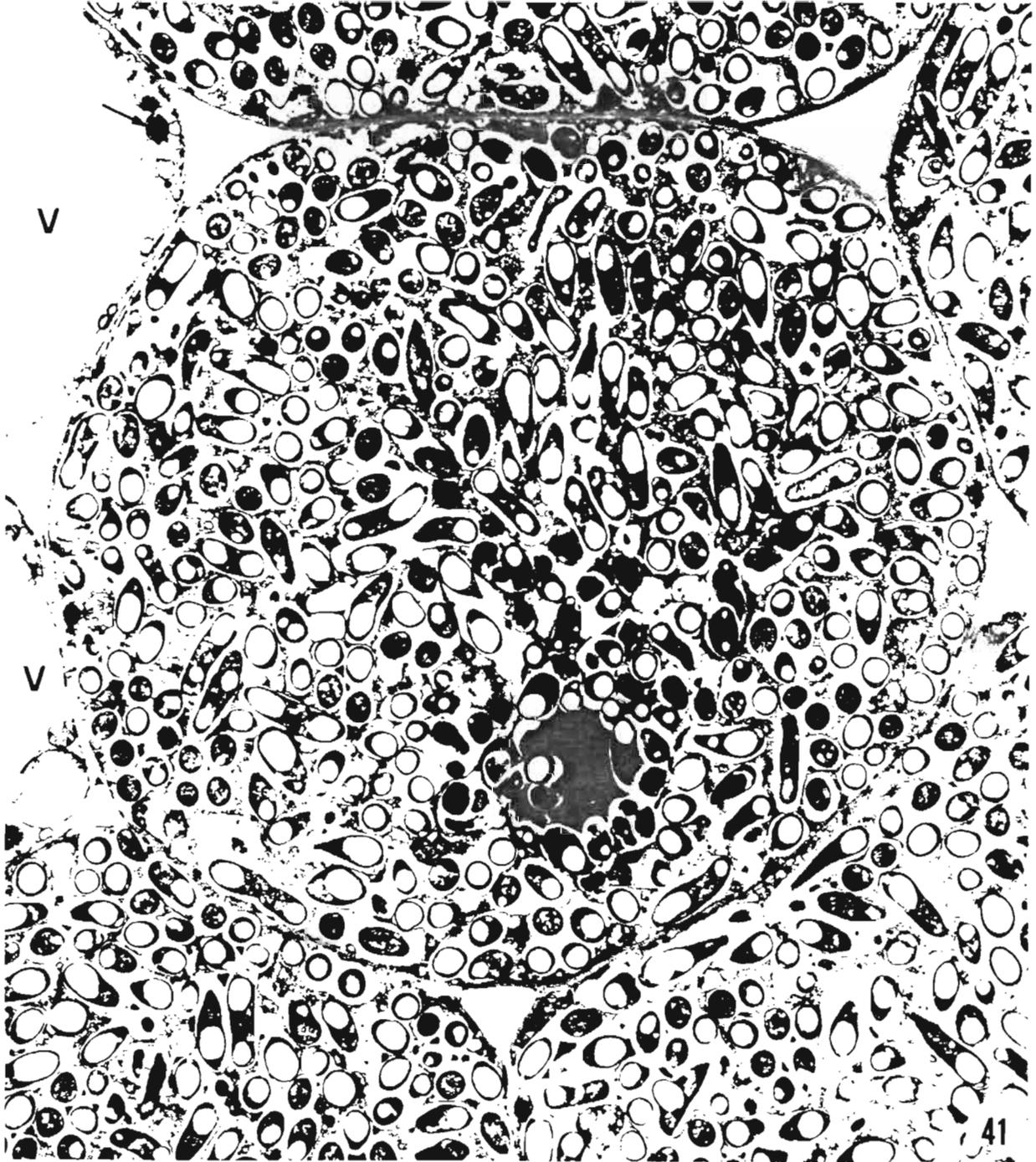


PLANCHE 17

Fig. 42 : Différenciation du tissu fixateur (3ème étape). Vue partielle de deux cellules envahies montrant le rejet des organites cellulaires contre la paroi cellulaire (astérisques blancs = plastes ; flèches = mitochondries).

Noter la forme caractéristique "en rosace" des sacs pér bactéroidiens séquestrant plusieurs bactéroides, dont les pôles sont occupés par de larges dépôts de poly- β -hydroxybutyrate (astérisques noirs). A l'intérieur des sacs pér bactéroidiens, les têtes de flèches localisent des vestiges membranaires qui pourraient être l'indice d'une fusion entre membranes pér bactéroidiennes

(Grandissement : Fig. 42 : x 15000).

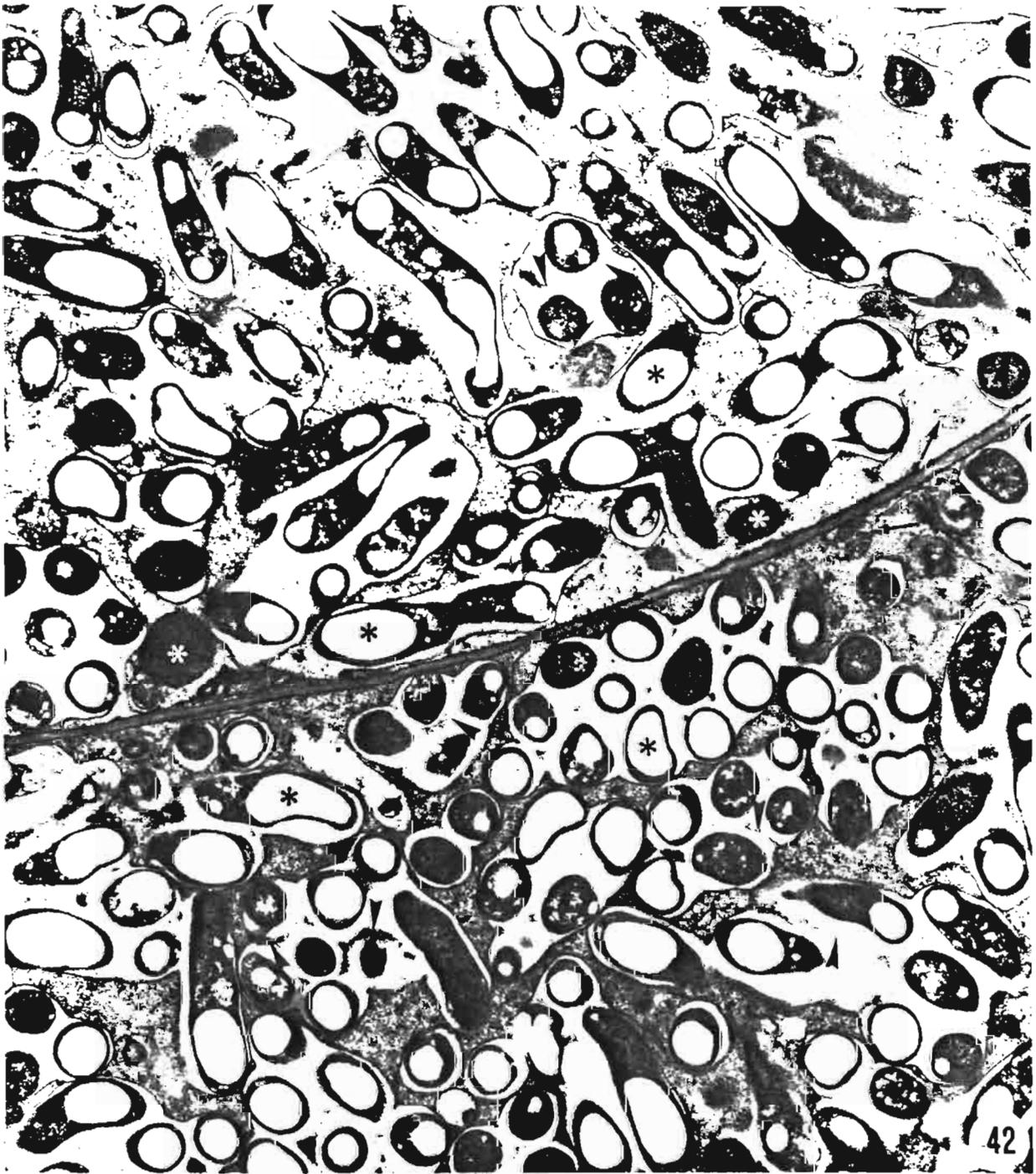
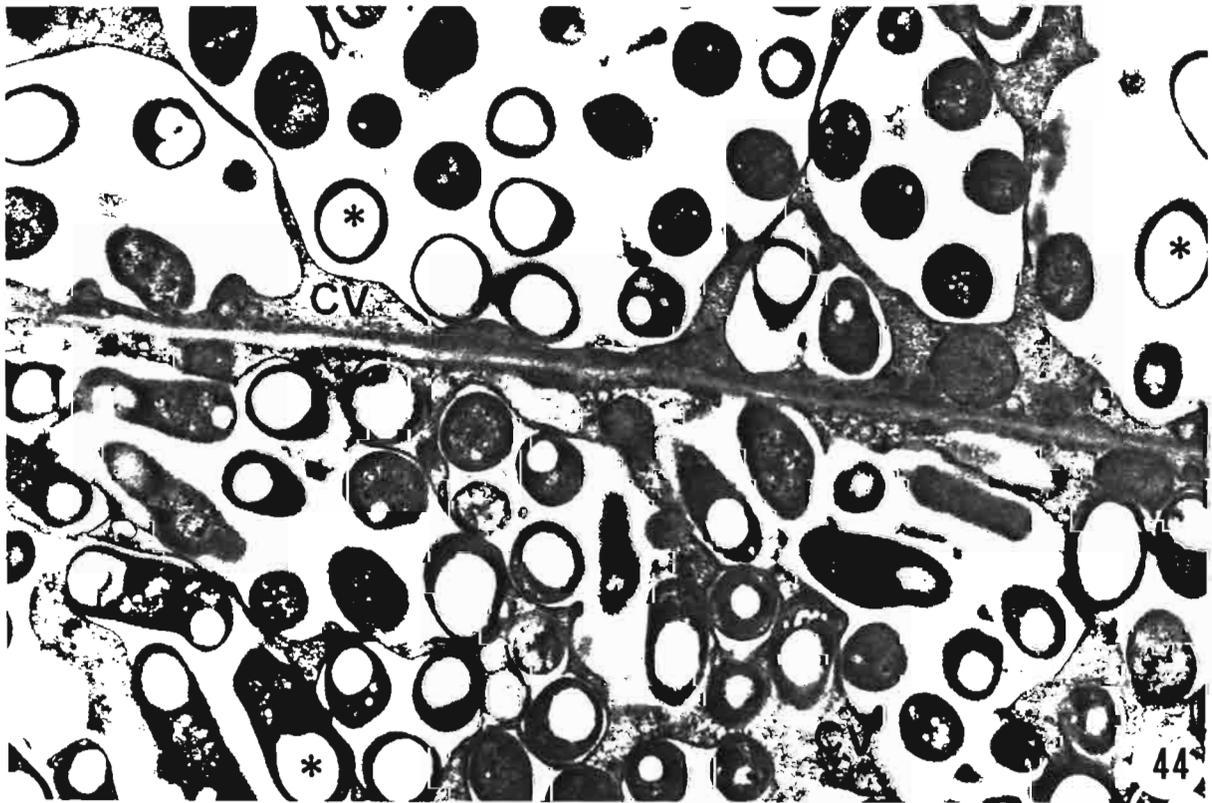
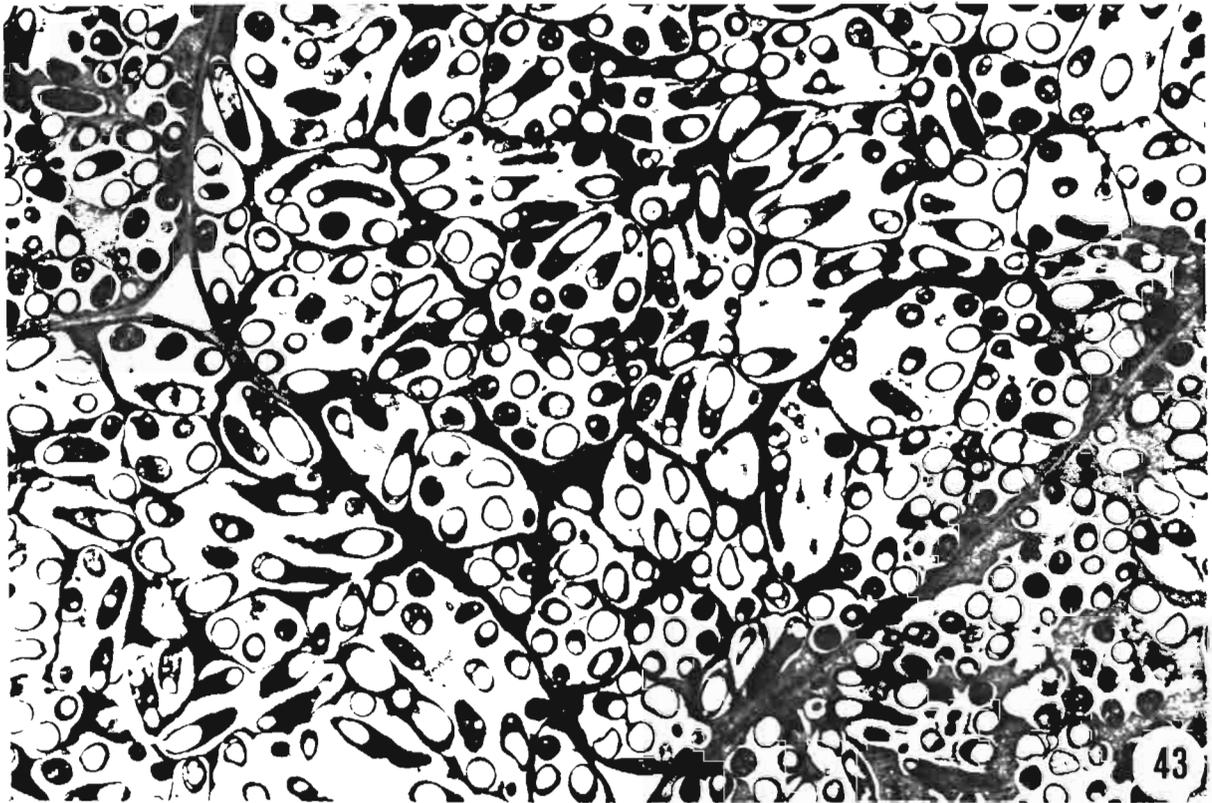


PLANCHE 18

Fig. 43 - 44 : Différenciation du tissu fixateur (nodule mature de 14 jours). On remarque la présence de sacs pér bactéroïdiens renfermant de très nombreux bactéroïdes, l'accumulation de poly- β -hydroxybutyrate (astérisque) et de polyphosphate (sous forme de gouttelettes électroniquement denses) au niveau des bactéroïdes (fig. 44) et la réduction de la densité ribosomique du cytoplasme végétal (CV).

(Grandissements : Fig. 43 : x 6000 ; Fig. 44 : x 16000).



TITRE : CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA SYMBIOSE ENTRE *AZORHIZOBIUM*, *RHIZOBIUM* ET *SESBANIA ROSTRATA*.

MOTS CLES : *AZORHIZOBIUM* ; *RHIZOBIUM* ; FIXATION D'AZOTE ; NODULES DE TIGE ; *SESBANIA ROSTRATA*.

RESUME : La légumineuse tropicale *Sesbania rostrata* peut développer des nodules fixateurs d'azote à la fois sur les racines et les tiges.

Après isolement d'un grand nombre de souches à partir de nodules de tige de *S. rostrata* et de nodules de racine de diverses espèces de *Sesbania*, des études taxonomiques, physiologiques et de spectre de nodulation, nous ont permis de préciser la séparation de ces souches en deux groupes distincts appartenant aux genres *Azorhizobium* et *Rhizobium*.

Toutes les souches d'*Azorhizobium* induisent la formation de nodules effectifs aussi bien sur les racines que sur les tiges de *S. rostrata*. Les souches de *Rhizobium* induisent également des nodules effectifs sur les racines de cette plante, mais se répartissent en 4 catégories selon leur aptitude ou non à induire des nodules sur la tige de *S. rostrata* et aussi selon leurs degrés d'effectivité.

L'étude de l'ontogénèse des nodules racinaires de *S. rostrata* induits par *Azorhizobium* ORS571 nous a permis de décrire :

- Un mode d'infection comportant deux étapes : invasion intercellulaire par les bactéries puis formation de cordons d'infection.

- Un mode original de libération des *Azorhizobium* dans le cytoplasme de la cellule hôte et un type de développement nodulaire encore jamais décrit à ce jour.

La quantification de la fixation d'azote par la méthode isotopique ^{15}N nous a permis de mettre en évidence le potentiel fixateur d'azote élevé de *S. rostrata*, soit 110 kg d'azote fixé par hectare en 60 jours. Cette propriété nous a conduit à étudier *S. rostrata* comme plante fourragère et à mener des essais en milieu paysan en utilisant *S. rostrata* comme engrais vert dans les rizières. Nous avons ainsi obtenu sur plusieurs années un doublement des rendements du riz ; l'apport de l'engrais vert étant dans tous les cas supérieur à l'équivalent de 100 kg d'azote à l'hectare.