

**INTERACTIONS PLANTES
MICROORGANISMES**

**SENEGAL
FEBRUARY 1992**

ifs

Fondation Internationale pour la Science

INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

INTERACTIONS BETWEEN PLANTS AND MICROORGANISMS

**Compte rendu du séminaire régional organisé par
la Fondation Internationale pour la Science (IFS)
et l'Institut Français de Recherche Scientifique
pour le Développement en Coopération (ORSTOM)**

**Dakar, Sénégal
17-22 février 1992**

Organisateurs:

Fondation Internationale pour la Science (IFS)
Institut Français de Recherche Scientifique
pour le Développement en Coopération (ORSTOM)

Co-financé par:

Institut Français de Recherche Scientifique
pour le Développement en Coopération (ORSTOM)
Islamic Educational, Scientific and Cultural Organization (ISESCO)
Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale (CTA)

Publié par:

Fondation Internationale pour la Science (IFS)
Grev Turegatan 19, 114 38 Stockholm, Sweden

Rédaction:

Judith N. Wolf

Les communications qui figurent dans cette publication ont été reproduites telles que soumises et n'ont pas été revues par des pairs, ni révisées du point de vue scientifique par la Fondation Internationale pour la Science (IFS). Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs et pas la Fondation Internationale pour la Science (IFS).

La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les "copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective" et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, "toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droits ou ayants cause, est illicite" (alinéa 1er de l'article 40). Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code Pénal.

ISBN: 91 85798 31 2

TABLE DES MATIERES

ALLOCUTIONS D'OUVERTURE

MR JACQUES BALDENSPERGER, SECRETAIRE SCIENTIFIC, FONDATION INTERNATIONALE POUR LA SCIENCE	1
MR PHILIPPE MATHIEU, REPRESENTANT DE L'ORSTOM A DAKAR	3
DR ABDELAZIZ BEN OTHMAN ALTWAIJRI DIRECTEUR GENERAL, ISESCO PRESENTE PAR DR AMADOU OURY DONGHOL DIALLO, SPECIALISTE DE PROGRAMMES, SECTEUR DES SCIENCES, ISESCO	5
MR MAGUED DIOUF, MINISTRE CHARGE DE LA MODERNISATION DE L'ETAT ET DE LA TECHNOLOGIE	7
SESSION SPECIALE: REMISE DU PRIX SVEN BROHULT Presentation of the Sven Brohult Award DR B. LUNDGREN	10
MANAGING NITROGEN FIXATION BY TREES AND ITS CONTRIBUTION TO NITROGEN STATUS OF SOILS OR ASSOCIATED CROPS Utilisation des arbres fixateurs d'azote en agroforesterie et leur contribution au bilan azote des sols ou des cultures associées Dr Nteranya SANGINGA	14

SESSION I

ETIOLOGIE, ECOLOGIE ET IMPACT DES MICROORGANISMES SUR LA PRODUCTION DES CULTURES TROPICALES

ECOLOGIE ET EPIDEMIOLOGIE DES CHAMPIGNONS PATHOGENES DU SOL: LE POTENTIEL INFECTIEUX DES SOLS, SA MESURE ET SON EVOLUTION DANS LE CAS PARTICULIER DES SOLS INFECTES PAR <i>PYTHIUM</i> SPP. EN AMAZONIE CENTRALE Soil infectivity, its estimation and dynamics: the case of soils infested by <i>Pythium</i> spp. in Central Amazonia Mr Maurice LOURD	33
FUNGAL ORGANISMS ASSOCIATED WITH SUNFLOWER AND THEIR EFFECTS ON THE CROP IN THE GUINEA SAVANNA REGION OF NIGERIA Champignons pathogènes du tournesol et leurs effets en zone de savane guinéenne au Nigéria Mme Claribell OKOLI	35

<p>INFECTION DES TIGES DE MANIOC (<i>MANIHOT ESCULENTA</i> CRANTZ.) PAR <i>COLLETOTRICHUM GLOESPORIOIDES</i> PENZ., AGENT PATHOGENE DE L'ANTHRACNOSE DE MANIOC Infection of cassava (<i>Manihot esculenta</i> Crantz.) stems by <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz., the causes of anthracnosis in cassava Dr Casimir MAKAMBILA</p>	43
<p>SEED INFECTION BY <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> PV <i>PHASEOLICOLA</i> AND MOVEMENT OF THE BACTERIUM IN <i>PHASEOLUS</i> BEANS Infection de la semence par <i>Pseudomonas syringae</i> Pv <i>Phaseolicola</i> et mode d'action sur les haricots <i>Phaseolus</i> Mme Betty GONDWE</p>	56
<p>ETUDE DU MODE D'ACTION DE <i>MACROPHOMINA PHASEOLINA</i> (TASSI) GOÏD. SUR <i>VIGNA UNGUICULATA</i> (L.) WALP. How <i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goïd affects <i>Vigna</i> <i>unguiculata</i> (L.) Walp. Dr Toudou ADAM</p>	64
<p>ADAPTATION DES BACILLUS FIXATEURS D'AZOTE A LA RHIZOSPHERE DES GRAMINEES: UNE IDEE QUI FAIT SON CHEMIN Adaptation of nitrogen-fixing Bacillus to the rhizosphere of graminaceous plants: an idea that is gaining ground Mr T. HEULIN</p>	68
<p>ANTAGONISME ENTRE MICROORGANISMES SYMBIOTIQUES ET ASYMBIOTIQUES DU SOL DE DJIBELOR Antagonism between symbiotic and asymbiotic microorganisms in Djibelor soils Dr Ousmane DIAGNE</p>	83
<p>EVALUATION DE LA PRODUCTION DES SIDEROPHORES PAR LES SOUCHES DE <i>RHIZOBIUM CICERI</i> ISOLEES DE DIFFERENTS SOLS DU MAROC Evaluation of the production of siderophores by strains of <i>Rhizobium ciceri</i> isolated from various soils in Morocco Mr El Bekkay BERRAHO</p>	95
<p>RECHERCHES SUR LA CERCOSPORIOSE DES AGRUMES AU CAMEROUN Research on cercosporiose of citrus trees in Cameroon Mr Jean KUATE</p>	97
<p>LA DYNAMIQUE DE LA CERCOSPORIOSE NOIRE (<i>MYCOSPHAERELLA</i> <i>FIIJENSIS</i> MORELET) DES BANANIERS (AAA) DANS LES CONDITIONS DE NJOMBE (MAI 1990-AVRIL 1991): INFLUENCE DE LA DATE DE PLANTATION ET DU STADE PHYSIOLOGIQUE DE LA PLANTE Effects of the planting date and physiological stage of the plant on the development of black cercosporiosis (<i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet) in banana trees in the Njombe region of Cameroun (May 1990-April 1991) Mr Alassa MOULIOM PEFOURA</p>	99

<p>RESPONSE OF GROUNDNUT (<i>ARACHIS HYPOGEA</i>), <i>GLIRICIDIA SEPIUM</i> AND <i>LEUCAENA LEUCOCEPHALA</i> TO INOCULATION WITH <i>RHIZOBIUM</i> AND MYCORRHIZA Réponse de l'arachide (<i>Arachis hypogea</i>), <i>Gliricidia sepium</i> et <i>Leucaena</i> <i>leucocephala</i> (K-8) à l'inoculation de <i>Rhizobium</i> à base de tourbe sur un sol acide argilo-sablo-limoneux Dr Denis S. AMARA</p>	108
<p>EFFECT OF INOCULATION RATE ON NODULATION AND GROWTH OF <i>GLYCINE MAX</i> AND <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> IN A TROPICAL SOIL Effet de la densité d'inoculum sur la nodulation et la croissance de <i>Glycine max</i> et <i>Phaseolus vulgaris</i> sur sol tropical Dr Francis B. MWAURA</p>	114
<p>LA SYMBIOSE <i>AZORHIZOBIUM-SESBANIA ROSTRATA</i>: APPLICATIONS A LA RIZICULTURE AFRICAINE <i>Azorhizobium-Sesbania rostrata</i> symbiosis applied to African rice production Dr I. NDOYE</p>	120
<p>RESPONSE OF <i>GLIRICIDIA SEPIUM</i> TO <i>RHIZOBIUM</i> AND VA-MYCORRHIZAL FUNGI INOCULATION ON AN ACID SOIL Réaction de <i>Gliricidia sepium</i> à l'inoculation de <i>Rhizobium</i> et d'endomycorhizes VA sur sol acide Dr Akim O. OSUNDE</p>	156
<p>ROLE DU <i>COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA</i> (CES) G.W. WILSON DANS LA PRODUCTION DES TANINS PAR LE SORGHO TEINTURIER The role of <i>Colletotrichum graminicola</i> (Cesati) Wilson in the production of tannins using "dye" sorghum Dr P. SANKARA</p>	165
<p>SESSION II CARACTERISATION ET ANALYSE DE LA DIVERSITE DES AGENTS PATHOGENES ET SYMBIOTIQUES</p>	
<p>VARIABILITE DES PROTEINES FONGIQUES: APPLICATION A LA MISE AU POINT D'UN DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE Variability in fungal proteins and its use in developing an immunology diagnosis Mr Didier SPIRE</p>	174
<p>ENDOMYCORRHIZATION VA DES <i>VITROPLANTS</i> DE VIGNE: APPROCHE IMMUNOLOGIQUE VA endomycorrhization of microplants of grapevine: an immunological approach Mme F. RAVOLANIRINA</p>	186

*	DIVERSITE GENETIQUE DES ACACIA SAHELIENS: EXPLOITATION PAR LES VOIES CLONALE ET SEXUEE Genetic diversity in Sahelian acacias: clonal and sexual development methods Mr A. BORGEL	199
	APPLICATION DES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE A L'ETUDE DE LA DIVERSITE GENETIQUE DES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES Use of molecular biology techniques in studying the genetic diversity of phytopathogenic fungi Mlle Diana FERNANDEZ	201
	CARACTERISATION MOLECULAIRE DES ISOLATS DE <i>FRANKIA</i> Molecular characterization of <i>Frankia</i> isolates Dr Pascal SIMONET	203
	VARIABILITE DANS LE POUVOIR PATHOGENE DES ISOLATS ET SOUCHES DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> T.SP. <i>ALBEDINIS</i> , AGENT DE LA FUSARIOSE VASCULAIRE (BAYOUD) DU PALMIER DATTIER Variability in the pathogenicity of isolates and strains of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> , the pathogenic agent of vascular fusariose (Bayoud) in date palms Mr My Hassan SEDRA	204
	FACTEURS DE VARIATION DE LA RESISTANCE DU RIZ A LA PYRICULARIOSE CAUSEE PAR <i>PYRICULARIA ORYZAE</i> CAV. Variation in the resistance of rice to pyriculariose caused by <i>Pyricularia oryzae</i> Cav. Dr Raymond S. VODOUHE	214
	SYMBIOTIC INTERACTIONS BETWEEN STRAINS OF <i>RHIZOBIUM</i> <i>LEGUMINOSARUM</i> AND GENOTYPES OF FABA BEAN Interactions symbiotiques entre des souches de <i>Rhizobium</i> <i>leguminosarum</i> et des génotypes de fèves Dr Mohammed SADIKI	227
*	ETUDE TAXONOMIQUE DES <i>RHIZOBIUM</i> SP. D' <i>ACACIA</i> ET DE <i>SESBANIA</i> Taxonomic study of <i>Rhizobium</i> sp. from <i>Acacia</i> and <i>Sesbania</i> Mr Philippe DE LAJUDIE	238

SESSION III
MECANISMES GENETIQUES, CELLULAIRES ET MOLECULAIRES
DE L'INTERACTION PLANTES MICROORGANISMES

INDUCTION OF DISEASE RESISTANCE Induction de la résistance aux maladies Prof Ronald K.S. WOOD	246
---	-----

U = fait

RECENT RESEARCH INTO THE CELLULAR, MOLECULAR AND
GENETICAL BASES OF COMPATIBLE HOST-FUNGUS INTERACTIONS
IN VESICULAR-ARBUSCULAR ENDOMYCORRHIZA: APPROACHES
AND ADVANCES

Bases cellulaires, moléculaires et génétiques des interactions compatibles
hôte-champignon des endomycorhizes VA: état d'avancement et modes
de conception de la recherche

Dr Vivienne GIANINAZZI-PEARSON

253

REPOSES DES PLANTES A L'AGRESSION PARASITAIRE U

+ Plant response to parasite attacks

Dr Jean-Paul GEIGER

264

PLANT DEFENCE SYSTEMS AGAINST INVADING PATHOGENS

Mécanismes de défense des plantes contre l'agression des pathogènes

Dr Dirk INZE

267

LES SIGNAUX SYMBIOTIQUES CHEZ *RHIZOBIUM MELILOTI*

Symbiotic signals in *Rhizobium meliloti*

Mr Charles ROSENBERG

268

CYTOCHIMIE DES POURRIDIES DE L'HEVEA

Cytochemistry of rubber tree rots

Mr Michel NICOLE

270

LA STEMPHYLIOSE DE *SOLANUM AETHIOPICUM* L. GR. KUMBA

CAUSEE PAR *STEMPHYLIUM SOLANI* WEBER

Stemphylium leaf spot of *Solanum aethiopicum* L. Gr.

Kumba caused by *Stemphylium solani* Weber

Mme Maymouna SY NDIR

277

ETUDE STRUCTURALE DES SITES DE NODULATION ET INDUCTION U

+ DES NODULES CAULINAIRES CHEZ *SESBANIA PUBESCENS*

Structure of nodulation sites and caulinary

nodule induction in *Sesbania pubescens*

Mr Kodjo TOMEKPE

284

LES PEROXYDASES DU PALMIER DATTIER ET LEUR ROLE POSSIBLE

DANS LA RESISTANCE A LA MALADIE DU BAYOUD

Peroxidases of date palms and their possible role

in resistance to Bayoud disease

Dr Mohammed BAAZIZ

290

MECANISMES DE DEFENSE DU PALMIER A HUILE CONTRE

LE *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. ELAEDIS

Defence mechanisms of oil palm against

Fusarium oxysporum f. sp. elaedis

Mr Sekou DIABATE

307

LE CHARBON DU MIL AU SENEGAL: *TOLYSPORIUM PENICILLARIAE* BREF., PARASITE DU MIL (*PENNISETUM TYPHOIDES* STAPF AND HUBB)
 Pearl millet smut in Senegal: *Tolysporium penicillariae* Bref.,
 the millet parasite (*Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb)
 Mme Gnagna DIAGNE-LEYE

321

SESSION IV
 AMELIORATION DE LA PRODUCTION
 DES CULTURES TROPICALES

GESTION DES CONTRAINTES PHYTOSANITAIRES DES
 CULTURES TROPICALES: INTERET ET NECESSITE
 D'UNE APPROCHE SYSTEMATIQUE
 Managing health problems in tropical crops:
 the importance of a systems approach
 Dr Serge SAVARY

336

STRATEGIES DE SELECTION ET DE LUTTE GENETIQUE
 CONTRE LES PHYTOPARASITES
 Breeding and genetic control strategies for plant parasites
 Mr Michel VALES

353

X LA SYMBIOSE *RHIZOBIUM*-ACACIA: L'EXEMPLE DE L'*ACACIA ALBIDA* ✓
Rhizobium-Acacia symbiosis: the example of *Acacia albida*
 Dr Bernard DREYFUS

371

EVALUATION OF *AMARANTHUS* ACCESSIONS FOR RESISTANCE
 TO STEM AND LEAF INFECTIONS PROVOKED BY *CHOANEPHORA*
CUCURBITARUM IN AGO-IWOYE, NIGERIA
 Evaluation des accessions d'*Amaranthus* pour la résistance
 à des infections de la feuille et de la tige induites par
Choanephora cucurbitarum à Ago-Iwoye, Nigeria
 Dr Afolabi ADEBANJO

382

EVALUATION OF SORGHUM GENOTYPES FOR RESISTANCE
 TO BACTERIAL LEAF STREAK
 Evaluation de génotypes de sorgho pour la résistance
 à la maladie des stries bactériennes
 Mr Temam HUSSIEN

389

INDUCTION DE LA TOLERANCE AU *PSEUDOMONAS SOLANACEARUM*
 CHEZ LA TOMATE PAR L'UTILISATION DE LA VARIATION
 SOMACLONALE EN CULTURE *IN VITRO*
 Inducing tolerance to *Pseudomonas solanacearum* in tomato plants
 by using somaclonal variation in *in vitro* growing conditions
 Mr Elie NSIKA-MIKOKO

397

THE EFFECTS OF HEIGHT OF STAKING AND SIZE OF PLANTING SETT ON SOME ASPECTS OF GROWTH OF WATER YAM (<i>DIOSCOREA ALATA</i> L.) AND ANTHRACNOSE DISEASE SEVERITY Influence de la hauteur de palissage et du poids des semenceaux sur quelques aspects de la croissance de l'igname <i>Dioscorea alata</i> L. et l'intensité de l'antracnose Dr Alphonso NWANKITI	401
FLUTED PUMPKIN LEAF-SPOT DISEASE MANAGEMENT IN SOUTHEASTERN NIGERIA Contrôle de la maladie des taches foliaires du <i>Telfairia occidentalis</i> dans le Nigéria du sud-est Dr Martin I. NWUFO	410
ETUDES PRELIMINAIRES SUR LA SELECTION DE CHAMPIGNONS INDIGENES POUR LA MYCORHIZATION CONTROLEE DES EUCALYPTUS AU CONGO Pre-study on the selection of indigenous fungi for controlled mycorrhization in eucalypts from Congo Mr Donatien N'ZALA	424
LA CULTURE <i>IN VITRO</i> : UN OUTIL PRIVILEGIE DE PRODUCTION D'INOCULA DE MYCORHIZES A VESICULES ET ARBUSCULES <i>In vitro</i> culture: a preferred tool for producing vesicular-arbuscular endomycorrhiza inoculum Mr Tahir DIOP	429
REGENERATION DE BOURGEONS A PARTIR DE CULTURE DE RACINES D' <i>ACACIA ALBIDA</i> Regeneration of buds from root culture of <i>Acacia albida</i> Mme Yaya ken GASSAMA DIA	441
NODULATION CAULINAIRE, FIXATION D'AZOTE ET MORPHOGENESE <i>IN VITRO</i> CHEZ <i>SESBANIA ROSTRATA</i> , DEUX DE SES MUTANTS, ET CHEZ <i>SESBANIA PUBESCENS</i> Caulinary nodulation, nitrogen fixation and <i>in vitro</i> morphogenesis in <i>Sesbania rostrata</i> , two of its mutants and <i>Sesbania pubescens</i> Dr Marie M. SPENCER-BARRETO	442
<i>ACACIA ALBIDA</i> , UNE LEGUMINEUSE ARBORESCENTE A FORT POTENTIEL MYCORHIZIEN ET FIXATEUR D'AZOTE <i>Acacia albida</i> , a tree legume with a strong mycorrhizal and nitrogen-fixing potential Dr Mamadou GUEYE	452
TRANSFORMATION CHEZ LES PLANTES FIXATRICES D'AZOTE Transformations in nitrogen-fixing plants Prof Emile DUHOUX	462

TRANSFER OF DISEASE RESISTANCE GENES INTO CROP PLANTS Transfert de la résistance des gènes à la maladie dans les plantes Dr Wayne POWELL	475
NOTE DE PRESENTATION DU PROJET CTL/SUD A THIES Mr Papa NDIAYE	491
UNITE DE RECHERCHE COMMUNE DE CULTURE <i>IN VITRO</i> ISRA/ORSTOM, CENTRE DE DAKAR BEL-AIR ET LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE ORSTOM	495
MOTION DE REMERCIEMENT AU GOUVERNEMENT SENEGALAIS	498
DISCOURS DE CLOTURE PRESENTE PAR DR M.M. SPENCER BARETTO	499
LISTE DES PARTICIPANTS	502

ALLOCUTION D'OUVERTURE DE MONSIEUR JACQUES BALDENSPERGER, SECRETAIRE SCIENTIFIQUE DE LA FIS

Monsieur le Ministre chargé de la Modernisation de l'Etat et de la Technologie
Mr le Directeur Général de l'ISRA
Mr le Représentant de l'ORSTOM
Mr le Directeur des Affaires Scientifiques et Techniques
Mr le Représentant de l'ISESCO

Mesdames, Messieurs, chers participants,

C'est un grand plaisir pour moi que de vous souhaiter la bienvenue au nom du Dr Jean Tear, Directeur de la Fondation Internationale pour la Science. Ceux qui ont répondu à notre invitation ont devant eux une longue semaine de travail intensif, avec un programme exceptionnellement chargé, j'espère qu'ils ne tiendront pas rigueur aux organisateurs de leur avoir laissé si peu de temps pour profiter de leur séjour à Dakar. Le nombre de participants nous prouve que le choix du thème était judicieux, car c'est peut-être la première réunion en Afrique de deux groupes de chercheurs qui ont pourtant beaucoup à apprendre les uns des autres: les spécialistes des symbioses entre microorganismes et plantes et les phytopathologistes.

Avec mes collègues de l'ORSTOM Bernard Dreyfus et Jean-Paul Geiger nous avons pensé que le thème "Interactions Plantes-Microorganismes" devait être abordé sous ses deux aspects (positif et négatif), et ceci à plusieurs niveaux (écologie, épidémiologie, biochimie, génétique) car les processus sont bien souvent les mêmes. Le choix de Dakar pour cette réunion s'imposait alors, puisque depuis longtemps sont menées ici des recherches sur les symbioses à rhizobium ou actinomycètes, Dakar étant devenu le pôle d'excellence en Afrique pour ce thème. Vous aurez donc l'occasion de rencontrer de nombreux chercheurs du Sénégal et de visiter des laboratoires, des serres et des réalisations de terrain de très grande qualité. Ne laissez pas passer cette occasion, prenez des contacts, discutez (en dehors des sessions!) surtout avec vos collègues d'autres institutions, d'autres pays, qui travaillent sur un thème qui n'est pas le vôtre!

De la dizaine de Séminaires de ce type que j'ai organisé pour la Fondation Internationale pour la Science, celui-ci est le premier co-organisé et co-financé avec l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération, plus connu sous le sigle ORSTOM, et j'en suis personnellement satisfait puisque j'appartiens moi-même à l'ORSTOM. Grâce à l'apport scientifique et financier de l'ORSTOM, nous avons pu élargir le cadre habituel des Séminaires FIS en invitant des chercheurs qui ne connaissent pas encore la Fondation.

Pour eux et pour les invités de cette cérémonie d'ouverture je voudrais très brièvement rappeler que l'objectif de la Fondation est d'aider les jeunes scientifiques des pays en développement à bien commencer leur carrière de chercheur, pour qu'à l'issue de leur période de boursier ils restent des chercheurs enthousiastes malgré les conditions difficiles de travail qui sont souvent les leurs, et qu'ils deviennent des membres de la communauté scientifique internationale, au service de leur pays et de leur région. C'est un objectif très ambitieux compte tenu des ressources limitées de la FIS par rapport aux besoins, même dans le cadre limité des sciences biologiques et agronomiques que nous nous sommes fixés. Cependant nous

INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

sommes fiers de notre action, du travail réalisé par les boursiers de la FIS, dont beaucoup sont devenus des seniors connus dans leur domaine ou ont des responsabilités importantes dans l'organisation de la recherche de leur pays. Tout à l'heure nous récompenserons l'un d'eux, le Dr Sanginga, qui recevra le prix Sven Brohult du nom du Président fondateur de la FIS. Ce prix récompense tous les trois ans un boursier particulièrement actif et productif, il y avait de nombreux nominés et le choix fut difficile.

La Fondation Internationale pour la Science aura beaucoup fait si, à l'occasion de telles rencontres, des chercheurs renforcent leurs liens d'amitié et constituent des réseaux informels de scientifiques des pays en développement. Il semble heureusement que notre action soit de plus en plus reconnue, d'autres institutions nous apportant souvent leur concours je voudrais aujourd'hui remercier une fois de plus le Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale (CTA) ainsi que l'Organisation Islamique pour l'Education, les Sciences et la Culture (ISESCO) qui ont contribué au budget du Séminaire. Ce sont des partenaires fidèles qui partagent nos objectifs.

Pour terminer je voudrais remercier au nom de tous les participants et de la FIS les autorités et institutions du Sénégal qui ont accueilli cette réunion et qui ont contribué grandement à sa préparation et son succès. Mes remerciements particuliers vont à Monsieur le Ministre Magued Diouf qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider cette cérémonie d'ouverture. Etant moi-même un ancien du Sénégal où j'ai eu le plaisir de travailler près de 13 années, je me permets de vous souhaiter un fructueux séminaire et un agréable séjour à Dakar.

ALLOCUTION D'OUVERTURE DE MONSIEUR PHILIPPE MATHIEU, REPRESENTANT DE L'ORSTOM A DAKAR

Monsieur le Ministre
Monsieur le Représentant de l'ISESCO
Monsieur le Directeur de la DAST
Monsieur le Directeur Général de l'ISRA
Monsieur le Représentant de la FIS
Chers collègues,

Je voudrais tout d'abord souhaiter la bienvenue aux chercheurs ainsi qu'aux boursiers de la Fondation Internationale pour la Science, venus de tous les horizons pour participer au séminaire scientifique régional sur les Interactions Plantes-Microorganismes qui se tient aujourd'hui à Dakar, à l'initiative de la FIS.

Je remercie Monsieur le Ministre Délégué, Chargé de la Modernisation de l'Etat et de la Technologie d'avoir marqué son intérêt pour cette initiative par sa présence effective à cette séance d'ouverture.

L'ORSTOM s'est associé bien volontier à l'organisation de ce séminaire. On peut en effet rappeler que l'Institut a contribué, dès l'origine c'est à dire en 1972, à la création de cette fondation et qu'il lui a manifesté par la suite tout son intérêt et son soutien tant les enjeux lui semblaient importants en pourvoyant l'un des postes permanents de secrétaire scientifique de la fondation.

La FIS s'est située d'emblée dans une perspective internationale en accordant son soutien à de jeunes chercheurs de tous les pays en voie de développement et en mobilisant la communauté scientifique internationale.

La FIS s'est dotée des moyens de privilégier la qualité scientifique et la pertinence des projets qui lui sont soumis en s'entourant d'un réseau de conseillers scientifiques expérimentés.

Elle favorise également les échanges, les contacts entre chercheurs du nord et du sud, entre jeunes chercheurs et chercheurs expérimentés. Le séminaire qui commence aujourd'hui en est l'illustration éclatante. Les boursiers de la Fondation International pour la Science de toute l'Afrique pourront en effet exposer les résultats de leurs travaux aux côtés de ceux de scientifiques de renom.

Cette entreprise stimulante porte cette semaine sur un sujet d'importance majeure pour le maintien et l'amélioration de la fertilité des sols en Afrique à savoir les relations plantes-microorganismes, ses aspects positifs comme les symbioses plantes-rhizobium, mais également ses effets négatifs que sont les pathologies bactériennes et fongiques.

Ce sujet d'importance vitale fait appel à l'application des techniques les plus récentes de la biologie moléculaire mais implique une confrontation permanente entre travaux sur le terrain et recherche fondamentale.

Le choix du Sénégal et de Dakar pour la réunion de ce séminaire n'est pas indifférent. Dans le cadre de collaborations locales actives entre l'ISRA, l'Université, les Eaux et Forêts et

INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

l'ORSTOM, un pôle de recherches en biotechnologies se met en place, renforcé par les initiatives récentes que sont le rapprochement du Microbiological Research Center (MIRCEN) du laboratoire de microbiologie du centre ISRA-ORSTOM de Bel-Air et la création, sur ce même centre d'un laboratoire commun ISRA-ORSTOM de culture *in vitro* qui constitue un outil exceptionnel de recherche et développement.

L'implication de l'ORSTOM dans ce pôle répond à la volonté de l'Institut de faire des biotechnologies un thème prioritaire que nous développons en coopération avec plusieurs pays du sud.

Avant de terminer je tiens à remercier tous ceux qui par leur présence contribuent à la réussite de ce séminaire et en particulier l'ISESCO et le CTA qui ont bien voulu lui apporter leur précieux concours.

**ALLOCUTION DU DR ABDELAZIZ BEN OTHMAN ALTWAIJRI
DIRECTEUR GENERAL DE L'ORGANISATION ISLAMIQUE
POUR L'EDUCATION, LES SCIENCES ET LA CULTURE (ISESCO)
PRESENTE AU NOM DU DIRECTEUR GENERAL PAR
DR AMADOU OURY DONGHOL DIALLO, SPECIALISTE DE PROGRAMMES,
SECTEUR DES SCIENCES, ISESCO**

Bismillahi Rahmani Rahim

Votre Excellence, Monsieur Magued Diouf, Ministre Délégué,
Chargé de la Modernisation de l'Etat et de la Technologie
Monsieur le Représentant de la Fondation Internationale pour la Science
Monsieur le Directeur Général de l'ISRA
Monsieur le Représentant de l'ORSTOM
Monsieur le Directeur de la Recherche
Honorables Participants
Mesdames, Mesdemoiselles, Messieurs,

Assalamu Alaïkum,

C'est un plaisir et un grand honneur pour moi de vous souhaiter la bienvenue à la séance d'ouverture du séminaire intitulé "Interactions Plantes Microorganismes".

Je suis particulièrement reconnaissant à Son Excellence, Monsieur Magued Diouf, Ministre délégué, chargé de la Modernisation de l'Etat et de la Technologie, pour avoir accepté de consacrer son temps précieux à cette manifestation.

Je suis persuadé que sa présence parmi nous ce matin et son discours d'ouverture constitueront une véritable source d'inspiration pour nos travaux. Je voudrais également saisir cette occasion pour souhaiter la bienvenue aux participants qui, malgré les hautes responsabilités qui leur incombent dans leurs pays respectifs ont tenu à prendre part à cette rencontre, confirmant ainsi leurs engagements à oeuvrer pour le développement de leurs propres pays.

L'Organisation Islamique pour l'Education, les Sciences et la Culture (ISESCO), dont les relations extérieures et les activités de coopération, en tant qu'activités de soutien, de promotion, de prospection et de coordination occupent une part importante dans son action, se réjouit d'avoir contribué à la participation de jeunes scientifiques en provenance du Burkina Faso, du Mali, du Maroc, du Niger et de la Sierra Léone à ce séminaire co-organisé par la Fondation Internationale pour la Science (FIS) et par l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM) avec le concours du Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale (CTA).

Notre séminaire revêt une importance vitale pour les pays en développement dans leur action visant à l'amélioration de la production des cultures tropicales et à la protection de l'environnement et il constitue un domaine privilégié de coopération entre scientifiques de différentes spécialités (génétique, recherche agronomique, phytopathologie, microbiologie, etc...).

Excellence Monsieur le Ministre, Mesdames, Messieurs,

L'ISESCO est une organisation internationale oeuvrant dans le cadre de l'Organisation de la Conférence Islamique (OIC). Elle est spécialisée dans les domaines de l'éducation, des sciences et de la culture. Toujours soucieuse de promouvoir la coopération internationale, elle s'emploie à réaliser les objectifs contenus dans les programmes de ses plans d'action. Dans le domaine des sciences, ces programmes visent notamment:

- au perfectionnement de l'enseignement scientifique par la modernisation des programmes d'enseignement, par l'édition d'ouvrages-types pour les enseignants et par la mise à la disposition des établissements scolaires du matériel de laboratoire,
- au renforcement de la recherche scientifique et à la formation de cadres scientifiques qualifiés par l'octroi de bourses de recherche ou de perfectionnement professionnel et par l'organisation de stages de formation en vue de les encourager au développement de leurs carrières dans leurs pays,
- à l'intensification des contacts et à la consolidation des liens de coopération avec les organisations internationales oeuvrant dans les domaines de l'enseignement et de la recherche scientifique par la signature d'accords de coopération, par l'octroi d'allocutions de voyage et par l'organisation et la sponsorship de séminaires, conférences et colloques.

Je suis certain que le présent séminaire permettra aux hommes de science que vous êtes de nouer des contacts et de procéder à des échanges de points de vue sur vos méthodes de travail. Il contribuera sans nul doute au renforcement des liens de coopération entre vos communautés académiques, à la diminution de l'écart entre la prospérité des uns et la misère des autres, à la création d'un monde plus juste et plus solidaire.

L'ISESCO a déjà dans le passé collaboré avec la FIS et le CTA à l'organisation de séminaires et elle est heureuse de cosponsoriser celui-ci aux côtés de la FIS, de l'ORSTOM et du CTA. Je nourris l'espoir qu'elle aura l'occasion de collaborer de nouveau avec ces organisations en vue de promouvoir la recherche scientifique. J'adresse mes vifs remerciements à tous les organismes nationaux qui ont fait du présent séminaire une réalité. Mes remerciements vont également aux savants et technologues ici présents.

Pour terminer, permettez-moi, Excellence Monsieur le Ministre, de vous adresser mes sincères remerciements, et à travers votre auguste personne de remercier le gouvernement et le peuple sénégalais pour l'accueil chaleureux et les aménagements confortables offerts aux participants à notre séminaire.

Puisse Allah Le Tout Puissant bénir nos efforts et guider nos pas vers le droit chemin. Amen!

Wa Salamu Alaïkum.

DISCOURS D'OUVERTURE DU MINISTRE CHARGE DE LA MODERNISATION DE L'ETAT ET DE LA TECHNOLOGIE MONSIEUR MAGUED DIOUF

Monsieur le Représentant de la Fondation Internationale pour la Science (FIS)
Monsieur le Représentant de l'ISESCO
Monsieur le Directeur Général de l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA)
Mesdames et Messieurs les Séminaristes
Mesdames et Messieurs
Chers Invités

Je voudrais vous dire, tout d'abord, combien j'ai le plaisir aujourd'hui, d'être parmi vous pour présider la cérémonie d'ouverture du séminaire sur les Interactions Plantes-Microorganismes. J'en suis d'autant plus heureux que quelques mois seulement auparavant, des institutions nationales et internationales ont eu à organiser dans notre capitale, de nombreuses manifestations dans les domaines des sciences biologiques et agricoles.

L'organisation, en si peu de temps, de ces rencontres scientifiques, prouve s'il en était encore besoin, l'option irréversible de notre pays d'explorer l'ère des biotechnologies dont la maîtrise constitue aujourd'hui un enjeu capital pour la solution des problèmes dans des secteurs économiques aussi importants que l'agriculture, la santé, et l'environnement.

En effet, les biotechnologies suscitent de nos jours d'immenses espoirs et ouvrent des perspectives nouvelles pour l'élevage et l'agriculture et notre sous région sahélienne, confrontée au manque d'eau et à l'agression de diverses maladies, en attend beaucoup pour la réalisation de ses objectifs en matière de développement agricole.

A cet égard, il convient de saluer les résultats prometteurs obtenus par l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires de Dakar dans le domaine du transfert d'embryons, grâce à l'introduction de méthodes biotechnologiques, ce qui constitue un acquis intéressant pour le développement des productions animales.

C'est pourquoi, Mesdames et Messieurs, votre séminaire qui a l'ambition de réfléchir sur un secteur des biotechnologies végétales dont l'importance pour l'amélioration de la fertilité des sols est bien connue, devrait sans nul doute apporter une contribution significative à l'amélioration des conditions de vie de l'homme.

Aussi, dans cette perspective, notre pays a-t-il mis en oeuvre différents programmes de recherche parmi lesquels on peut citer entre autres:

- l'amélioration végétative des espèces forestières et les symbioses racinaires orientées vers: le clonage et la micropropagation d'individus d'élite par des techniques de culture *in vitro* et l'utilisation de microorganismes, principalement ceux fixant l'azote atmosphérique, pour l'amélioration des productions végétales et forestières; et
- le programme de renforcement des capacités de recherche-développement orienté vers les agro-industries et le secteur bio-médical.

Mesdames et Messieurs,

La recherche scientifique constitue le moteur le plus puissant du développement et identifie, dans toute société, les réelles préoccupations de la vie des hommes et des femmes auxquels elle doit proposer des solutions sûres et durables. Aussi, chaque société devrait-elle s'assurer la maîtrise de la science et de la recherche scientifique pour espérer participer à la marche du monde et à la création des richesses universelles. Mais la maîtrise de la Science et de la Technologie passe nécessairement par le développement des ressources humaines, la mise en place d'infrastructures de recherche performantes et une bonne liaison recherche-développement.

Aussi, notre pays pour le développement harmonieux des biotechnologies peut-il compter sur un potentiel scientifique et technique compétent composé de chercheurs évoluant dans les différentes structures nationales de recherche. Ces institutions comptent à leur actif des acquis scientifiques de première importance et certains de ces résultats ont fait l'objet d'applications réussies dans notre pays, mais, un effort important reste cependant à faire pour assurer une large diffusion de ces résultats dans le tissu économique national.

Toutefois, on peut se réjouir que ces résultats fort encourageants soient à la base du nouvel élan de collaboration et de coopération qui s'élabore actuellement entre l'ISRA, l'ORSTOM et l'Université, collaboration fondée sur un esprit de partenariat, dont la matérialisation s'observe à travers l'installation du programme MIRCEN au laboratoire de Microbiologie de l'ORSTOM à Dakar, et la construction du futur laboratoire ISRA-ORSTOM de culture *in vitro* initié par le Gouvernement du Sénégal avec la coopération de la France.

Vous me permettez de mentionner par ailleurs le projet CAMPUS dans le cadre duquel l'installation d'un laboratoire est prévue au Département de Biologie Végétale de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar.

Toutes ces réalisations, vous en conviendrez avec moi, constituent des instruments précieux d'investigation pour notre communauté scientifique nationale et permettra, j'en suis persuadé, à notre pays de disposer de structures optimales pour accomplir des avancées significatives vers une meilleure valorisation des biotechnologies végétales.

Mesdames, Messieurs,

Notre dispositif national de Recherche Scientifique, ouvert sur le monde, voudrait sans triomphalisme aucun se prévaloir d'être un exemple dans la sous-région d'Afrique de l'Ouest.

La Recherche Scientifique Sénégalaise s'est fixée entre autres comme objectifs:

- d'améliorer par la génétique et les biotechnologies, les espèces animales et les variétés végétales en vue de promouvoir une agriculture performante; et
- de transférer auprès du paysan, les paquets technologiques qui doivent lui assurer une meilleure productivité et la réduction du coût de production.

Tout en développant ses capacités nationales, le Sénégal s'est également ouvert à la coopération internationale afin de participer, dans ce village planétaire, au forum des idées pour le progrès et le développement de la science qui, par essence est universelle.

C'est dans ce cadre que je voudrais, Mesdames et Messieurs, souligner que notre pays, dans le cadre de sa politique d'ouverture, est membre du Réseau Africain de Biosciences créé par l'UNESCO en 1981, du Réseau de Biotechnologie Animale créé par l'Université des Réseaux d'Expression Françaises (UREF), du Réseau International des biotechnologies, et enfin du Centre International de Génie Génétique et de Biotechnologie (CIGGB).

Vous me permettez, au passage, de signaler que dans le cadre de la préparation de la conférence des Nations Unies sur l'environnement et le développement prévue au Brésil au mois de juin 1992, notre pays a pris une part active au symposium ministériel Pan Africain sur la Biotechnologie, tenu à Alger au début de ce mois et qui a pris l'importante décision de créer une Agence de Développement des Biotechnologies en Afrique.

C'est pour ces différentes raisons, Mesdames et Messieurs, que mon Département accorde une grande importance à votre séminaire qui, de par la diversité des origines et de la qualité des participants, devrait jeter les bases d'une harmonisation des connaissances, mais également d'une bonne intégration des intérêts. Je suis persuadé que la Fondation Internationale pour la Science (FIS) pourra utilement y contribuer par son audience internationale.

Pour ma part, j'ose espérer que les éminents scientifiques que vous êtes, mettront à profit les six jours que vous allez passer ensemble pour murir la réflexion autour de la préservation d'une écologie plus fiable mais également d'une agriculture plus productive et plus compétitive au profit de nos pays respectifs.

A cet égard, je puis vous assurer, que le Gouvernement du Sénégal, qui accorde une importance particulière à la Recherche Scientifique et Technique, étudiera, avec toute l'attention requise, les recommandations et suggestions qui sortiront de notre séminaire.

Permettez-moi, Mesdames et Messieurs, avant de terminer, de transmettre mes sincères remerciements à la Fondation Internationale pour la Science pour le soutien et l'appui dynamique qu'elle ne cesse d'apporter aux jeunes chercheurs de nos pays en voie de développement et pour toutes les actions qu'elle mène dans notre pays. Le rôle éminent positif que joue la FIS dans le développement des sciences biologiques et agricoles permettra, j'en suis sûr, à nos jeunes scientifiques de participer activement à la production du savoir et du savoir-faire au sein de la communauté scientifique internationale. Je voudrais également associer à ces remerciements, toutes les organisations ainsi que tous les experts nationaux et internationaux qui ont bien voulu prendre part à cet atelier, et exprimer ma conviction que les résultats de votre séminaire nous donneront de nouvelles raisons d'espérer quant au développement économique et social de nos pays.

C'est sur cette note d'espoir que je déclare ouvert le séminaire international sur les Interactions Plantes-Microorganismes.

Je vous remercie de votre attention.

**THE 1990 SVEN BROHULT AWARD
DELIVERED BY DR BJORN LUNDGREN**

Mr Chairman, Ladies and Gentlemen

It is a great pleasure to have been asked by IFS to be the one to present the Sven Brohult Award to the 1990 winner of this prestigious prize, Dr N. Sanginga. The original request was for me to come to the IFS General Assembly Meeting, scheduled for January 1991 in Harare, Zimbabwe and hand over the prize. At the same time, Dr Glynn Bowen of CSIRO, Australia, who had originally nominated Dr Sanginga for the award, was asked to introduce him and his work to the assembly. Unfortunately, Dr Bowen was unable to attend personally, but he wrote an introduction which I was asked to read on his behalf at the time of handing over the award. In the end, the war in the Gulf area led to a postponement of the meeting in Harare and it was decided that this meeting would be the time and venue for the ceremony. Thus, I will start by reading Dr Bowen's original presentation speech which I will faithfully follow with some very minor updating, which has been made necessary by the fact that the speech was originally written in late 1990. After reading Dr Bowen's words, I will add a few reflections of my own before presenting the award.

**INTRODUCTION OF DR N. SANGINGA,
1990 SVEN BROHULT AWARDEE**

Dr Glynn BOWEN

*(formerly of the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques
in Food and Agriculture, Vienna, Austria, now with CSIRO, Australia)*

In introducing the very deserving winner of the Sven Brohult Award, Dr N. Sanginga, a national of Zaire, I would first like to apologize for my inability to be present personally, despite the generous invitation of IFS. Secondly, and most important, I would like to pay tribute to the vision and initiative of the founders of IFS, one of whom we honour today, Dr Sven Brohult, the first president of IFS - and to its vigorous and effective programme. It has been a great force for the development of young scientists in many important fields in developing countries and IFS well deserves to be congratulated on this. I have been associated with IFS as a scientific advisor/evaluator for almost 15 years, and I find it very interesting that the standard of submissions has increased considerably over that time. I believe that this reflects an evolution of scientific quality in developing countries, assisted greatly by activities such as those sponsored by IFS. The problems of developing countries, e.g. adequate food production from sustainable low input agriculture, soil erosion, desertification, etc., are many - and they are not all going to be solved easily or quickly. However, the building of a body of good scientists skilled in basic and applied fields, prepared to develop "relevant" science in their countries and to translate findings from other countries to their own situation is important in solving many of these problems.

I met Sanginga at the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, located in Vienna. The mission of this Division is to train scientists in developing countries in the use of nuclear techniques in research, integrated with non-nuclear techniques, to improve primary production. Its modes of function are training courses, coordinated research programmes and technical cooperation projects. I consider myself privileged to have

been involved in these activities in the areas of soil fertility/plant nutrition/plant microbiology over the last five years. I hope all of my audience today have experienced the thrill, as I have, of seeing promising young scientists develop and knowing that in some small way, one is contributing to solutions of problems indicated in the foregoing.

This of course brings me to the main purpose of this address - to introduce to you the winner of the 1990 Sven Brohult Award, a recognition of excellence of a developing country scientist. I am sure there were many worthy nominations but there can be only one winner and I congratulate Dr Sanginga on being that individual.

Dr Sanginga will be addressing you shortly on the problems with which his research has been concerned, and his approaches and results so far, so I will only briefly set the stage for that, concentrating on a few of his activities.

Dr Sanginga, at the age of 39, has made outstanding contributions in the important field of nodulation and biological nitrogen fixation by leguminous and non-leguminous trees. The optimization of nitrogen fixation by trees is critical in maintaining productivity in low input sustainable agriculture, alley cropping systems, and other agroforestry systems, in low rainfall silvo-pastoral systems and in restoring soil fertility to damaged soils. In addition to their substantial contributions of nitrogen (and organic matter) for associated or succeeding crops, they are also a central factor in arresting soil erosion and desertification, both of which are scourges of agriculture in many developing countries and especially in Africa. Moreover, nitrogen fixing trees provide fuelwood for agricultural communities, the scarcity of which is becoming critical for the inhabitants of many developing countries.

The population growth in 35 out of 44 sub-Saharan countries has now outstripped food production. Forty out of 50 African countries surveyed by the FAO have reported substantial declines in soil fertility and increases in soil erosion and desertification. Wood is the major source of fuel for over 60% of the world's population. A major fuelwood crisis has occurred largely due to deforestation to make room for agriculture. In Africa, 55 million people are now living in a fuelwood crisis and this figure is expected to increase ten-fold by the year 2000. Eleven million hectares of forest are lost annually in the developing world. Desertification occurs with a further loss of six million hectares annually.

*From 1982 to 1985, Sanginga did his PhD research in Nigeria at the International Institute for Tropical Agriculture. He studied the Rhizobium requirements of and nitrogen fixation by *Leucaena leucocephala*, the most important tree used in agroforestry so far, and the subsequent effects on crop yield. These studies indicated large differences in the nitrogen-fixing ability of different Rhizobium strains on this plant, which resulted in different growth of *Leucaena* and markedly different effects on subsequent maize crops. For example, inoculation with one Rhizobium strain raised subsequent maize grain yield from 2.2 t/ha to 3.6 t/ha while another raised it to 4.6 t/ha. This work also showed that approximately half of the nitrogen fixed was in the below-ground parts, a factor not previously realized. The aforementioned studies were among the first definitive studies in this area. Furthermore, Dr Sanginga was one of the first investigators to critically compare ¹⁵N methods of measuring nitrogen fixation with other methods for trees.*

From 1986 to 1987 he was a Post Doctoral Research Fellow at the University of Zimbabwe, during which he was the recipient of an IFS grant. Sanginga continued his detailed studies on Rhizobium relations/nitrogen fixation of leguminous trees for Nigeria, Zaire and Zimbabwe, also examining the effect of Leucaena and Eucalyptus on subsequent maize crops. He also demonstrated that native soil Rhizobium strains were highly effective for some tree legumes but ineffective for others - indicating great potential for inoculation responses to selected Rhizobium strains.

At this time, Sanginga perceived the immense potential of selecting genotypes within tree species for high nitrogen fixation, a theme he has followed since, with great success, first within the Joint FAO/IAEA Programme at the International Atomic Energy Agency laboratories at Seibersdorf just outside of Vienna, where he worked for 2½ years on problems of developing countries, and for the last few years in the IITA laboratories in Nigeria, where he is an IFS grantee. In glasshouse studies he has demonstrated major differences in nitrogen fixation between genotypes and provenances of leguminous trees such as Leucaena, Gliricidia and Faidherbia albida (synonymous with Acacia albida, an acacia native to Africa) and the very important non-leguminous nitrogen-fixing trees, Allocasuarina and Casuarina. Furthermore, in glasshouse studies, he demonstrated two to three-fold differences in growth within tree species in low phosphate soils, one of the major constraints to productivity in most developing countries. The great potential of such genotypic selection is obvious, and, now back in Africa, Sanginga has tested some of these glasshouse studies in the field. I do not wish to steal his thunder, so I will only say that so far, some of the glasshouse findings appear to be holding up in the field.

Sanginga has done supplementary studies on the effect of management practices, such as phosphate additions, tree pruning, etc., on nitrogen fixation and the transfer of fixed nitrogen to associated crops and I am sure he will tell you something about that work also.

In 1989, the International Institute for Tropical Agriculture in Nigeria, recognizing Sanginga's enormous and valuable knowledge of the management of nitrogen fixation by trees in agroforestry systems, invited him to the position of Assistant Coordinator for the Alley Farming Network for Tropical Africa. As well as continuing his research, he is assisting the development of this area in many African countries. He has recently received a further IFS grant to assist him in his research.

I submit that in a period of just over 10 years, Sanginga has made many outstanding and original contributions (e.g., some 38 papers) which are of extremely high significance to developing country agriculture. He is now undoubtedly one of the world leaders in his field and will continue to influence the area both by his own research and his assistance to other developing country scientists.

Finally, I must pay tribute not only to Sanginga's excellence as a scientist and his perception of important problems and their practical solution, but also to his communication skills and his extremely pleasant, quiet personality, which you will experience this week. It is a pleasure to know Sanginga, I respect him greatly and again I congratulate him on this most prestigious award, which he so rightly deserves.

I thank IFS for this opportunity to address you, even "in absentia" and I wish IFS and this meeting every success.

Those were the words of Dr Glynn Bowen. Let me now add a few of my own.

Agroforestry is still a relatively "small" discipline. Although it is rapidly growing in terms of the number of scientists and institutions involved, it can still be surveyed if you sit in a position such as Director General of ICRAF, which I was privileged to do until six months or so ago. It was in that capacity that I came to know Dr Sanginga, some years ago, when he came to attend meetings at ICRAF. I quickly realized that he was a very gifted scientist. He belongs to a group of African agriculture and forestry researchers that has taken a strong and active leadership in agroforestry research throughout the continent. Like Sanginga, many of them are associated with international or regional institutions and programmes (e.g. IITA, ICRAF, AFNETA, AFRENA, ILCA), and there is a truly pan-African approach to where people work - Sanginga, a Zairian is based in Nigeria, an Ethiopian scientist in Cameroon, a Senegalese in Rwanda, a Ghanaian in Burundi, a Kenyan in Malawi, a Ugandan in Zambia, etc. These scientists, two or three dozen in all, know each other very well through collaborative work, meetings, workshops, etc. They also work in very close collaboration with several dozen forestry and agricultural scientists in national institutions which are linked together in various technology (AFNETA), commodity (PANESA) or ecoregional (AFRENA) networks. These two facts have laid the foundation for a rather unique situation in sub-Saharan Africa. In the relatively short timespan of 10 years, a truly regional/international and multidisciplinary research effort is under way in Africa with what is very close to a critical minimum mass of scientists in the various component specialities which are needed in agroforestry. It has been a genuine privilege to have been associated with this development and to assist it in a modest way.

Therefore, when I now ask Dr Sanginga to step forward to receive the 1990 Sven Brohult award from the International Foundation for Science, I feel that the award is both to him as a richly deserving scientist within a field which is at the forefront of plant sciences today, and to him as a representative of a very interesting group of African agroforestry scientists, a group that is going to be an intellectual power point in future agroforestry research on a worldwide basis.

NITROGEN FIXATION BY TREES AND ITS CONTRIBUTION TO THE NITROGEN STATUS OF SOILS OR ASSOCIATED CROPS

N. SANGINGA

Coordinateur Adjoint AFNETA - International Institute of Tropical Agriculture (IITA)
P.O. Box 5320 Oyo Road Ibadan Nigeria

Abstract: Nitrogen-fixing trees (NFTs) used in agroforestry systems can restore or maintain soil fertility. They are very important in tropical soil management for sustained agricultural productivity, and controlling soil erosion and desertification as well as producing fuelwood. However, few studies have been conducted on nodulation and biological N_2 fixation by different trees/Rhizobium or Frankia symbioses, key factors in the successful growth of NFTs in N-deficient soils and the transfer of the N_2 fixed (and extra organic matter) to succeeding or associated crops. Research experiments have been carried out over a 10-year period in tropical Africa to maximize the contribution of this natural and inexpensive source of N in agroforestry systems. Data gathered on the quantification of proportions and amounts of N_2 fixed and the effects of plant species and genotypes, microbial symbiont, plant age, management and environment factors on N_2 fixation, and N transfer to associated crops are reviewed. Some tree species such as *Leucaena leucocephala* and *Gliricidia sepium* can fix 200-300 kg while others such as *Faidherbia albida* may fix only one tenth as much. However, there are large genotype/microbial symbiont differences, not only in the N_2 fixed, but also in the tolerance of low P soils and possibly other deleterious factors. There are also large effects of soil environment and management factors on fixation. Nitrogen fixation of field-inoculated *L. leucocephala* was depressed by 46% and 74% with 40 and 80 kg ha^{-1} respectively. Approximately half of the fixed N_2 can be in below-ground parts and its release may be managed by cutting regimes. Although large quantities of N are harvested with *L. leucocephala* prunings (300 kg $N ha^{-1}$ in six months), the efficiency of utilization (39%) of this N by maize is low compared to inorganic N fertilizer at 80 kg $N ha^{-1}$. Below ground transfer (root turnover and nodule decay) was estimated at 32 kg ha^{-1} and 25 kg ha^{-1} was the inorganic N equivalent from N_2 fixed symbiotically by *L. leucocephala* when inoculated with an appropriate and effective Rhizobium strain. The factors and research needs for improving N_2 fixed in trees and its contribution to soil fertility status are discussed.

Résumé: Les arbres fixateurs d'azote (AFA) utilisés dans les systèmes agroforestiers peuvent aider à restaurer ou à maintenir la fertilité du sol. Ils jouent un rôle très important dans la gestion des sols tropicaux pour assurer la durabilité de la production agricole et lutter contre l'érosion et la désertification tout en fournissant du bois de feu. A ce jour, peu d'études portent sur la nodulation et la fixation de l'azote de différents arbres vivant en symbiose avec Rhizobium ou Frankia. Ces symbiontes constituent les facteurs clés d'une bonne croissance des AFA sur les sols pauvres en azote et du transfert d'azote fixé (et de matières extra-organiques) à des cultures successives ou associées. Des expériences ont été conduites pendant dix ans en Afrique tropicale afin d'optimiser la contribution potentielle de cette source naturelle et peu coûteuse d'azote à l'agroforesterie. Les quantités d'azote fixé en relation avec les génotypes, les espèces végétales, l'âge de la plante, les symbiontes microbiens, les conditions écologiques, la gestion, et l'environnement des sols, la fixation et le transfert d'azote sont exposés dans cette communication. Certaines espèces telles que *Leucaena leucocephala* et *Gliricidia sepium* peuvent fixer 200 à 300 kg d'azote alors que d'autres comme *Faidherbia albida* ne peuvent fixer qu'un dixième de cette valeur. Il n'existe toutefois de grandes différences entre génotypes et symbiontes microbiens, non seulement pour ce qui est

de l'azote fixé mais aussi de la tolérance des sols. En outre, la fixation est largement influencée par l'environnement et la gestion des sols. Le taux de fixation d'azote de *L. leucocephala* inoculé au champ baisse de 46 et 74% respectivement dans le cas d'apports de 40 et 80 kg par ha⁻¹. Une moitié environ de l'azote fixé peut se trouver dans les parties souterraines et sa libération peut se faire progressivement par l'application de régimes de coupe. Bien qu'on en obtienne de grandes quantités par l'élagage de *L. leucocephala* (300 kg N par ha en six mois), l'efficacité d'utilisation (39%) de l'azote ainsi récolté par le maïs est faible si on la compare à celle de l'engrais inorganique azoté à 80 kg N par ha⁻¹. Le transfert souterrain (renouvellement racinaire et dépérissement des nodules) a été évalué à 32 kg par ha⁻¹ tandis que l'équivalent inorganique azoté obtenu à partir de l'azote fixé symbiotiquement par *L. leucocephala* inoculé par une souche efficace et adaptée de *Rhizobium* n'était que de 25 kg par ha⁻¹. La recherche sur les facteurs impliqués dans l'amélioration de ce processus à la restauration ou au maintien de la fertilité des sols sont discutées dans les conclusions.

More attention has recently been focused on fertility maintenance and the improvement of indigenous systems, where trees and shrubs that dominate the bush fallows have been found to be effective soil fertility restorers (Wilson and Kang 1980). Intensive cultivation in response to increasing population has led to drastically reduced soil fertility and increased soil erosion in the humid and semi-arid tropics. In drier areas, overgrazing (and harvesting of trees for fuelwood) has been the major factor in reduced productivity, increased soil erosion and desertification (6 million ha per year). In addition, much of tropical Africa suffers from acute fuelwood deficiencies, although it is the main source of energy and cannot easily be replaced by other sources. The food, land and fuelwood crises are clearly interwoven. Attempts to improve the productivity of traditional systems by introducing high input technology such as fertilizer have not been widely adopted. Moreover, 65% of tropical soils are fragile and therefore deteriorate rapidly under intensive cultivation.

A possible way to solve (or alleviate) the problems is to use the trees appropriately in agricultural/pastoral systems. The judicious use of trees in the rural environment can provide the ecological framework within which food, wood and fibre production can be integrated, preserving and enhancing the quality of land-use systems. Trees have particular advantages over other systems by their perennial nature, extensive root system and frequently high biomass. Moreover, annual planting is not required, and once the trees are established, they play a year-round soil conservation role. They are multipurpose, providing not only shade and wind protection, but also fuelwood and leaf material for manure for associated crops, or fodder for animals. Nitrogen fixing trees (in association with the appropriate microorganisms such as *Rhizobium*, *Frankia* and mycorrhizal fungi) are particularly important because they can grow in N- and phosphorus-deficient soils and can restore soil fertility by the organic matter and N they add to the soil.

The potential of such trees is already apparent in established agroforestry systems such as alley cropping in the sub-humid (Kang *et al.* 1981-1985) and humid tropics (Gichuru and Kang 1990). Many agricultural and pastoral systems containing trees are used by indigenous farmers e.g. *Erythrina* and *Grevillea robusta* in coffee and tea plantations in East Africa, and

systems based on *Faidherbia albida* in the West African Sahel (Charreau and Vidal 1965). Such systems have been found to maintain and sometimes enhance soil fertility.

However, despite world recognition of the potential of these trees, especially NFTs in agroforestry systems and silvopastoral systems, there is a great lack of knowledge on the management of N_2 fixation by trees in such systems. Very few studies have been performed to identify potentially high N_2 fixing species. Even with successful tree legumes such as *L. leucocephala* there has been no critical study of the amounts of N_2 fixed compared with N taken up from the soil, nutritional constraints to N_2 fixation, and, in particular, the effect of management practices on N_2 fixation e.g. time and severity of cutting, on transfer of N to soil for associated crops and changes in soil characteristics due to the trees.

The importance of NFTs leads to the question of how we can maximize or optimize their effects and how we can manage N_2 fixation and the transfer of N to associated or successive plantings. This paper briefly discusses data gathered during 10 years of research in experiments carried out in three different agroecological zones of tropical Africa on N_2 fixation of known NFTs in use in agroforestry and soil conservation. It also suggests some potentially rich areas for improvement of N_2 fixation and its transfer to associated crops.

MATERIALS AND METHODS

The experiments were conducted in laboratories, greenhouses and fields at the International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan, Nigeria (Transition forest-savanna) in Yangambi, Zaire (Humid forest), Domboshawa, Zimbabwe (Savanna, miombo woodland) and at the International Atomic Energy Agency (IAEA), Seibersdorf, Austria to back up research done in the field in the foregoing sites in sub-saharan tropical Africa.

- *Soil characteristics:* The soils used in all these experiments were low in the major nutrient elements, especially N and available P.

- *Tree species:* Known NFTs in agroforestry were used in the first instance. Among these were *L. leucocephala*, *G. sepium*, *Faidherbia albida*, *Casuarina equisetifolia* and *C. cunninghamiana*. Some leguminous non- N_2 -fixing trees such as *Cassia siamea* and *C. spectabilis* and non-leguminous species such as *Eucalyptus* were used as reference trees to measure N_2 fixed in NFTs. Seeds of the foregoing tree species were always surface-sterilized before use.

- *Rhizobium and Frankia strains, cultivation and inoculation:* Strains of *Frankia* used for inoculum were ORS 0021001 isolated from *C. equisetifolia* (Diem *et al.* 1983), and HFP 020203 from *C. cunninghamiana* (Zhang *et al.* 1984). These had been shown to be effective for the respective species. The inoculum was prepared and applied to seedlings following the methods described by Baker and O'Keefe (1984).

Strains of *Rhizobium* spp. used for inoculation included IRc 1050, IRc 1045, TAL 1145, USDA 3409 for *L. leucocephala*; ASL 14 and IRc 1048 for *F. albida* and SP 14, SP 35, SP 36, SP 37, SP 40 and SP 44 for *G. sepium*. These strains had previously proved effective on

their respective hosts. They were cultured in yeast mannitol broth and the inoculation was performed at sowing following procedures described by Vincent (1974).

- *Measurement of N₂ fixation:* The methods used for measuring N₂ fixation were the total N difference (TND) method, the ¹⁵N acetylene reduction assay (Hardy *et al.* 1968), the isotope dilution methodology (Fried and Middleboe 1977) and the A value approach (Fried and Broeshart 1975).

The uninoculated NFT treatments and non-N₂-fixing trees e.g. *C. siamea*, *C. spectabilis* and *Eucalyptus* spp. were used as reference plants for N₂-fixation estimations.

RESULTS AND DISCUSSION

Microbial component and occurrence of nodulation

Until recently only very few tree species had been examined for N₂ fixing root nodules (Allen and Allen 1981). Our knowledge of NFTs is still very limited, with the exception of some species (e.g. *L. leucocephala* and *G. sepium*). However, questions asked concerning the nodulation and N₂ fixation by trees are not markedly different from those asked about agriculturally important pasture and crop legumes. Some questions include: is it necessary to inoculate the particular tree species, if there are rhizobia in the soil are they effective? If suitable rhizobia are not present are there suitable strains available or is there a need to select strains and to produce a suitable inoculant? Following inoculation did the strains colonize the rhizosphere, nodulate the host and fix N₂? A number of experiments were conducted to answer some of these questions.

Rhizobium strains isolated from *L. leucocephala*, *Sesbania rostrata*, *S. grandiflora*, *S. punctata*, *Tephrosia vogelii*, *Acacia albida* and *Vigna unguiculata* growing in Nigerian soils were characterized and tested for their ability to nodulate and fix atmospheric N with *L. leucocephala*. Isolates from *L. leucocephala*, *S. rostrata*, *S. grandiflora* and *S. punctata* were fast growing and produced acid, while those from *A. albida*, *T. vogeli* and *V. unguiculata* were slow growing and acid producers. The effectiveness of the rhizobia isolates on *L. leucocephala* was tested in Leonard jars. Isolates from all plant species except those from *S. grandiflora* and *V. unguiculata* nodulated *L. leucocephala* but a wide range of effectiveness was observed. Based on this experiment, the 10 most promising rhizobia were screened for effectiveness in potted soils collected at IITA, Ibadan (transition forest savanna), and at Fashola (Savanna, 70 km north of IITA). Establishment of *L. leucocephala* was poor in soils without previous history of *L. leucocephala* cultivation due to the presence of only a few native *Leucaena* rhizobia (<1000 g⁻¹ soil). *Rhizobium* isolates IRc 1045 and IRc 1050 obtained from *L. leucocephala* grown at Fashola and IITA were found to be the most effective and competitive (Sanginga *et al.* 1989b).

Nitrogen fixing trees and their rhizobia exhibit a degree of specificity. For example, not all species within the *Acacia* genus will be nodulated by the one bacterial strain. It is therefore important to determine the degree of host specificity of the selected NFT species to help predict the need to inoculate them at sowing, and to develop a strain that nodulates and fixes

nitrogen with many of the useful species if possible (promiscuous strain). Conversely, a promiscuous host is a NFT that may nodulate effectively in a soil in which the *Rhizobium* population may be small.

Taking into account the only data reported in tropical Africa (Dreyfus and Dommergues 1981, Sanginga *et al.* 1987) one can classify NFTs into three major groups: group 1, which nodulates with fast-growing strains (e.g. *L. leucocephala*, *S. rostrata*, *Sesbania* sp., *Acacia farnesiana*, *A. nilotica*, *A. raddiana* and *A. senegal*), group 2, which nodulates both with fast and slow-growing strains (e.g. *Acacia seyal*, *A. cyanophylla*, *Parasponia* spp.) and group 3, which nodulates with slow-growing strains (e.g. *F. albida*, *A. holocericea*, *A. mearnsii*, *T. vogelii* and *G. sepium*).

The first group is considered to be specific and exhibits a symbiotic range narrower than that of the other two groups belonging probably to the "cowpea miscellaneous" type which inhabit most of the tropical soils (Vincent 1970) now called *Bradyrhizobium*. The strains of fast-growing rhizobia associated with group 1 NFTs are probably related to the "advanced degenerate forms" (Norris 1956) represented by the fast-growing rhizobia.

The practical implication of the specificity of group 1 is that their establishment requires inoculation with the compatible fast-growing strains, which are generally less ubiquitous than the typical *Bradyrhizobium*. This explains the spectacular response to inoculation of *L. leucocephala* with *Rhizobium* IRc 1045 or IRc 1050 (Sanginga *et al.* 1985, 1986; Mafuka 1984) in the field at IITA and Fashola in Nigeria. At both places inoculated plants produced more N and dry matter than the controls. This effect was statistically equivalent to the application of 150 kg ha⁻¹ of urea (Table 1). Furthermore, the strains survived and competed well in the field, as was shown in observations made eight years after their establishment (Sanginga and Mulongoy, unpublished). Inoculation of field-grown *A. mearnsii* and *F. albida* rarely results in a significant yield increase since most tropical soils harbour the competent rhizobia of the cowpea miscellany (Dommergues 1987).

Another experiment included six strains of *Rhizobium* spp. and two methods of *G. sepium* inoculation i.e. seed or soil inoculation. The plants were harvested 14, 35 and 53 weeks after planting. In the first harvest, significant differences were found between the number of nodules and the percentage and amount of N₂ fixed. There was also a significant correlation between the number of nodules and the amount of N₂ fixed ($r=0.92$, $P=0.05$).

No correlation was observed in the final harvest, although there were significant differences between the number of nodules and the percentage of N₂ derived from the atmosphere. The amount of N₂ fixed increased with time (from an average of 27% at the first harvest to 58% at the final harvest) and was influenced by the *Rhizobium* spp. strain and the method of inoculation. It ranged from 36% for *Rhizobium* spp. strain SP 14 to 71% for *Rhizobium* SP 44 at the last harvest. Values for the percentage of atmosphere-derived N₂ obtained by soil inoculation were slightly higher than those obtained by seed inoculation (Table 2).

Table 1. The effect of urea fertilizer and inoculation with *Rhizobium* on nodulation, growth and nitrogen fixation on *L. leucocephala* at IITA and Fashola, Nigeria, at 24 weeks after planting (Sanginga *et al.* 1988)

Treatment	Nodules (no./plant) ^a	Nodules from inoculant strains (%)	Nodules dry weight ^a (mg/plant)	Shoot dry weight (g/plant)	Shoot N (kg/ha)	N fixed (kg/ha)
Fashola						
Uninoculated	36	69	179	26	82	ND ^b
150 kg/ N/ha	36	69	87	72	232	ND
<i>Rhizobium</i> IRc 1050	40	78	485	79	228	ND
<i>Rhizobium</i> IRc 1045	15	94	174	68	209	ND
IITA						
Uninoculated	0	0	0	51	174	0
150 kg N/ha	0	0	0	130	445	0
<i>Rhizobium</i> IRc 1050	17	100	187	103	398	224
<i>Rhizobium</i> IRc 1045	34	100	277	121	448	274
LSD (5%)						
Fashola	11	ND	23	12	53	ND
IITA	12	ND	25	22	66	ND

^a At 12 weeks after planting. ^b Not determined

Plant component and genotypic variation in N₂ fixed

Variation in nodulation and N₂ fixation by leguminous trees e.g. *G. sepium*, *L. leucocephala* and *F. albida* with *Rhizobium* spp. symbiosis and by actinorhizal plant species e.g. *C. equisetifolia* and *C. cunninghamiana* with *Frankia* symbiosis was examined in pot and field experiments using ¹⁵N labelling techniques and the total N difference method. In all these experiments, different tree provenances (minimum 10) were used. The N treatment for each provenance studied included (i) ambient soil plus 20 mg N kg⁻¹ and inoculation with *Rhizobium* or *Frankia* spp., (ii) ambient soil N plus 20 mg N kg⁻¹ soil, but with no inoculation, and (iii) ambient soil N in uninoculated plants with 100 mg N kg⁻¹ soil. For the 20 mg N rate, 10 atom % ¹⁵N excess N was applied in solution to the inoculated and control plants and for the 100 mg N rate, the ¹⁵N enrichment was 2 atom % ¹⁵N excess.

On the average, *L. leucocephala* derived about 65% of its total N from atmospheric N₂ compared to about 20% by *F. albida*. Significant differences in the percentage of N derived from atmospheric N₂ (%Nd_{fa}) occurred between provenances or isolines within species. The % Nd_{fa} ranged from 37 to 74 within *L. leucocephala* and from 6 to 37 within *F. albida* (equivalent to 20-50 mg N plant⁻¹ and 4-37 mg N plant⁻¹ for the two species over three months, respectively) and was correlated with the nodule mass ($r=0.91$). The course of time for N₂ fixation of three selected provenances (low, intermediate and good fixers) was followed at 12-week intervals over a 36-week period. The percentage of Nd_{fa} of all provenances and

INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

isolines increased with time and with the exception of one of the *L. leucocephala* provenances (Table 3).

Table 2. The effect of different strains of *Rhizobium* spp. and inoculation methods on % Ndfa by *Gliricidia sepium* provenance 33/85*

Strains and inoculation		1st harvest	2nd harvest	3rd harvest	4th harvest
Seed inoculation	SP 14	22	36	58	59
	SP 35	33	30	63	56
	SP 36	22	30	62	61
	SP 37	13	22	47	54
	SP 40	18	31	51	54
	SP 44	12	14	42	58
Soil inoculation	SP 14	11	23	45	47
	SP 35	29	42	68	58
	SP 36	41	44	68	62
	SP 37	32	49	69	65
	SP 40	49	55	74	65
	SP 44	45	57	72	71
LSD (0.05) (1)		23	20	19	17

LSD, least significant difference, (1) comparing *Rhizobium* spp. strains and methods of inoculation and (2) comparing different harvest periods. *Sanginga *et al.* 1991 *Biol. Fert. Soils* 11: 273-278

Table 3. Proportions and amounts of N₂ fixed by selected provenances on isolines of *L. leucocephala* and *F. albida* at 12, 24 and 36 WAP (weeks after planting)*

	% Ndfa			N fixed (mg plant ⁻¹)		
	12 WAP	24 WAP	36 WAP	12 WAP	24 WAP	36 WAP
<i>L. leucocephala</i>						
K636	74	71	80	51	61	232
Ghana	59	66	77	21	28	145
K28	64	70	81	30	59	213
<i>F. albida</i>						
Zimbabwe	6	31	58	5	11	58
Mali	15	31	48	3	4	40
Niger	37	37	43	9	7	32
LSD 5% (1)	5	5	3	8	12	58
(2)	2	2	NS	5	NS	21

(1) For comparing provenances. (2) For comparing harvest periods. * Sanginga *et al.* *Plant and Soil* 1990 127, 169-178.

Similar significant differences in the proportions and amounts of N_2 fixed in two *Casuarina* species were observed in the same growing conditions. *Casuarina equisetifolia* derived an average of 63% or 45 mg N plant⁻¹ from atmospheric N_2 fixation, compared to 43% or 22 mg N plant⁻¹ by *C. cunninghamiana*. Nitrogen fixation also varied substantially within provenances of each species with the percentage of Ndfa ranging from 14 to 76% for the *C. cunninghamiana* provenances and from 25 to 75% within *C. equisetifolia*. The growth of *C. equisetifolia* and *C. cunninghamiana* increased with either inoculation with *Frankia* or N fertilizer additions, but marked differences developed between these N treatments with time (Sanginga *et al.* 1990a).

Variation in nodulation and N_2 fixation by 25 provenances of *G. sepium/Rhizobium* spp. symbiosis was also studied in greenhouse experiments. On the average, *G. sepium* derived 45% of its total N from atmospheric N_2 . The percentage of Ndfa ranged from 26 to 68% between provenances (Sanginga *et al.* 1991b).

The growth of inoculated plants was generally more variable than that of plants that were dependent on soil fertilizer N. This variation in the growth of the inoculated plants was thus due to the large differences in the N_2 -fixing abilities than to intrinsic growth differences. There is increasing evidence of large genotype/provenance differences with NFTs in their N_2 fixation. Such differences are being confirmed in field studies. This has great implications for N_2 fixation in agroforestry. Vegetative propagation, which is often relatively easy with tree species, could lead to rapid and significant farmer implementation. However, selection for high N_2 fixation cannot be the only consideration in mixed ecosystems; for example, it is necessary to select for tolerance of stress conditions as well.

Measurement of N_2 fixed in NFTs

There are few estimates of N_2 fixation by NFTs and often based on methods that are susceptible to errors. One of the NFTs that have caught the main interest is the fast-growing widespread *L. leucocephala*. This species has been reported to fix large amounts of N_2 . Annual N yields between 250 and 580 kg ha⁻¹ yr⁻¹ have been reported in Hawaii (Guevarra 1976) and Nigeria (Kang *et al.* 1981). The amounts are the accumulation of N in leafy matter harvested several times during one year. Hogberg and Kvarnstrom (1982) used the acetylene reduction method and found annual fixations of 110 ± 30 kg N ha⁻¹ in Tanzania. The acetylene reduction assay (Hardy *et al.* 1968) which is proved to be very useful for laboratory screening in N_2 fixation, has serious limitations for symbiosis evaluation in the field (Fried *et al.* 1983). Sanginga *et al.* (1988a), taking advantage of the specific *Rhizobium* requirements of *L. leucocephala* estimated N_2 fixation by the difference methods with the uninoculated and non-nodulated *L. leucocephala* as the non-fixing control. They found that *L. leucocephala* fixed about 250 kg N ha⁻¹ in six months equivalent to about 45% of the total plant N.

However, none of these methods is perfect and they have already been appropriately criticized (Danso *et al.* 1986). They provide only indirect measurements of N_2 and cannot distinguish between N derived from the atmosphere, soil or fertilizer. This information is useful for the good management of NFTs in agroforestry systems. The most reliable methods are probably

the isotopic ones. These make it possible to distinguish N_2 derived through symbiotic N_2 fixation and from all other sources (Fried and Broeshart 1975, Fried and Middleboe 1977).

The importance of trees in agroforestry makes it crucial to assess the magnitude of N_2 fixed by them directly in the field. The long-term evaluation of the N_2 -fixing potential and the actual amounts of N_2 fixed in a given tree raise problems in perennial plants especially the long duration of growth and the difficulty in obtaining reference crops over seasons. For young or small trees, ^{15}N procedures similar to those adopted in grain or pasture legumes would be expected to give equally satisfactory results. The greatest problems with N_2 fixation estimates using ^{15}N will occur in mature trees due to their perennial nature and massive sizes. This leads to logistic and sampling difficulties or differences in $^{15}N/^{14}N$ ratio of soil due to differences in N turnover processes that occur under the fixing and reference crops with time. The influence of these effects may differ depending on how the ^{15}N is applied. An examination of which of the existing ^{15}N procedures, e.g. isotope dilution, A value or the natural ^{15}N abundance and what method of ^{15}N application should be adopted under different situations is therefore urgently needed.

In this paper we have considered the strategies for obtaining representative sampling (as opposed to the whole destructive plant sampling) that would closely reflect the overall ^{15}N enrichment in the whole plant, and the selection of the appropriate reference tree. The advantage of using the ^{15}N labelled plant samples for additional agronomic studies besides N_2 fixation, e.g. contribution of tree litter to plant N uptake and soil organic matter are briefly discussed.

Factors affecting the validity and precision of N_2 fixation estimation by trees using ^{15}N -labelled materials

Reference tree

The accurate determination of the actual amounts of N_2 fixed in the field is crucial only in some instances, such as in N-balance studies in agroecological systems i.e. agroforestry, or in comparing N_2 fixed in different seasons, years and environments. In these cases, the reference crop constitutes the main potential source of error in the ^{15}N technique. The criteria used in the selection of suitable reference crops have been discussed by Fried *et al.* (1983). However, according to Danso *et al.* (1986) the need for the precise quantification of N_2 fixed may not be that compelling in studies to simply compare treatment effects or rank plant genotypes or *Rhizobium*/*Frankia* strains for N_2 fixing abilities.

Uninoculated N_2 fixing legume or actinorhizal trees have often been used as reference crops. When no indigenous *Rhizobia* or *Frankia* are present in the experimental soil, the uninoculated NFTs are found to be suitable reference crops (Sanginga *et al.* 1990 a,b). However, care must be taken to thoroughly examine roots of such uninoculated trees to ensure that they are not nodulated, or to run an acetylene reduction test to confirm the absence of nitrogenous activity. Cross-contamination of uninoculated control from inoculated treatments had been observed in our pot experiment involving *G. sepium* (Sanginga *et al.* 1991b). Using such controls, N_2 fixation measured by the isotope dilution and the difference methods were

underestimated. It may be difficult to avoid cross-contamination in the field and even in the greenhouse unless special precautions are taken. If possible, uninoculated control plants should be compared with other potential reference crops such as known non-NFTs. The non-NFTs, however, have to fulfill the conditions outlined by Fried *et al.* (1983) to be an appropriate reference crop. The validity of such selections can be established by comparing the isotopic composition of N with that of non-nodulating isolines (Fried *et al.* 1983). Since non-nodulating tree genotypes have not yet been identified, further searches for non-nodulating NFSs in natural populations (Sanginga *et al.* 1989a) or their development (e.g. through mutation induction) are most valuable for the ^{15}N methodology. Attempts have already begun in this direction.

Sanginga *et al.* (1990c) examined the suitability of four reference crops i.e., two non-NFTs, *Cassia siamea* and *Eucalyptus grandis*, and two uninoculated fixing trees, *L. leucocephala* and *F. albida*, for measuring N_2 fixed in inoculated *L. leucocephala* and *F. albida* grown for 36 weeks in pots. The ^{15}N isotope dilution and the A value methods were used. The isotope dilution approach gave several negative estimates of fixed N_2 in *F. albida*. Positive and similar values of fixed N_2 were measured in all four reference crops using the A-value approach. For *L. leucocephala*, the isotope-dilution approach gave different estimates of fixed N_2 , with the different reference crops; the uninoculated N_2 -fixing crops indicated significantly less fixed N_2 than the non-fixing reference crops. Similar values for N_2 fixed in *L. leucocephala* were obtained using the two non-NFTs, either by the isotope dilution or A-value method. On the average, *F. albida* derived about twice as much N from fertilizer as *L. leucocephala* (Table 4).

Table 4. Percentage of N derived from atmospheric N_2 by *Leucaena leucocephala* and *Acacia albida* as influenced by four reference crops and the ^{15}N methods*

	Isotope-dilution method				A-value method			
	<i>Leuc.</i>	<i>Acacia</i>	<i>Cassia</i>	<i>Eucalyptus</i>	<i>Leuc.</i>	<i>Acacia</i>	<i>Cassia</i>	<i>Eucalyptus</i>
N_2-fixing trees								
<i>L. leucocephala</i>								
12 WAP	15	42	65	64	77	73	71	72
24 WAP	9	81	69	71	93	85	85	83
36 WAP	-2	85	80	78	96	92	89	88
<i>A. albida</i>								
12 WAP	-68	-13	31	29	13	19	26	22
24 WAP	-377	5	-61	-50	18	22	29	27
36 WAP	-529	7	-25	-33	38	41	43	47

LSD

Reference crops 17

Harvest periods 5

WAP, weeks after planting. LSD, least significant difference. Sanginga *et al.* Biol. Fertil. Soil (1990) 9: 341-346

Labelling techniques

Several practical questions on the techniques of applying the labelled ^{15}N materials need to be addressed before designing ^{15}N experiments to measure N_2 fixed by NFTs. The limited data available for NFTs indicate that much more work needs to be done to develop adequate techniques of applying ^{15}N for measuring N_2 fixation. The amount of ^{15}N applied for labelling a tree will depend upon the N rate and the ^{15}N enrichment of the labelled material used. The N rates and ^{15}N enrichment used for grain and forage legumes can be readily adopted for small tree plants grown in the greenhouse or in field conditions.

If isotope-aided experiments are performed with large trees, the amount of N already present in the tree may constitute an extradilution factor of the ^{15}N applied. Under such conditions it is highly advisable to conduct preliminary experiments with few trees, to ascertain several factors, e.g. total N and its partitioning among tree organs, labelling techniques and sampling procedures.

Single applications of 2gN/m^2 , or 0.5 gN/tree enriched with 10 or 20 atom % N have been used to NFTs (Gauthier *et al.* 1985; Sanginga *et al.* 1990, 1991). However, application rates will vary for different NFTs, types of studies, locations and soil characteristics and ^{15}N measuring equipment. As a general guide, the ^{15}N rate must be enough not to significantly interfere with N_2 fixation in NFTs (Fried *et al.* 1983), and also capable of being detected within the sensitivity range of the ^{15}N measuring equipment.

In most of our studies, the isotope dilution method, which involves the application of the same amount of N^{15} -labelled material to both the reference and NFTs has been adopted. We also compared the "A Value" with the isotope dilution method for estimating N_2 fixed by *C. equisetifolia* and *C. cunninghamiana* (Table 5). These two methods gave similar results (Sanginga *et al.* 1990a) except when uninoculated plants were contaminated as in the case of *G. sepium* and *F. albida* (Sanginga *et al.* 1990b, 1991b).

For perennial pastures, the frequent, small additions of ^{15}N to soil is a suitable approach for N_2 fixation (Witty 1983) as the application of N as small doses prevents the suppressive effects of applied N on N_2 fixation, and also results in a more stable $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratio in the soil. For trees, the use of several ^{15}N fertilizer applications (2-4 a year) probably before periods of high root activity appears to be an attractive method, but has not been sufficiently examined. Preliminary studies by N. Sanginga, F. Zapata, S.K.A. Danso and G.D. Bowen (unpublished) compared the effect of different amounts of ^{15}N -labelled fertilizer and the frequency of application on estimates of N_2 fixed in *L. leucocephala* and *G. sepium* over 36 months. They found that a single application of 20 mg kg^{-1} soil decreased N_2 fixation and that applying this amount in three splits gave different results, depending on whether it was repeatedly applied to the same plot or each split application was on a previously unlabelled plot.

Sampling of plants

The practical difficulty in harvesting whole trees increases with age, and it is problematic and labourious to attempt to recover all the roots. A representative organ would be ideal for N_2

fixation estimation, provided the ^{15}N enrichment is representative for the whole tree. However, the ^{15}N enrichments in different organs of trees can vary greatly (Sanginga *et al.* 1990e), and raises the question as to which plant part is the most representative. Above-ground organs might be preferred for ease of sampling, and the leaves that contain most of the above-ground N seem to be the most appropriate choice. Even where only leaves are to be sampled, it could be labourious to sample all leaves. For this reason, Baker *et al.* (1990) tested different sampling strategies, and suggested that the simple procedure of collecting small numbers of leaves (20 to 60) at random from the trees was sufficient to estimate the percentage of Ndfa in *L. leucocephala*. However, measuring the total N_2 fixation should be more problematic.

Table 5. Precision of ^{15}N isotope methods and N balance measurements of N_2 fixed and percentage N in the plant derived from the atmosphere (%Ndfa) as indicated by the analysis of variance the SEM and coefficient of variation for means only*

		N_2 fixed		% Ndfa			
		Means	SE	CV(%)	Means	SE	CV(%)
<i>C. equisetifolia</i>	ID	32 ^a	8	26	61 ^b	11	18
	AV	24 ^b	4	15	60 ^b	11	18
	CM	31 ^a	7	24	79 ^a	28	35
<i>C. cunninghamiana</i>	ID	16 ^c	8	37	44 ^c	13	28
	AV	14 ^c	4	35	41 ^c	14	33
	DM	16 ^c	7	49	37 ^d	25	66

ID = Isotope Dilution; Av = A Value; DM = Difference Method.

*Sanginga *et al. Soil Biol. Biochem.* 1990 22(4) 539-547.

Studies by Sanginga *et al.* (1990e) showed that *L. leucocephala* roots alone contained as much as 60% of the fixed N in the whole plant. This figure could well have been underestimated because of fine root turnover which can be great. Thus, any estimates of N_2 fixation in trees that exclude roots have been underestimated. Allometric relations, worked out with forest trees (Felker *et al.* 1982) may be of some use for estimating total biomass, but even these are only approximate. The cost and practicalities of doing tree experiments dictate that sampling needs urgent attention, especially if one is trying to quantify both above- and below-ground nitrogen which will influence the N available to associated or succeeding plants.

Management and environmental factors affecting N_2 fixed by trees

How much N do NFTs really fix? Since N_2 fixation is the product of two symbiotically interdependent organisms (the host plant and the bacterium), it may be affected by the reaction of one or the other or both. As a broad generalization, fixation is proportional to the vigour of the host plant and therefore is affected by the factors that affect plant growth, i.e. water, nutrients, light and management practices. This generalization may be upset by factors that

specifically affect the activity of *Rhizobium* or *Frankia* rather than the host. These may be temperature, soil pH, nutritional status (particularly N and Mo) and genetic specificity. It is therefore not surprising that measurements of the amounts of N₂ fixed vary quite widely.

Environmental factors

The present section concentrates on two limiting soil nutrient factors which are probably among the most important under tropical conditions, soil deficiency in P, and combined N.

Soil deficiency in P

Many tropical soils are deficient in available P, which is known to limit the growth of the host plant, and the nodulation and N₂ fixation of NFTs. Observations that *L. leucocephala* is not favoured by low fertility have been reported in some areas in Africa, e.g. Nigeria, Zaire and Zimbabwe. Sanginga *et al.* (1985) indicated that *L. leucocephala* needs 80 kg P ha⁻¹ for good establishment in Nigerian soils, even if effectively nodulated. Similar observations have been reported for *Acacia holocorcea*, *C. cunninghamiana* and *L. leucocephala* in Zimbabwe (Sanginga *et al.* 1991c).

P deficiency can be eliminated by adding P fertilizer to soil as indicated in the foregoing and/or by selecting tree genotypes or provenances that are tolerant to low P soils. Twenty-three provenances of *G. sepium* and 11 isolines of *L. leucocephala* were examined at low and high phosphate levels (20 and 80 mg P kg⁻¹ soil) for growth phosphate uptake and use efficiency. A great response to the higher P rate occurred among *L. leucocephala* isolines and *G. sepium* provenances. Shot dry weight at low P varied from 1.30 to 3.01 g plant⁻¹ for *L. leucocephala* and from 1.44 to 3.06 g plant⁻¹ for *G. sepium*. There were apparent genotypic differences within species in the root development, shoot P and P-use efficiency (Sanginga *et al.* 1991a). Results of this study are being validated in field experiments. Preliminary results show that the foregoing differences, which were apparent at early growth stages, disappeared after one year of *G. sepium* establishment.

In another study, the numbers of rhizobia in the rhizosphere of inoculated *L. leucocephala* during the first two weeks were lower when P was added, but later became similar to those without added P (Table 6). Nodules formed earlier in inoculated plants fertilized with P and in greater numbers (four to five-fold) and dry weights than in those without P. However, the percentage of N₂ derived from fixation did not change with increasing levels of P application. These results suggest that the P effect observed did not operate via stimulated growth of rhizobia in the rhizosphere, nor through increased N₂ fixation rate. The major effect appeared to be due to the results that occurred via plant growth.

Another way of alleviating P deficiency in tropical soils is to inoculate seedlings with ecto- or endomycorrhizal fungi. Mycorrhiza may greatly improve the P supply of the host plant by increasing the absorptive capacity of the roots, thus restoring the N₂-fixing capacity of the system. Work conducted at IITA showed that mycorrhizal infection increased root P and dry weight, and/or uptake of immobile molecules like Zn and Cu by all woody species studied.

It promoted nodulation of *F. albida* and *A. nilotica* and reduced the effects of drought stress on the growth of *G. sepium* and *L. leucocephala*.

Table 6. Effect of P fertilization and *Rhizobium* inoculation on nodulation and numbers of *Rhizobium* in the rhizosphere of *L. leucocephala* grown in pots containing Weschel soil*

P levels (mg kg ⁻¹ soil)	Harvest period (days after planting)											
	6 days			12 days			18 days			36 days		
	NN	NM	NR(1)	NN	NM	NR	NN	NM	NR	NN	NM	NR
0	0	0	22 ^{a**}	0	0	55 ^a	0	0	174 ^b	11 ^d	26 ^d	406 ^b
20	0	0	5 ^b	0	0	18 ^b	11 ^b	40 ^b	142 ^b	52 ^c	51 ^c	608 ^a
40	0	0	ND*	0	0	ND	17 ^b	47 ^b	ND	102 ^b	148 ^b	ND
60	0	0	ND	0	0	ND	38 ^a	58 ^b	ND	118 ^b	137 ^b	ND
80	0	0	ND	9	9	ND	41 ^a	71 ^a	ND	198 ^a	401 ^a	ND

(1) NN = Number of nodules; NM = Nodule mass (mg plant⁻¹); NR = Number of *Rhizobium* cm⁻¹ root (x 10³). * Sanginga *et al.* *Plant Soil* 1991.

Combined N

The harmful effect of soil combined N on nodulation and N₂ fixation by trees has been reported by some authors. In a study conducted on an alfisol in Nigeria, Sanginga *et al.* (1989c) showed that N₂ fixation of a well-nodulated *L. leucocephala* was reduced by 50% with 40% or 80 kg ha⁻¹ of N fertilizer. Also because of their large variation in N₂-fixing that can occur throughout the life and the redistribution of N in the plant and the soil profile due to litter fall and its mineralization, tree/*Rhizobium* symbioses can be more affected by combined N than annual crops.

Two approaches may be suggested to improve N₂ fixation by trees in the presence of combined N: (i) develop specific partnerships of *Rhizobium*/hosts that are more tolerant of combined N than others or exploit genetic differences among trees to fix N₂ in the presence of high soil N. Variation in growth, biological N₂ fixation and mineral N use efficiency of nine provenances of uninoculated, inoculated, and N-fertilized *G. sepium* were studied in a greenhouse experiment.

The percentage of N derived from atmospheric N₂ varied among provenances and ranged from 56% to 74%. In terms of growth, some provenances responded well to inoculation but not to fertilizer, although they had similar total N with both treatments. Various provenances showed no response to inoculation and/or added N. Such observations suggest genotypic differences in the physiological use of absorbed soil N and fixed N₂, which may not be parallel.

Management factors and transfer of fixed N₂

As with herbaceous legumes, cutting the tops of woody species, a practice in alley cropping, can cause considerable sloughing of roots and nodules, although the extent depends on the severity of cutting. This offers one mode of N transfer to associated plants, i.e., root transfer as well as the addition of prunings. The effect of three successive cuttings on N uptake and fixation and N distribution in *L. leucocephala* was investigated in a greenhouse experiment (Sanginga *et al.* 1990d, e). Two isolines, uninoculated or inoculated with three different *Rhizobium* strains, were grown for 36 weeks and cut every 12 weeks. The soil was labelled with 50 ppm KNO₃ enriched with 10 atom % ¹⁵N excess soon after the first cutting. Significant differences in ¹⁵N enrichment occurred in different parts.

Live nodules showed the lowest atom % ¹⁵N excess values (0.087) followed by leaves (0.490), branches (0.522), stems (0.591) and roots (0.857). The roots contained about 60% of the total N₂ derived from fertilizer over the successive cuttings. The total N₂ fixed in the roots was about 60% of that fixed in the whole plant, while the shoots contained only 20% of the fixed N₂. We concluded that N reserves in roots and nodules constitute another source of N that must be taken into account when estimating fixed N₂ and its contribution to the N balance after pruning or cutting plants. The contribution of N below ground was confirmed by the response of maize to previous *L. leucocephala*.

The N contribution from the shoot and root system of symbiotically grown *L. leucocephala* was evaluated in a field experiment on an alfisol at IITA in Southern Nigeria (Mulongoy and Sanginga 1990, Sanginga *et al.* 1988b). Maize in plots that received prunings from inoculated *L. leucocephala* contained more N and grain yield was increased by 1.9 t.ha⁻¹. Large quantities of nitrogen were harvested with *L. leucocephala* prunings (300 kg N ha⁻¹ in six months) but the efficiency of utilization of this N by maize was low compared to inorganic N fertilizer (ammonium sulphate) at 80 kg N ha⁻¹. Maize yield data indicated that N in *L. leucocephala* prunings was 34 and 45% as efficient as 80 kg N ha⁻¹ for uninoculated and inoculated plants with *Rhizobium* IRc 1045, respectively. In plots where the prunings were removed, the leaf litter and decaying roots and nodules contributed N equivalent of 32 kg ha⁻¹. Twenty-five kg ha⁻¹ was the inorganic N equivalent from N fixed symbiotically by *L. leucocephala* when inoculated with *Rhizobium* strain IRc 1045 (Table 7).

Table 7. Efficiency of nitrogen from above and below ground of *L. leucocephala* and its inorganic nitrogen (ammonium sulphate) equivalent to 80 kg N ha⁻¹ for producing maize at IITA Sanginga *et al.* (1988) *Plant Soil* 112: 137-141.

Plant parts	Treatments	Efficiency (%)	N equivalent (kg ha ⁻¹)
Above ground	Uninoculated	34	29
	Inoculated IRc 1050	39	31
	Inoculated IRc 1045	45	36
Below ground	Uninoculated	30	24
	Inoculated IRc 1050	41	33
	Inoculated IRc 1045	39	31
	LSD 5%	5	5

CONCLUSION AND FUTURE RESEARCH NEEDS

The use of NFTs (legumes or non-legumes) in forestry and agroforestry has been largely neglected thus far. However, the success of the introduction of species with high N₂-fixing potential, for example *L. leucocephala* and *G. sepium*, is such that interest in NFTs is increasing. Only a few studies as indicated have dealt with the N₂ fixing systems. Whilst the principles and methods of study learned from work with annual hosts may apply, there are many special problems to be considered in studying symbiosis with NFTs. We will now comment briefly on some future research needs in the management of NFTs.

- Large plant-to-plant and genotype variation in nodulation and growth have been recorded in NFTs. As a first step, further use of NFTs requires screening between and within species to determine which exhibit the highest N₂-fixing potential. As a second step, it appears necessary to improve our knowledge of the requirements of the selected trees with regard to their effective endophyte *Rhizobium* or *Frankia* in order to prepare appropriate inoculants. Tree species are prime candidates for vegetative propagation due to their considerable heterogeneity. The integration of selection of high N-fixing genotypes and the biotechnology of mass vegetative propagation could therefore lead to large increases in N-fixation in agroforestry systems.

- In the foregoing, we indicated some of the environmental and plant/*Rhizobium* factors that play a critical role in the successful growth of NFTs. It is appropriate to further examine soil factors such as those mentioned in the foregoing (P, N acidity), in order to appreciate the critical steps of the symbiosis being affected. In order to manage N₂ fixation more effectively, good methods must be developed for studying the effect of the environment on the growth of the microsymbiont in the rhizosphere, the infection process, nodule genesis, nodule development and N-fixation processes. Nodulation and nitrogen can fail in any of those processes.

- Not all legumes fix N₂ and not all NFTs are legumes. There is a lack of knowledge on what tree species are potential N fixers, like leguminous trees used in established agroforestry systems are not always N₂ fixers e.g. *C. siamea*. Plant growth is not a reliable indicator of N fixation because some soils may contain enough N.

Nodulation is often difficult to assess with tree species because it may be seasonal, it may not occur throughout the tree's life and the nodules are sometimes restricted to deeper soil layers. Furthermore, the presence or absence of nodules gives little indication of the level of nitrogen fixation. It is important to develop a reliable method of surveying candidate tree species in natural environments for their N fixation potential. There is evidence that with the careful sampling of the test species and of reference non-fixing species, and with careful analytical procedures, the ¹⁵N natural abundance method may be highly appropriate for identifying NFTs in natural ecosystems. However, more intensive studies of this method are needed. There is a critical need to identify NFTs in natural environments, so it is recommended that the ¹⁵N natural abundance method be developed to identify such tree species.

- Measuring N₂ fixation in the field and questions regarding the rate of N availability to associated plants are areas for further study. In the management of N fixation, it is essential

to measure fixation in the field and how it is influenced by the strain of microorganisms, soil nutrient conditions (and their amendment, e.g. P additions), water and management practices. Nitrogen fixation assessments based on plant growth or acetylene reduction have limited usefulness.

Furthermore, a measurement of N_2 fixation is needed to distinguish between N_2 fixed from the atmosphere and that absorbed from the soil. The ^{15}N dilution method has proven to be a good method with herbaceous legumes and it should be developed further to provide a reliable method for the measurement of nitrogen fixation by trees. Applying the method to trees involves a unique set of problems that require solutions. Other methods such as ureide analysis of sap, should also be studied. However, newer approaches to measurement of N_2 fixation by trees, e.g. the use of ^{15}N natural abundance have a particular attraction with perennials. In conclusion, N_2 fixation by trees in the field should be examined (in appropriately designed plantings) to elucidate the effects of: soil chemical status, especially the effect of added phosphate and trace elements, season and age of the tree, and different management systems such as times and intensity of foliage or stem cutting for green manure, fodder, and fuel, soil moisture and its interactions with soil chemical status and genetic variation in nitrogen fixation within species.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author gratefully acknowledges the financial support he received from IITA, IAEA and IFS to conduct the research work reported in this paper. Special thanks go to various co-authors like K. Mulongoy, A. Ayanaba, S.K.A. Danso, G.D. Bowen, F. Zapata and M.J. Swift who were also the author's supervisors at some point or another. We also acknowledge the technical assistance of Ms H. Axman and the technicians of the Soil Unit, IAEA Siebersdorf, Austria for ^{15}N analysis.

REFERENCES

- Allen O.N. and Allen E.K. (1981). *The Leguminosae*. A source book of characteristics, uses and nodulation. University of Wisconsin Press, Wisconsin. 812 pp.
- Baker D.D., Wheeler R.A. and Fried M. (1990). Paper presented at the Fourth African Association for Biological Nitrogen Fixation. International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria. 24-28 September 1990.
- Baker D. and O'Keefe D. (1984). A modified sucrose fractionation procedure for the isolation of frankiae from actinorhizal root nodules and soil samples. *Plant and Soil* 78: 23-28.
- Chareau C. and Vidal P. (1965). Influence de l'*Acacia albida* Del. sur le sol. Nutrition minérale rendements des mils *Pennisetum* au Sénégal. *Agron. Trop.* 20: 600-626.
- Danso S.K.A., Hardarson G. and Zapata F. (1986). Assessment of dinitrogen fixation potentials of forage legumes with ^{15}N technique. In: Potential of forage legumes in farming systems of Sub-saharan Africa. I. Haque, S. Jutzi and P.J.H. Neate, Eds. ILCA Ethiopia. pp. 26-58.
- Danso S.K.A., Bowen, G.D. and Sanginga N. (1991). Biological nitrogen fixation in trees in agro-ecosystems. *Plant soil* (In press).
- Dreyfus B. L. and Dommergues Y.R. (1981). Nodulation of *Acacia* species by fast and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. *Appl. environ. microbiol.* 41 (1): 97-99.

- Dommergues Y.R. (1987). The role of biological nitrogen fixation in agroforestry. In: *Agroforestry: A Decade of Development*. H.A. Steppeler and P.K.R. Nair Eds. pp. 245-271. ICRAF Nairobi, Kenya.
- Felker P., Clark P.R., Osborn J.F. and Cannel G.H. (1982). Biomass estimation in a young stand of mesquite (*Prosopis* spp.), Ironwood (*Olneya tesota*), Palo Verde (*Cercidium floridum* and *Parkinsonia aculeata*), and *Leucaena* (*Leucaena leucocephala*). *J. Range Manag.* 35: 87-89.
- Fried M. and Broeshart H. (1975). An independent measurement of the amount of nitrogen fixed by legume crops. *Plant Soil.* 43: 707-711.
- Fried M., Danso S.K.A. and Zapata F. (1983). The methodology of measurement of N₂ fixation by non legumes as inferred from field experiments with legumes. *Can J. Microbiol.* 29: 1053-1062.
- Fried M. and Middleboe V. (1977). Measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop. *Plant Soil* 47: 713-715.
- Gauthier D., Diem H.G., Dommergues Y.R. and Ganry F. (1985). Assessment of N₂ fixation by *Casuarina equisetifolia* inoculated with *Frankia* ORS021001 using ¹⁵N methods. *Soil Biol. Biochem* 17: 375-379.
- Gichuru M.P. and Kang B.T. (1990). *Calliandra calothyrsus* Meiss in an alley cropping with sequentially cropped maize and cowpea in southwestern Nigeria. *Agroforestry Systems* 9: 191-203.
- Guevarra A.B. (1976). Management of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit for maximum yield and nitrogen contribution to intercropped corn. Honolulu, Hawaii, Ph.D Thesis University of Hawaii USA. pp. 128.
- Hardy R.W.F., Holsen R.D., Jackson E.K. and Burns R.C. (1968). The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43: 47-81.
- Hogberg P. and Kvanstrom M. (1982). Nitrogen fixation by the woody legume *Leucaena leucocephala* in Tanzania. *Plant Soil.* 66: 21-28.
- Kang B.T., Siphens L., Wilson G.F. and Nangju D. (1981). *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit prunings as nitrogen source for maize (*Zea mays* L.). *Fert. Res.* 2: 279-287.
- Kang B.T., Grimme H. and Lawson T.L. (1985). Alley cropping sequentially cropped maize and cowpea with *Leucaena* on sandy soil in Southern Nigeria. *Plant Soil* 85: 267-277.
- Mafuka M.M. (1984). Study on the physiology, survival, competitive ability and cross infectivity of rhizobia of cowpea group. Ph.D. Thesis Louvain-la-Neuve, Belgium. 222 pp.
- Mulongoy K. and Sanginga N. (1990). Nitrogen contribution by *Leucaena* in alley cropping. IITA Research Vol. 1 (1): 14-17.
- Norris D.O. (1956). Legumes and *Rhizobium* symbiosis. *Emp. J. of Exp. Agric.* 21: 247-270.
- Sanginga N., Mulongoy K. and Ayanaba A. (1985). Effect of inoculation and mineral nutrients on nodulation and growth of *Leucaena leucocephala*. In: *Biological Nitrogen Fixation in Africa*. H. Ssali and S.O. Keya Eds. pp. 419-427. Nairobi MIRCEN, Nairobi, Kenya.
- Sanginga N., Mulongoy K. and Ayanaba A. (1986). Inoculation of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit with *Rhizobium* and its nitrogen contribution to a subsequent maize crop. *Biol. Agric. Hortic.* 3: 34-347.
- Sanginga N., Mulongoy K. and Ayanaba A. (1987). Evaluation of indigenous strains of *Rhizobium* for *Leucaena* in Nigeria. In: *Les arbres fixateurs d'azote et l'amélioration biologique de la fertilité du sol. Colloques et séminaires.* pp. 416-436. ORSTOM, Paris.
- Sanginga N., Mulongoy K. and Ayanaba A. (1988a). Nodulation and growth of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit as affected by inoculation and N fertilizer. *Plant Soil* 112, 129-135.
- Sanginga N., Mulongoy K. and Ayanaba A. (1988b). Nitrogen contribution of *Leucaena/Rhizobium* symbiosis to soil and subsequent maize crop. *Plant Soil* 112: 137-141.
- Sanginga N., Danso S.K.A. and Bowen G.D. (1989a). Nodulation and growth response of *Alloccasuarina* and *Casuarina* species to phosphorous fertilization. *Plant Soil* 118: 125-232.
- Sanginga N., Mulongoy K. and Ayanaba A. (1989b). Effectivity of indigenous rhizobia for nodulation and early nitrogen fixation with *Leucaena leucocephala* grown in Nigerian soils. *Soil Biol. Biochem.* 21: 231-235.

- Sanginga N., Mulongoy K. and Ayanaba A. (1989c). Nitrogen fixation of field-inoculated *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit estimated by the ^{15}N and the difference methods. *Plant Soil* 117: 269-274.
- Sanginga N., Bowen G.D. and Danso S.K.A. (1990a). Genetic variability in symbiotic nitrogen fixation within and between provenances of two *Casuarina* species using the ^{15}N -labelling methods. *Soil Biol. Biochem.* 22, 539-547.
- Sanginga N., Bowen G.D. and Danso S.K.A. (1990b). Assessment of genetic variability for N_2 fixation between and within provenances of *Leucaena leucocephala* and *Acacia albida* estimated by ^{15}N labelling techniques. *Plant Soil* 127, 169-178.
- Sanginga N., Danso S.K.A., Zapata F. and Bowen G.D. (1990c). Influence of reference trees on N_2 fixation estimates in *Leucaena leucocephala* and *Acacia albida* using ^{15}N labelling techniques. *Biol. Fertil. Soils* 9: 37-42.
- Sanginga N., Zapata F., Danso S.K.A. and Bowen G.D. (1990d). Effect of successive cutting on nodulation and nitrogen fixation of *Leucaena leucocephala* using ^{15}N dilution and the difference methods. In: *Plant Nutrition-Physiology and Applications*. M.L. van Beusichem Ed. pp. 667-674. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Sanginga N., Zapata F., Danso S.K.A. and Bowen G.D. (1990e). Effect of successive cutting on uptake and partitioning of ^{15}N among plant parts of *Leucaena leucocephala*. *Biol. Fertil. Soils* 9: 37-42.
- Sanginga N., Bowen G.D. and Danso S.K.A. (1991a). Intraspecific variation in growth and P accumulation of *Leucaena leucocephala* and *Gliricidia sepium* as influenced by soil and phosphate status. *Plant Soil* 133: 201-208.
- Sanginga N., Manrique K. and Hardarson G. (1991b). Variation in nodulation and N_2 fixation by the *Gliricidia sepium/Rhizobium* spp. symbiosis in calcareous soil. *Biol. Fertil. Soil.* 11: 273-278.
- Sanginga N., Gwaze D. and Swift M.J. (1991c). Nutrient requirements of exotic tree species in Zimbabwe. *Plant Soil* 32: 197-205.
- Vincent J.M. (1970). A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook No. 15, Blackwell Oxford. 164 pp.
- Wilson G.F. and Kang B.T. (1981). Developing stable and productive biological cropping systems for the humid tropics. In: *Biological husbandry: A scientific approach to organic farming*. B. Stonehouse Ed. pp. 193-203. Butter North, London.
- 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.
- Zhang Z., Lopez M.F. and Torrey J.G. (1984). A comparison of cultural characteristics and infectivity of *Frankia* isolates from root nodules of *Casuarina* species. *Plant Soil* 78, 79-90.

**ÉCOLOGIE ET ÉPIDÉMIOLOGIE DES CHAMPIGNONS PATHOGÈNES DU SOL:
LE POTENTIEL INFECTIEUX DES SOLS, SA MESURE ET SON ÉVOLUTION
DANS LE CAS PARTICULIER DES SOLS INFECTÉS PAR *PYTHIUM* SPP.
EN AMAZONIE CENTRALE**

Maurice LOURD
Centre ORSTOM
BP 5045 34032 Montpellier France

Résumé: L'étude entreprise sur les pathogènes du sol dans différents agrosystèmes d'Amazonie Centrale se propose de répondre à deux questions: comment se traduisent les perturbations écologiques provoquées par la déforestation et la mise en culture au niveau de la microflore du sol, et comment limiter l'impact des maladies d'origine tellurique dans les cultures de la région? Après une brève description du concept de potentiel infectieux (PI) et des méthodes utilisées pour sa mesure dans le cas particulier des *Pythium*, nous examinerons les principaux résultats obtenus à partir du diagnostic sanitaire de plus de 160 échantillons de sol. De ces résultats seront tirées des conclusions plus générales sur l'évolution des *Pythium* en fonction des modifications écologiques du milieu et sur les différents aspects de la résistance naturelle des sols aux pathogènes.

Dans les sols de Terre Ferme (zones hors d'atteinte des crues saisonnières), les *Pythium* phytopathogènes sont des composants naturels de la microflore tellurique. On les rencontre aussi bien en forêt primaire que dans les parcelles de cultures traditionnelles ou intensives. Cependant, l'analyse quantitative montre qu'il existe une augmentation continue du PI, selon l'enchaînement forêt primaire, forêt aménagée, abattis traditionnel, cultures fruitières, cultures maraîchères. Celle-ci est directement liée à l'augmentation de la fréquence d'apparition de l'espèce *Pythium aphanidermatum*, principale responsable des maladies de fonte de semis.

Dans les sols de Várzea (zones régulièrement inondées et enrichies en limons par les crues annuelles), la présence de *P. aphanidermatum* est constante et le PI élevé, sauf dans les sols de la forêt. Cette particularité résulte de l'ancienneté et de l'intensité de la pratique agricole dans la Várzea, et des caractéristiques physico-chimiques des limons très favorables aux *Pythiaceae*.

L'étude de la réceptivité des sols naturellement indemnes de *Pythium* pathogènes a permis de suivre leur comportement en réaction à une contamination exogène. L'analyse de 80 échantillons a montré qu'il existait des sols capables de supprimer le développement des *Pythium* pathogènes et que leur proportion décroissait fortement avec l'intensification des cultures. Le passage à la culture se traduit donc par une rupture de la résistance naturelle des sols du climax. Celle-ci n'est pas uniforme: trois types de dynamique ont été mis en évidence qui semblent correspondre à divers degrés d'altération de l'aptitude naturelle des sols forestiers à s'opposer aux *Pythium*.

L'étude de la résistance et des mécanismes qui la gouvernent constitue le 3^o volet de notre analyse. L'hypothèse d'une résistance liée à la nature physico-chimique des sols a été en partie vérifiée en montrant qu'une solution de chlorure d'aluminium incorporée à un sol sensible bloquait sa réceptivité au *Pythium*. De plus, les modifications de pH du sol entraînent de fortes variations du PI. Ces différents résultats nous amèneront à discuter plus

largement la notion de résistance naturelle des sols aux pathogènes, ses mécanismes et ses conséquences pour le contrôle des maladies d'origine tellurique.

Abstract: *The study on soil pathogens in different agrosystems in Central Amazonia attempts to answer two questions: what ecological damage will deforestation and farming do to the soil's microflora and how can the impact of diseases of telluric origin on the region's crops be curbed?*

After a brief description of the soil infectivity (PI) concept, and methods used to measure it, taking Pythium as an example, we study the main results obtained from analyses of over 160 soil samples. These results are used to draw more general conclusions on the evolution of Pythium in relation to ecological changes that occur in the environment and on the natural resistance of the soil to pathogenic agents.

The Terra Firma areas, which are not subject to seasonal flooding, the Pythium plant pathogens are natural components of the soil microflora. They are found in the primary forests and in traditional or intensively cultivated areas. A quantitative analysis showed a progressive and continuous PI increase in the different agroecosystems: primary forest, managed forest, traditional cropping systems and fruit and vegetable crops. This is directly connected to the increase in the frequency of the Pythium aphanidermatum, the main cause of damping off.

In the soils of Várzea, an area that is regularly flooded and enriched with silt brought in by the annual peak waters, P. aphanidermatum is always present and the PI is high, except in forest soils. This is because of the long tradition and intensity of agriculture in Varzea and the physico-chemical characteristics of the alluvial silt which is very favorable to Pythiaceae.

A study on soil receptivity to outside contamination based on 80 samples that were naturally free of Pythium pathogens showed that there are soils that can suppress the development of Pythium, and that the proportion of these soils decreases sharply as cropping becomes more intensive. When soils are used for cropping, the natural resistance of the forest soils breaks down, although the reaction is not systematic. We observed three types of dynamics that seem to correspond to various degrees of deterioration in the natural aptitude of the forest soils to suppress Pythium development.

The study of resistance and the mechanism that controls this resistance constitute the third phase of our analysis. The hypothesis that resistance is connected to the physicochemical properties of the soils was partly confirmed by showing that incorporating an aluminum chloride solution in a receptive soil turned it suppressive to Pythium. Furthermore, changes in the soil pH caused severe changes in the PI. These results encouraged us to take a broader look at the concept of the soil's natural resistance to pathogens, the related mechanism and consequences in controlling soil-borne diseases.

FUNGAL ORGANISMS ASSOCIATED WITH SUNFLOWER AND THEIR EFFECTS ON THE CROP IN THE GUINEA SAVANNA REGION OF NIGERIA

C.A.N. OKOLI

Department of Crop Protection
Ahmadu Bello University Zaria, Nigeria

Abstract: *Sunflower (Helianthus annuus L.) is an important oil-seed crop in many parts of the world. Two surveys of 25 randomly-selected farms in the Nigerian Guinea Savanna region over a two-year period show that the crop is attacked by several fungal pathogens at every stage of its life cycle. Some of the fungi attack the crop during the seed stage, while others attack it at different stages of the crop life cycle. Some pathogens attack the crop throughout its life cycle, but may be more serious at one stage than the others. Some of the fungi cause greater economic losses than others. All parts of the plant are attacked, including the root systems. Different seasons of the year and consequently different climatic factors have been shown to determine the relative importance of some of these organisms. The interactions of these fungal organisms and the sunflower crop have been shown to reduce crop yield and to result in complete yield losses in some cases. Fungi that attack the sunflower crop interact with the plants to cause a lot of diseases, some of which are economically important. These include powdery mildew caused by Erysiphe cichoracearum DC, stem rot caused by Sclerotium rolfsii Sacc, leaf and stem lesions caused by various fungi such as Alternaria helianthi and Septoria sp. Other diseases and their causal agents include rust caused by Puccinia helianthi Schw., verticillium wilt caused by Verticillium dahliae Kleb, downy mildew caused by Plasmopara halsteddi, (Farl) Berl de Toni. Sclerotinia sclerotiorum (Lib). de Bary causes the same kind of root, basal stem rot and wilt as Sclerotium rolfsii and in addition causes head rot symptoms also resembling those caused by Botrytis cinerea and Rhizopus sp. In this paper, the symptoms of the various diseases on different plant parts and at different stages of the crop's life cycle are described.*

Résumé: *Le tournesol (Helianthus annuus L.) est une plante oléagineuse dont la culture est très répandue dans le monde entier. Des études sur une sélection aléatoire de 25 fermes en zone de savane guinéenne au Nigéria ont montré que, dès le stade de la semence, la plante est attaquée par divers pathogènes fongiques à des degrés de gravité variables, à tous les stades de son développement et sur toutes ses parties, systèmes racinaires inclus. Il faut noter que certaines champignons entraînent davantage de pertes économiques que d'autres. On a pu montrer que la prolifération de certaines organismes variait en fonction des saisons et, par conséquent, des facteurs climatiques déterminés, et que leur activité aboutissait toujours à des baisses de rendements et, parfois même, à des pertes totales de récoltes de tournesol. Les champignons pathogènes du tournesol sont à l'origine d'un grand nombre de maladies dont certaines ont une importance économique, notamment le mildiou, (Erysiphe cichoraceum D.C.), la pourriture de la tige (Sclerotium rolfsii Sacc.), les lésions de la tige et de la feuille causée par différents organismes dont Alternaria helianthi et Septoria sp. Parmi d'autres maladies et leurs agents pathogènes, on trouve la rouille causée par Puccinia helianthi Schw. Le flétrissement dû à Verticillium dahliae Kleb, et le mildiou causé par Plasmopara halsteddi (Farl) Berl de Toni. Sclerotinia sclerotiorum (Lib). de Bary provoque le même type de pourriture basale de la tige, et de flétrissement que Sclerotium rolfsii et fait apparaître aussi des symptômes de pourriture de l'épi ressemblant à ceux causés par Botrytis cinerea et Rhizopus sp. Les symptômes des diverses maladies sur les différentes parties et à divers stades physiologiques de la plante sont décrits dans cette étude.*

Sunflower is now one of the 10 most important crop plants in the world (Kufner 1987) due to its economic advantages. Its acreage has increased dramatically in the past 15 years (Figure 1). Sunflower (*Helianthus annuus* [Linnaeus]) is an important oil-seed crop in many parts of the world. In Nigeria, there has been a sharp decline in the local production of vegetable oil, but the demand has continued to rise. There was therefore a need to identify alternative sources of vegetable oil following the decline in cultivation of traditional oil crops such as groundnut and oil palm. According to Ogunremi (1979), sunflower was introduced into Nigeria in the early sixties as an arable crop that could boost vegetable oil production, but diseases that attacked the crop made it impossible to cultivate it on a commercial scale. Average yields of the crop from different parts of the world are shown in Figure 2. Sunflower was re-introduced in the mid-eighties following the steady decline of groundnut and oil palm as alternative crops. It was again completely devastated by diseases. Consequently, it became necessary to identify the causal organisms of these diseases to avoid the failure of the sixties, and also to attempt to control them, with a view to making the large-scale production of the sunflower crop worthwhile for farmers, and to be able to achieve the long-term goal of a steady, alternative supply of vegetable oil to meet the ever increasing demand.

Short-term research therefore aimed at identifying the major diseases of sunflower and their causal agents in the Guinea Savanna region of Nigeria. In the long term, the epidemiology of major diseases will be investigated. In the process, control measures will be attempted and it is hoped that a disease-management programme will be developed that will both minimize the losses caused by the major diseases and fit into the kind of farming practices readily available or adaptable by the majority of farmers. I shall be presenting results of initial surveys done to determine fungal pathogens causing diseases of sunflower in the region, describe their symptoms and also attempt to suggest possible reasons for their prevalence.

MATERIALS AND METHODS

Survey: A survey of 25 randomly selected farms covering an area of approximately 500 square kilometres in the Nigerian Guinea Savanna was surveyed in 1988. Another 25 farms were also surveyed in 1989 within the same area. The surveys were carried out between July and November in 1988 and from July to mid-September in 1989. The survey's aim was to determine both the incidence of diseases on the sunflower crop and to attempt to isolate their causal organisms. In each farm visited, 100 random plants were scored for incidence of any disease. Each farm was visited three times, covering seedling, vegetative, flowering and heading stages.

Symptomology: Tagged plants were observed for symptoms of any disease. Symptoms of the diseases showing the highest incidence were observed on different plant parts including stem, leaves, flowers, bracts and seeds. Isolations were made from different plant parts and the pathogens isolated were reintroduced into uninfected plants in the greenhouses to ensure that the symptoms were repeated.

Isolation of pathogens: Infected parts of each plant were cut off, labelled and taken to the laboratory, where they were washed with distilled water and 1% sodium hypochlorite. They were cut into bits, plated on agar in Petri dishes and incubated at 22-28°C until growth was

observed. The pathogens were then identified by their conidia and conidiophores. Their conidia were reintroduced into healthy plants in glasshouses to ensure that these were actually the pathogens causing the symptoms. These plants were watered daily to ensure they had adequate moisture and were observed until symptoms appeared.

Seed assay: Sunflower seeds are often attacked by fungi and seeds can be a ready source of epidemics. Five hundred seeds (cv Isaanka) were surface-disinfected to remove surface contaminants. Fifty Petri dishes were lined with filter paper, which was moistened with sterilized-distilled water and 10 sunflower seeds were placed in each Petri dish. The seeds were well spaced out to ensure that there was no secondary colonization from infected seeds to clean ones. The plates were left at room temperature (18-25°C) for seven days. Fungal pathogens that sporulated on the seeds were identified and scored. The trial was repeated three times.

RESULTS

Survey: Each of the farms visited showed infection by several pathogens. Some farms were more heavily infected by some pathogens than by others. Some pathogens were present in some of the farms visited but not in others, while some other pathogens (referred to here as major pathogens) were present in all the farms.

Symptomatology

- *Alternaria helianthi* (Hans). Tubaki and Nishihara was found to attack all the above-ground parts of the sunflower. It caused dry, velvety lesions on all the above-ground parts, including capitulum, bracts, flowers, leaves, petioles and stems. On the leaves, flowers and heads, it caused spots which coalesced to form larger, irregularly-shaped spots, while on the stems and petioles, it caused lesions whose longitudinal axis ran along the main axis of the stems and petioles.
- *Botrytis cinerea* Pers. infected all the above-ground parts of the plant. Symptoms included a layer of grey mycelium which gave rise to a soft rot. When the heads rotted, they dropped off if conditions were damp whereas in drier conditions, they collapsed while still on the stem.
- *Erysiphe cichoracearum* DC caused powdery mildew on sunflower. A fine layer of mycelium was seen on the upper surfaces of the leaf.
- *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid caused charcoal rot of sunflower. It infected the roots and basal stems of host plants. After flowering, the plants dried up or at best produced small heads, and poorly filled seeds. The inside of the stems were usually filled with black microsclerotia.
- *Plasmopara halsteddi* (Farl.) Berl et de Toni caused downy mildew. It usually had white mycelia which were seen on the underside of the plant's leaves, while on the upper surface,

INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

chlorotic patches were observed. It gave rise to stunting and many seeds from such plants were inviable.

- *Puccinia helianthi* Schw. attacked all aerial parts of the plant. Conidia were usually rusty in colour. This pathogen could not be grown on artificial media.
- *Sclerotium rolfsii* Sacc. caused root and acropetal wilt of sunflower. A white layer of mycelia developed on the stem-base of the plant. Within 24 hours of the mycelia appearing, they rounded off into small, white, microsclerotia-initials which turned into the characteristic brown colour of the mature sclerotia within 24-36 hours of formation. Affected plants wilted from the stem upwards, but with the leaves still attached to the plant. Sclerotia continued to form in the dead plant.
- *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib). de Bary caused acropetal wilt and other symptoms similar to those caused by *Sclerotium rolfsii*. Mycelia probably resulted from sclerotia in the soil and plants were infected at all growth stages. Plants were initially infected at the base of the stem near the soil surface. The brownish-black lesions that formed eventually enlarged and girdled the stem. A white layer of mycelium developed on the stem base, after which the affected plants wilted and died and the stem became brittle. Sclerotia developed on the mycelia mat. Sclerotia are the structures that the fungus uses to survive adverse conditions.
- *Verticillium dahliae* Kleb, causes verticillium wilt of the crop but was not found to be important in the farms visited during the surveys.
- *Septoria helianthi* Ell and Kell infected the crop, giving rise to leaf spots on the leaves of the plants.
- *Rhizopus stolonifer* was important in causing head rots of the crop.

Seed Assays: After seven days of incubation of surface-disinfested seeds, fungi which sporulated on the seed surfaces were recorded (Table 1).

DISCUSSION

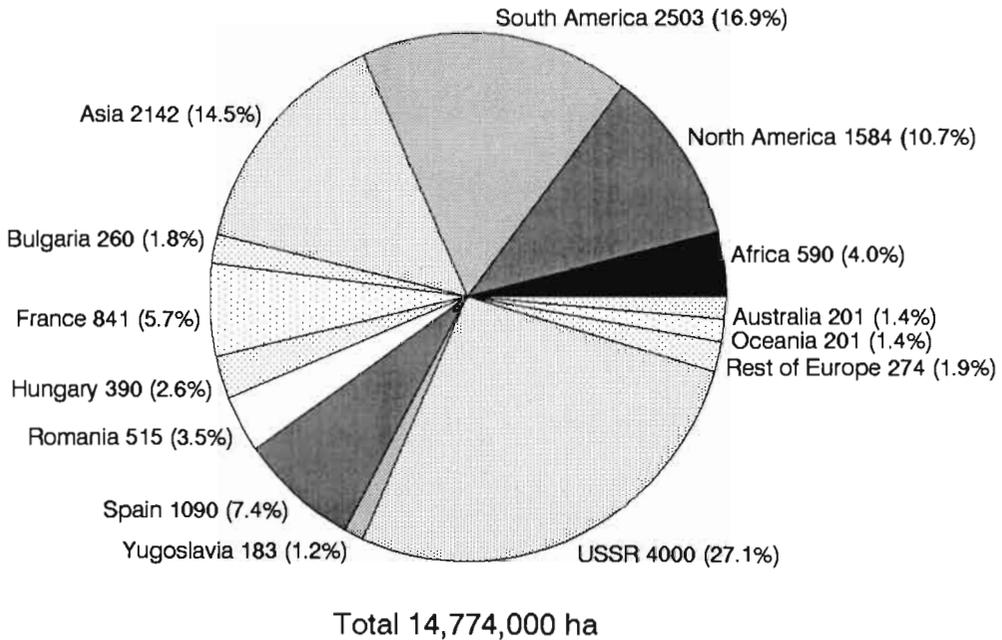
Although the sunflower plant is now a successful crop plant in many parts of the world due to hybrids resulting from breeding, in Nigeria, it is still chiefly an ornamental plant. This is because diseases have continued to make it difficult and nearly impossible to change its status from a curious ornamental plant to an arable crop that can help meet the demands for vegetable oil.

The few attempts that are being made to grow sunflower as a crop are confined to the Guinea Savanna and to date there has been no increase in the acreage of sunflowers grown. Neither commercial nor subsistence farmers are willing to take the risk involved in the cultivation of a crop for which there is virtually no guaranteed return for their inputs.

Table 1. Fungi associated with sunflower seeds in Nigerian Guinea Savanna

Fungi isolated	A*	B	C
<i>R. stolonifer</i>	53.4 ^{a**}	40.0 ^a	34.5 ^a
<i>A. helianthi</i>	13.7 ^b	16.7 ^b	16.0 ^c
<i>Fusarium</i> spp.	11.8 ^{bc}	16.1 ^b	23.4 ^b
<i>B. cinerea</i>	8.7 ^c	11.3 ^{bc}	11.8 ^{cd}
<i>M. phaseolina</i>	16.1 ^b	6.8 ^c	14.4 ^c
<i>S. sclerotiorum</i>	3.0 ^d	9.0 ^c	8.6 ^{dc}
<i>S. rolfsii</i>	3.0 ^d	7.9 ^c	4.6 ^e

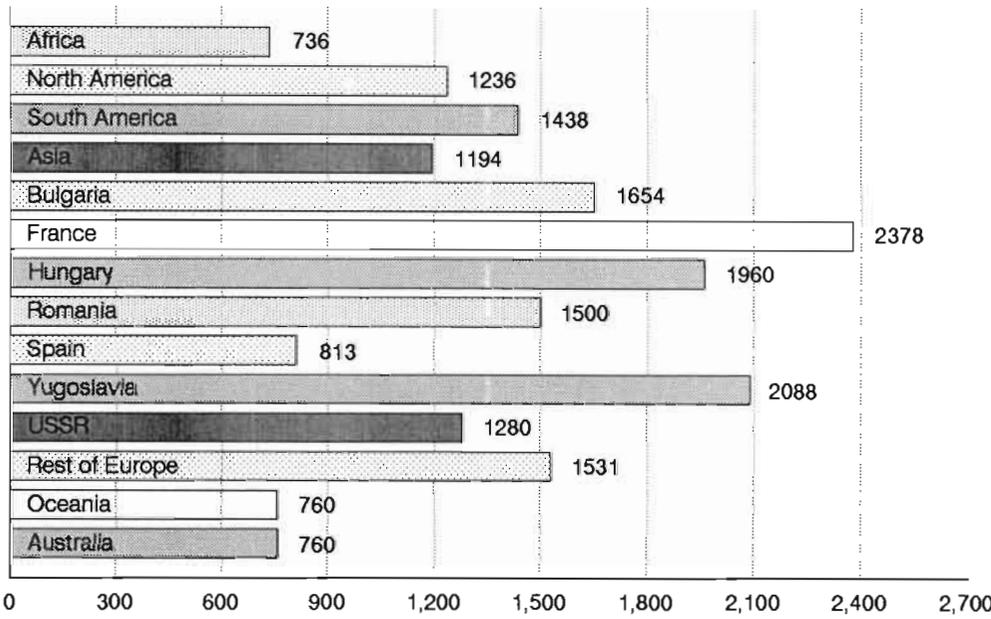
*The trial was repeated 3 times, shown on the table as A, B and C. **Numbers followed by the same letter are not significantly different, using Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

Figure 1. Regional distribution of sunflower growing areas worldwide (in 1000 ha)

Observations during the survey indicate that most of the diseases affecting the plant result from preventable causes. Infected seeds play a major role in disease presence by serving as a pool of primary inoculum. There are no available certified healthy seeds to plant, so fungi that are seed-borne such as *A. helianthi* exploit the initial inoculum in infected seeds successfully to their advantage (Abraham *et al.* 1976, Okoli, unpublished results). Some of the fungi like *M. phaseolina* and *B. cinerea* survive as sclerotia on plant residues and can also spread through seed contaminated with sclerotia. Germinating seedlings are killed off by

mycelia over-wintering beneath the seedcoats of *S. sclerotiorum* (Kufner 1987). Others like *S. rolfii* and *S. sclerotiorum* survive as sclerotia in the soil where they remain viable for several years. They have a wide host range and previous planting of susceptible crops means that there is ample initial inoculum present in the soil before the seeds of sunflower are sown.

Figure 2. Average yields in selected areas, 1985 (kg/ha)



Emerging seedlings may be affected by mycelia arising from sclerotia in the soil. The dead plants provide favourable conditions for more sclerotia to develop. Local farming practices can also encourage the development of some diseases. In the Guinea Savanna region of Nigeria, small farm holdings are often intercropped. In many instances, the different crops are susceptible to the same pathogen. Since the crops are not harvested at the same time, they ensure a continuous presence of the fungus on the same area of land. When a susceptible sunflower crop is grown the next planting season on the same patch of ground, the disease can assume epidemic proportions. *Sclerotium rolfii* is an example of this (Okoli *et al.* 1991). The intensity of damage to sunflower plants by a fungus like *S. rolfii* may therefore be mainly determined by the wrong rotation of crops, since continuous planting of susceptible varieties serve to increase incidence and severity of a given fungus.

In the Nigeria Guinea Savanna, diseased tissues are not completely destroyed after harvest and may serve as the primary source of inoculum for most fungi such as *A. helianthi* (unpublished

data). Weeds and volunteer plants often serve as sources of primary inoculum to disease, such as *Alternaria* leaf spot (Okoli *et al.* unpublished results).

Epidemic outbreaks reduce yield considerably. Plants are weakened by fungal attacks, making the plants susceptible to attacks by other pathogens. Kufner (1987) suggested that mainly weak plants that are already damaged by some other pathogen are attacked by *Alternaria*. Nigeria is not the only country where sunflower cultivation is threatened by diseases. Zimmer and Hoes (1978) and Sackston (1962, 1981) have recognized rust as an important disease of sunflower in different parts of the world.

Alternaria helianthi has been recognized worldwide (Acimovic 1969; Acimovic 1975; Alcorn and Pont 1972; Allen *et al.* 1983, 1985; Anikumar *et al.* 1974; Hansford 1943; Herr and Lipps 1981; Islam and Maric 1978; Mukewar *et al.* 1974; Narain and Saksena 1973; Shane *et al.* 1981; Takano 1963; Travathan and Roy 1980; Tubaki and Nishihara 1969; Okoli *et al.* unpublished) as one of the most destructive pathogens of sunflower. Sackston (1978) described it as one of the most recent leaf-, stem-, and head-spotting pathogens to attract attention and the one that appears to be the most threatening.

Zimmer and Hoes (1978) have also recognized that diseases such as downy mildew can be the single most important factor affecting growth of sunflower in America while Emechebe *et al.* (1980) and Sackston (1981) have stated that charcoal rot is a major problem throughout the world and reduces seed yields by 20-36% (Tikhonov *et al.* 1976). It is essential that the epidemiology of the major diseases be investigated if the potential of sunflower as a source of vegetable oil in Nigeria is to be realized. Studies should include pathogen life cycles, dissemination, environmental conditions affecting the diseases, cultivar susceptibilities, yield losses and possible methods of control. These would all be part of the necessary data that can be used to formulate possible control measures which would be at a level of technology that the rural farmer can both accept and afford. It should be noted that the epidemiology of *A. helianthi* and *S. rolfii* are already being investigated based on the results of this preliminary survey.

REFERENCES

- Abraham K.J., Menon M.R., and Nair M.C. (1976). Microflora associated with sunflower seeds. *Agricultural Research Journal Kerala* 14: 97-98.
- Acimovic M. (1969). *Alternaria* sp. - a new parasite of sunflower in Yugoslavia (Preliminary comment) *Zastita Bilva* 19: 305-309.
- Acimovic K.J. (1975). Occurrence and intensity of attack of some more significant diseases of sunflower in Iran in 1971 and 1972. *Bilten Ulja I Masti Broj* 3-4 Beograd.
- Alcorn J.L. and Pont W. (1972). *Alternaria helianthi* on sunflower. *Australian Plant Pathology Newsletter* 1: 30.
- Allen S.J., Brown J.F., and Kochman J.K. (1983). The infection process, sporulation and survival of *Alternaria helianthi* on sunflower. *Annals of Applied Biology* 102: 413-419.
- Allen S.J., Brown J.F., and Kochman J.K. (1985). Production of inoculum and field assessment of *Alternaria helianthi* on sunflower. *Plant Disease* 67: 665-668.
- Anilkumar T.B., Urs S.D., Seshadri V.S. and Hedge R.K. (1974). *Alternaria* leaf spot of sunflower. *Current Science* 43: 93-94.
- Emechebe A.M., Erinle I.D., Bos W. and Tyagi P. (1980). Check-list of diseases of crops in Northern Nigeria. *Samaru Miscellaneous Paper*. pp 19-20.

- Hansford C.G. (1943). Contributions towards the fungus flora of Uganda. V. Fungi imperfecti. *Proceedings of the Linnaean society of London 154th session*. 1942-1943. pp 34-67.
- Herr L.J. and Lipps P.E. (1982). Occurrence of *Alternaria helianthi* on sunflower in Ohio. *Plant Disease* 66: 509-512.
- Islam U. and Maric A. (1978). *Alternaria helianthi* (Hans) Tub. and Nish. on sunflower in Yugoslavia and some cultural characteristics of the fungus. *Zastita Bilva* 29: 219-236.
- Kufner E.G. (1987). *Agricultural News*. BASF Aktiengesellschaft, D-700 Ludwigshafen, Germany.
- Mukewar P.M., Lambat A. K., Nath R., Majumdar A., Rani I., and Chandra K.J. (1974). Blight of sunflower caused by *Alternaria helianthi* (Hans) Tub and Nish in India. *Current Science*. 43: 346-347.
- Narain U. and Saksena H.K. (1973). Occurrence of *Alternaria* leaf spot of sunflower in India. *Indian journal of Mycology and Plant Pathology*. 3: 115-116.
- Ogunremi E.A. (1979). Effect of sowing date on sunflower (*Helianthus annuus* L) performance in southwestern Nigeria. *The Sunflower Newsletter*. 3: 15-19.
- Okoli C.A.N., Erinle I.D., Misari S.M., Poswal M.A.T. and Emechebe A.M. (1991). Basal stem rot and wilt of sunflower in Nigeria caused by *Sclerotium rolfsii*. *Plant Disease* 75: 750.
- Sackston W.E. (1978). Sunflower disease mapping in Europe and adjacent Mediterranean countries. In: *Proceedings of the 8th International Sunflower conference*. Minneapolis MN. pp 7-27.
- Sackston W.E. (1981). The sunflower crop and disease: Progress, problems and prospects. *Plant Disease* 65: 269-271.
- Shane W.W., Baumer J.S. and Sederstrom S.G. (1981). *Alternaria helianthi*: a pathogen of sunflower new to Minnesota. *Plant Disease* 65: 269-271.
- Takano K. (1963). A disease of sunflower caused by species of *Alternaria*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 28: 300.
- Tikhonov O.I., Nedelko V.K. and Perestova T.A. (1976). Periods of infecting and dynamics of the proliferation of *Sclerotium bataticola* in sunflower tissues. In: *Proceedings of 7th International Sunflower Conference*. pp. 210-218.
- Travathan L.E. and Roy K.W. (1980). *Alternaria* leaf and stem diseases of sunflower. *MAFES Information Sheet*: 1295. MAFES, Mississippi State.
- Tubaki K. and Nishihara N. (1969). *Alternaria helianthi* (Hansf) Comb. Nov. *Transactions of the British Mycological Society* 53 (1): 147-149.
- Zimmer D.E. and Hoes J.A. (1978). Diseases. In: *Sunflower Science and Technology Agronomy* 19. J.F.Carter, Ed. American Society of Agronomy, Madison. pp. 225-262.

**INFECTION DES TIGES DE MANIOC (*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ)
PAR *COLLETOTRICHUM GLOESPORIOIDES* PENZ,
AGENT PATHOGENE DE L'ANTHRACNOSE DU MANIOC**

Casimir MAKAMBILA

Laboratoire de Phytopathologie Faculté des Sciences BP 69
Université de Brazzaville Brazzaville, Congo

Résumé: *L'installation de Colletotrichum gloeosporioides sur les tiges de manioc se déroule en deux étapes. La première étape consiste en une réalisation d'une nécrose primaire résultant d'une piqure réalisée par une punaise: Pseudotherapus devastans. La deuxième étape consiste en une infection des tissus piqués à la suite d'une invasion de ceux-ci par les conidies de l'agent pathogène. Une méthode d'inoculation artificielle mise au point permet d'obtenir des symptômes identiques à ceux observés dans la nature: les facteurs nécessaires à l'obtention des symptômes en inoculation artificielle ont été étudiés. Il s'agit de la nature de la blessure (blessure réalisée à l'aide d'une aiguille chauffée ou refroidie), l'humidité relative et la température. L'action de ce dernier facteur a été étudiée respectivement sur la germination des conidies, la différenciation des appressoria et la formation des symptômes sur les tiges inoculées. La dernière partie de ce travail a été consacrée à l'étude de la sensibilité chez une quinzaine de cultivars locaux de manioc, vis à vis de Colletotrichum gloeosporioides agent pathogène de l'antracnose du manioc, en inoculation artificielle.*

Abstract: *Colletotrichum gloeosporioides attacks the stems of cassava in two steps. The first step involves a primary necrosis caused by a bug sting (Pseudotherapus devastans). The second stage is the development of infection in the stung tissue after invasion by the conidia of the Colletotrichum gloeosporioides. An artificial inoculation method has been developed and can be used to obtain symptoms that are identical to those observed in nature. Factors needed to obtain these symptoms through artificial inoculation were studied. The nature of the lesion (wound inflicted with a heated or cooled needle), relative humidity and temperature were studied. The effects of temperature on the germination of the conidia, appressoria differentiation, and the formation of symptoms on the inoculated stems were studied. The last part of the study focused on the susceptibility of some local cultivars of cassava to C. gloeosporioides, which, through artificial inoculation causes anthracnose of cassava.*

On désigne sous le terme d'antracnose, des maladies qui se caractérisent en général par des altérations nécrotiques se développant principalement sur les parties aériennes de la plante, tiges, feuilles, fruits et rameaux. En Afrique, les antracnoses, et principalement l'antracnose du manioc, sont rencontrés dans la zone intertropicale.

L'antracnose du manioc a pour la première fois été décrite par Hennings en 1903 (Chevaugéon 1956) à partir des pétioles provenant de Dar es Salaam (Tanzanie). L'agent pathogène fut appelé *Gloeosporium manihotis* Henn. En 1904, le même auteur décrivait à partir des feuilles de manioc provenant du Brésil, le *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. L'antracnose fut de nouveau décrite par plusieurs auteurs et l'agent pathogène fut désigné sous les noms de *Gloeosporium manihotis* par Bourriquet (1946), de *Glomerella manihotis* par Chevaugéon (1956), de *Colletotrichum manihotis* par Vandermeijer (1962) et de *Glomerella cingulata* par Irvine (1969).

De nos jours, la majorité des travaux entrepris considèrent *Colletotrichum gloeosporioides* forme spécialisée *manihotis*, comme étant l'agent pathogène de l'antracnose du manioc, maladie très répandue dans les zones productrices de manioc d'Afrique et d'Amérique latine (Affran 1962, Doku 1969, CIAT 1972, Lozan et Booth 1974, Makambila 1979).

Naturellement, l'installation de la maladie sur les tiges de manioc se déroule en deux étapes. La première étape consiste en une réalisation d'une nécrose primaire à la suite d'une piqûre réalisée par une punaise *Pseudotherapus devastans*. Cette étape consiste en une injection de la salive dans les tissus épidermiques et sous-épidermiques des tiges de manioc.

La deuxième étape est une infection des nécroses primaires à la suite d'une invasion de celles-ci par les conidiospores du champignon *Colletotrichum gloeosporioides*. Au niveau des nécroses primaires, les conidiospores germent et produisent un filament germinatif, un appressorium et un filament infectieux. La germination conduit à la formation d'un mycélium qui se propage au niveau de la nécrose primaire, et il se forme par la suite un symptôme. Une méthode d'inoculation artificielle des tiges de manioc a été mise au point (Makambila et Bakala Koumouno 1982). A partir de celle-ci, les effets des facteurs qui interviennent dans la formation des symptômes sur les tiges de manioc, ont été tour à tour étudiés.

Il s'agit de la nature de la blessure (blessure réalisée avec une aiguille chauffée ou refroidie) de l'humidité relative et enfin de la température. L'action de ce dernier facteur a été étudiée respectivement sur la germination des conidies de *C. gloeosporioides*, la différenciation des appressoria et enfin sur la formation des symptômes. Après avoir dégagé les effets de ces différents facteurs sur la formation des symptômes, une partie de ce travail a été consacrée à l'étude de la sensibilité chez une quinzaine de cultivars locaux de manioc, vis à vis de *Colletotrichum gloeosporioides* en inoculation artificielle.

MATERIEL ET METHODES

Description de la méthode d'inoculation artificielle utilisée

La méthode d'inoculation artificielle des tiges de manioc comprend deux étapes: a.) réalisation d'une blessure sur la tige au moyen d'une fine aiguille préalablement chauffée au rouge, puis piquée quatre fois sur la tige, sur une zone ayant 3 à 4 mm de diamètre. Il se forme une nécrose primaire; et b.) dépôt au niveau de la nécrose primaire d'un inoculum constitué soit par une suspension conidienne, soit par une pastille gélosée contenant du mycélium et des conidies (diamètre de la pastille 4 mm), prélevée sur une pré-culture âgée de quatre jours. Le matériel inoculé est ensuite incubé en présence d'un taux d'humidité relative proche de la saturation, et d'une température convenable. Des symptômes identiques à ceux observés dans la nature sont obtenus après sept jours.

Etude des effets de la nature de la blessure

Les fragments de tiges de manioc (70 mm de long) destinés à l'inoculation sont artificiellement blessés au moyen d'une aiguille selon deux méthodes. La première série des

tiges (série A) est blessée au moyen d'une aiguille chauffée au rouge. La deuxième série (série B) est blessée au moyen d'une aiguille refroidie ou non rechauffée. Tous les fragments inoculés sont introduits dans des boîtes en plexiglass (diamètre=115 mm, haut=220mm) en présence d'un taux d'humidité élevé (soit 87%) et incubé à 28° C.

Etude des effets de l'humidité relative

Les fragments de tiges de manioc à inoculer sont blessés artificiellement au moyen d'une aiguille chauffée. Les fragments sont par la suite inoculés avec une suspension conidienne de l'agent pathogène. Une fois les inoculations réalisées, les tiges sont réparties en deux séries comprenant chacune 10 fragments: les tiges de la série A sont enfermées dans les mêmes boîtes en plexiglass. Pour maintenir à l'intérieur du dispositif un taux d'humidité relative élevé, nous y avons introduit à l'intérieur du dispositif, un morceau de coton hydrophile stérilisé et imbibé d'eau stérile. Le taux d'humidité relative obtenu dans ces conditions et mesuré à l'aide d'un hygromètre (Präzisions Hygrometer) est de 87%. Les tiges appartenant à la série B sont aussi placées dans des boîtes en plexiglass et incubées dans une chambre à air conditionné. Le taux d'humidité relative obtenu dans ces conditions et mesuré à l'aide du même hygromètre, est de 54%. Toutes les boîtes sont incubées à 28°C.

Etude des effets de la température

Les effets de ce facteur sont respectivement étudiés sur la germination des conidies, et la formation des symptômes sur les fragments de tiges inoculées. Les valeurs suivantes sont adoptées, 12°, 16°, 20°, 24°, 28°, 32°, 36° et 38°C.

• *Germination des conidies*

La germination des conidies ou la différenciation des tubes germinatifs est réalisée en cellule de Van Tieghem sur milieu malté à 1% (malt 10 g, gélose 14 g, eau bidistillée 1000 ml) et autoclavé à 120°C pendant 20 minutes et dans laquelle une suspension conidienne est introduite. Les observations microscopiques permettant de dénombrer le taux de conidies germées sont effectués après 8h 30.

• *Différenciation des appressoria*

Des fragments de tissus végétaux sont prélevés sur des parties non encore lignifiées d'une tige de manioc et placés secondairement sur des lames de verre. Une suspension conidienne est par la suite étalée sur ces fragments de tissus, sur la face cuticulaire.

Les lames de verre sont par la suite introduites dans des boîtes de Pétri, en présence d'un taux d'humidité relative élevée. Les lames sont observées au microscope après 48 heures et le pourcentage des conidies ayant différencié des appressoria par rapport aux conidies germées est établi.

Etude de la sensibilité de l'hôte à l'agent pathogène: Colletotrichum gloeosporioides

Une dizaine de cultivars locaux de manioc sont considérés. Les fragments de tiges (200 mm de long) sont piqués à l'aide d'une aiguille chauffée, puis inoculés avec une suspension conidienne de la souche CM₁ ou des souches CM₁₁, CM₁₆, CM₄ et CM₁₂, puis introduits dans des boîtes en plexiglass en présence d'un taux d'humidité relative élevé (87%) et incubés à 28°C pendant 10 jours.

RESULTATS

Description des symptômes obtenus par inoculation artificielle des tiges de manioc

Les symptômes obtenus après 10 jours sont identiques à ceux qui sont observés sur les tiges de manioc dans les conditions naturelles. Ces nécroses sont circulaires ou ovales et recouvertes d'acervules, contenant des conidies différenciées par le mycélium de l'agent pathogène.

Effet de la nature de la blessure sur la formation des symptômes

Les résultats obtenus à partir des tiges appartenant à la variété MBouaki sont représentés sur le tableau no. 1. L'infection des tiges de manioc ne réussit qu'en présence d'une blessure réalisée par une aiguille chauffée au rouge, la blessure peut donc être efficace pour l'infection, que lorsque les cellules des tissus subissent une dégradation conduisant à une libération importante, au niveau de la blessure, de certaines substances cellulaires.

Tableau 1. Effet de la nature de la blessure sur la réalisation des symptômes de l'antracnose du manioc

Nombre de répétitions: 5; Température d'incubation: 28°

Dimensions des nécroses	Longueur en mm	Largeur en mm	Surface en mm ²
Nature de la piqûre			
Piqûre réalisée à l'aide d'une aiguille chauffée	30	9	270
Piqûre réalisé à l'aide d'une aiguille refroidie	0	0	0

Effet de l'humidité relative sur la formation des symptômes

Les résultats obtenus après six jours sont résumés sur le tableau no. 2a. Au sixième jour, les observations réalisées montrent que les surfaces nécrosées obtenues sur les tiges inoculées (série A) placées en présence d'un taux d'humidité relative élevé, sont respectivement égales à 32,5 (variété Ndombi), 66,5 (variété MBouaki) et 110 m² (variété NGampfo).

Au contraire toutes les tiges inoculées appartenant à la série B placées en présence d'un taux d'humidité relative peu élevé, ne présentent aucun symptôme. Seule une coloration brunâtre apparaît au cours des inoculations artificielles. L'infection des tiges de manioc n'est pas obtenue en présence d'un taux d'humidité relative peu élevée. Une relation semblable a été observée aussi chez d'autres champignons tel que *Gloeosporium aridum*, chez lequel l'infection est favorisée par un taux d'humidité élevé (Ogowa *et al.* 1977).

Tableau 2a. Effet de l'humidité relative (87%) sur la réalisation des nécroses de l'antracnose sur les tiges de manioc blessées à l'aiguille chauffée (Série A)

V₁: variété Ndombi; V₂: variété Mbouaki; V₃: variété Ngampfo

Dimensions des nécroses	V ₁	V ₂	V ₃
Longueur en mm	6,5	9,5	10
Largeur en mm	5,0	7,0	11
Surface en mm ²	32,5	66,5	110

Tableau 2b. Effet d'un faible taux d'humidité relative (54%) sur la réalisation des nécroses de l'antracnose sur les tiges de manioc blessées à l'aiguille chauffée (Série A'), les surfaces nécrosées obtenues correspondant aux surfaces nécrosées obtenues après piqure

V₁: variété Ndombi; V₂: variété Mbouaki; V₃: variété Ngampfo

Dimensions des nécroses	V ₁	V ₂	V ₃
Longueur en mm	3,5	3,5	3
Largeur en mm	3,0	3,5	3
Surface en mm ²	10,5	12,25	9

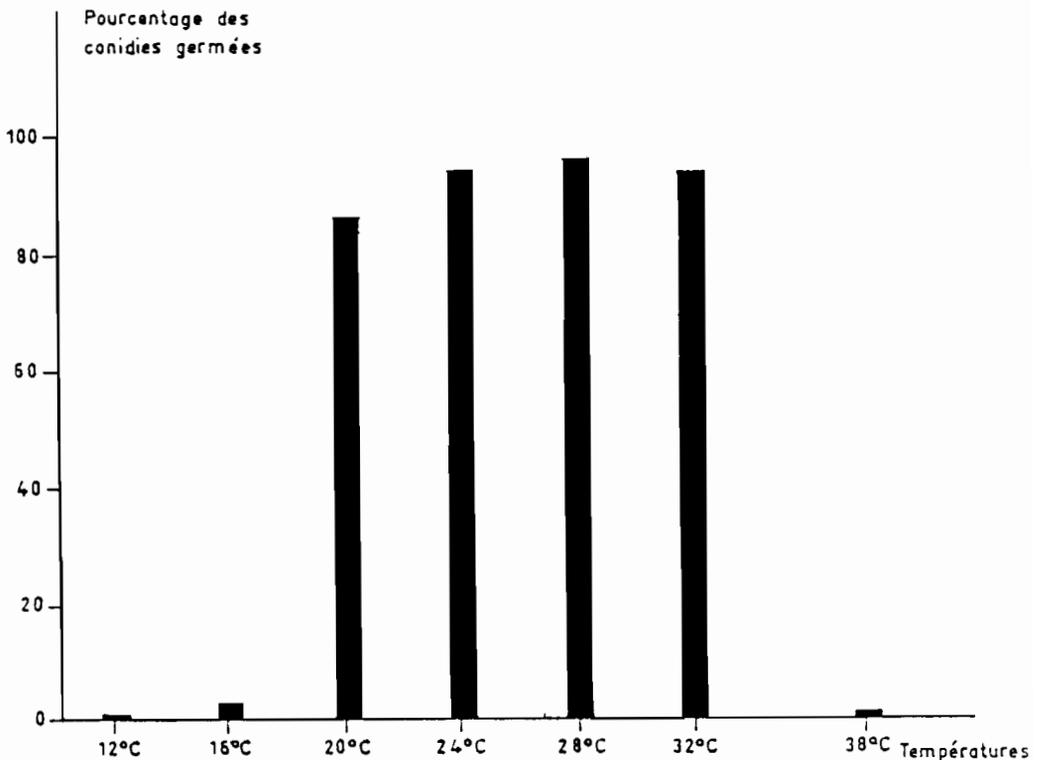
Denham et Waller (1981) et Chand *et al.* (1968) ont obtenu des résultats identiques chez *Gloeosporium fructigenum* Berk. agent pathogène de l'antracnose de la banane. Ces deux

auteurs ont montré que la réussite de l'infection et le développement de la maladie nécessitent un taux d'humidité relative supérieur à 80% et qu'en milieu artificiel, le développement de la maladie nécessite un taux d'humidité au moins égale à 92%. Dans les conditions naturelles, le taux d'humidité relative reste élevé pendant les périodes pluvieuses au cours desquelles il atteint des valeurs très élevées. Une relation a déjà été mise en évidence entre le nombre de plantes atteintes d'anthracnose et la pluviométrie dans les conditions naturelles (Makambila 1987) dans le cas de l'anthracnose du manioc.

Effet de la température sur la germination des conidies, la différenciation des appressoria et la formation des symptômes

La germination des conidies: L'observation microscopique des cellules de Van Tieghem après 8h 30 permet d'obtenir des résultats représentés sur la figure no. 1. L'optimum du taux de germination est observé pour les valeurs de la température comprises entre 20° et 32°C. Les pourcentages des conidies germées obtenus dans cet intervalle de température sont compris entre 85 et 96%. Les taux les plus faibles sont obtenus à 16° (3%), 12° et 38°C (1%). Chaque conidie germée différencie 1 à 3 filaments germinatifs.

Figure 1. Effet de la température sur le taux de germination des conidies de *C. manihotis* sur milieu malté à 1% en cellule de Van Tieghem



Différenciation des appressoria par les filaments germinatifs: Sur des fragments de tissus végétaux prélevés sur les parties non encore lignifiées de la tige de manioc, l'observation des conidies déposées sur la face cuticulaire des fragments de tissus, permet d'obtenir les résultats représentés sur le tableau no. 3. La différenciation des appressoria est soumise à l'influence de la température, et celle-ci ne peut avoir lieu que dans l'intervalle des températures comprises entre 20° et 28°C. En dessous et au-delà de ces valeurs, les conidies germent, émettent des filaments germinatifs, mais ne différencient pas d'appressoria. Les appressoria différenciés aux différents valeurs de la température 20°, 24° et 28°C sont tous morphologiquement identiques. Ils sont de forme circulaire ou ovale et constitués à leur périphérie par une épaisse couche melanisée.

Tableau 3. Effet de la température sur la différenciation des appressoria par les filaments germinatifs sur les fragments des tissus végétaux. Le taux de germination des conidies est ramené à 100%

Nombre de répétitions: 6

Nombre de conidies observées par répétition: 100

Températures en °C	12	16	20	24	28	32	36	38
% de germination des conidies	2	3	43,2	65	70	74	2	1
% de production des appressoria par les conidies germées	0	0	39	54	51	0	0	0

En résumé, la germination des conidies est optimale entre 20 et 32°C. La différenciation des appressoria par les conidies germées est observée à 20°, 24° et 28°C.

Dans le même ordre d'idée, les travaux réalisés par Machito-Tani *et al.* (1977) chez *Colletotrichum lagenarium* montrent que la différenciation des filaments germinatifs par les conidies de cet agent pathogène n'est possible que sur l'intervalle de températures compris entre 20 et 32°C, alors que la différenciation des appressoria nécessite des températures comprises seulement entre 20 et 28°C. Des résultats semblables ont été aussi obtenus chez le même agent pathogène par Norio, Shige et Akai (1969). Chez *Colletotrichum graminicola* (Skoropad 1967), la température favorable à la formation des appressoria est comprise entre 15 et 36°C et leur pénétration dans les tissus foliaires de l'orge ne peut avoir lieu qu'entre 25 et 32°C. Les appressoria formés à 15 et 20°C demeurant dormants.

Formation des symptômes: Les observations réalisées sur des tiges de manioc inoculées montrent que des symptômes de l'antracnose, les plus importants sont obtenus aux températures comprises entre 24 et 28° lorsque les fragments inoculés sont incubés à 16°C, l'infection se produit (Tableau no. 4).

INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

Tableau 4. Effet de la température sur la formation des nécroses de l'antracnose du manioc

Nombre de répétitions par température: 5
Taux d'humidité relative: 89,91%

	Températures en °C	16°	20°	24°	26°	28°	32°	36°
Dimensions des nécroses								
Longueur en mm		4	12,5	20	30	29,0	2	1
Largeur en mm		5	7	6	8	7,5	2	1
Surface en mm ²		20	87,5	120	240	217,5	4	1

Tableau 5. Variation de la sensibilité de quelques cultivars de manioc vis à vis d'une souche (CM1) de *Colletotrichum manihotis*

Température d'incubation: 26°C pendant 10 jours
Nombre de répétitions par cultivar: 5

Cultivars: A: NGampfo F: Moudouma
B: MBouaki G: Ntiti
C: Loméré 1 H: Siama
D: Mouloutou I: Dzouri
E: Mpembé J: Louméré 2

Génotypes de manioc	Dimensions des nécroses	Longueur mm	Largeur mm	Surface en mm ²
A		22	6	132
B		28	5	244
C		19	8	152
D		35	10	350
E		6	4	24
F		8	4	32
G		30	9	270
H		13	4	52
I		32	10	320
J		8	5	40

Les températures optimales qui favorisent le développement des nécroses en inoculation artificielle sont donc comprises entre 24 et 28°C. Cet intervalle de température permet aussi

un développement des symptômes dans le cas de l'antracnose du caféier dont l'agent pathogène est le *C. coffeanum* Noack. (Nutman et Roberts 1960, Walker 1937). Les résultats obtenus chez *Gloeosporium fructigenum* Berk. par Chand, Kondal et Aggarwal (1968) et par d'autres auteurs chez d'autres champignons (Chondhury 1957, Lauritzen *et al.* 1933, Leonard et Thompson 1976), confirment ces résultats.

Etude de la sensibilité des cultivars de manioc à Colletotrichum gloeosporioides

Sensibilité variétale du manioc: Dix cultivars locaux A, B, C, D, E, F, G, H, I et K sont piqués à l'aide d'une aiguille chauffée, puis inoculés avec une suspension conidienne de la souche CM₁, afin de noter la sensibilité de chacun d'eux vis à vis de *C. gloeosporioides*. Les symptômes obtenus après 10 jours sont mesurés et les résultats exprimés en surface des plages nécrosées sont représentés sur le tableau no. 5. Les nécroses formées sur les cultivars B, A, D, G et I sont plus importantes par leurs surfaces, que celles obtenues sur les cultivars E, F, H et K. Ces résultats montrent que la vitesse de propagation de l'agent pathogène varie d'un cultivar à un autre, et dépendrait donc de la sensibilité de chacun d'eux vis à vis de la souche de *C. gloeosporioides* utilisée.

Différences d'agressivité entre génotypes de C. gloeosporioides

Quinze cultivars ont été piqués à l'aiguille chauffée puis inoculés avec des suspensions conidiennes provenant de cinq souches de *C. gloeosporioides* (CM₁, CM₁₁, CM₁₆, CM₄ et CM₁₂). Les résultats obtenus après 10 jours avec les deux cultivars MPembé et Kilonda sont représentés sur le tableau no. 6.

Pour les cinq souches utilisées, les résultats obtenus permettent de faire les observations suivantes: parmi les cinq souches de *C. gloeosporioides* utilisées, l'agressivité varie d'une souche à une autre; les souches CM₁₁, CM₄ et CM₂₁ sont plus agressives et déterminent sur ces deux cultivars des nécroses assez développées; les souches CM₁ et CM₁₆ sont moins agressives et entraînent après inoculation sur ces deux cultivars la formation de nécroses aux dimensions réduites; pour deux cultivars inoculés, les plus petites nécroses sont différenciées sur le cultivar Mpembé; et si l'on considère les trois souches les plus agressives (CM₁₁, CM₄ et CM₂₁) les deux cultivars MPembé et Kilonda se comportent d'une manière différente. Le cultivar MPembé est cinq fois (en présence de CM₁), quatre fois (en présence de CM₄) et neuf fois (en présence de CM₂₁) moins sensible que le cultivar Kilonda inoculé avec les mêmes souches.

En considérant les cinq souches inoculés sur ces deux cultivars, les résultats montrent que la sensibilité de chaque cultivar aux souches de *C. gloeosporioides* diffère. Le cultivar MPembé est le plus sensible à la souche CM₄ et le cultivar Kilonda à la souche CM₂₁. Il y a donc une composante "Verticale" de la résistance. En tenant compte des surfaces nécrosées obtenues sur les 15 cultivars de manioc inoculés avec les cinq souches, le tableau no. 7 montre que les cultivars MPembé, Siana et Moudouma sont les moins sensibles à l'ensemble des souches de *C. gloeosporioides* utilisées pour les inoculations.

Tableau 6. Variation du pouvoir pathogène chez cinq souches de *C. manihotis* inoculées sur les fragments de tiges des cultivars "Mpembe" et "Kilonda"

Nombre de répétitions par souche: 5
 Température d'incubation: 26°C pendant 10 jours

Longueur (mm) largeur (mm)
 surface nécrosée (mm²)

Souches	CM ₁		CM ₁₁		CM ₁₆		CM ₄		CM ₂₁	
Dimensions des nécroses										
Longueur et largeur en mm et surface nécrosée	6	4	8	4	7	3	10	5	7	5
<i>Variété Mpembé</i>	24 mm ²		32		21		50		35	
Longueur et largeur en mm et surface nécrosée	19	6	18	6	8	4	25	7	35	10
<i>Variété Kilonda</i>	114 mm ²		108		32		175		305	

Tableau 7. Etude de la sensibilité de 15 cultivars de manioc vis à vis des souches de *Colletotrichum manihotis* (CM₁, CM₄, CM₁₁, CM₂₁, CM₁₆)

Surfaces nécrosées obtenues en 10 jours	Génotypes de manioc	
0-100 mm ²	Mpembé Moudouma	Siama
100-200 mm ²	Dzouri Mbonaki Moutsemina	NGamfo Moundele Mpakou MVoumina
200-300 mm ²	Mbouaki Ntiti	NDombi
300-400 mm ²	Kilonda Mouloutou	

Etude de la variation de la sensibilité à *C. gloeosporioides* le long d'une tige de manioc

Des fragments de tiges de manioc longs de 70 mm chacun (figure no. 2) sont utilisés. Chaque fragment est d'abord piqué à l'aiguille chauffée puis inoculé artificiellement avec la souche CM₁, puis incubé dans des conditions favorables à l'infection. Pendant six jours, la longueur des nécroses (ou leur surface) est mesurée sur chaque fragment, depuis les fragments de l'apex jusqu'aux fragments de la région inférieure de la tige.

Les résultats obtenus sont exprimés sur la figure no. 2. La zone caulinaires la plus favorable au développement des symptômes est celle qui est comprise dans la partie intermédiaire non encore lignifiée. Au dessus de celle-ci et plus précisément dans la zone apicale, les symptômes obtenus ici présentent des dimensions inférieures ou supérieures à celles des nécroses obtenues dans la partie intermédiaire. Sur les fragments apicaux, il a été obtenu dans certains cas un développement rapide de l'agent pathogène. Celui-ci est toutefois consécutif à une rapide dégradation des tissus se manifestant sur les fragments apicaux. Dans la partie inférieure de la tige au niveau de laquelle la lignification s'est déjà installée, les symptômes formés en sept jours sont ponctuels et ne semblent pas mettre en évidence une propagation de l'agent pathogène dans les tissus de la tige de manioc. Ces résultats mettent en évidence l'existence d'un gradient de sensibilité au champignon.

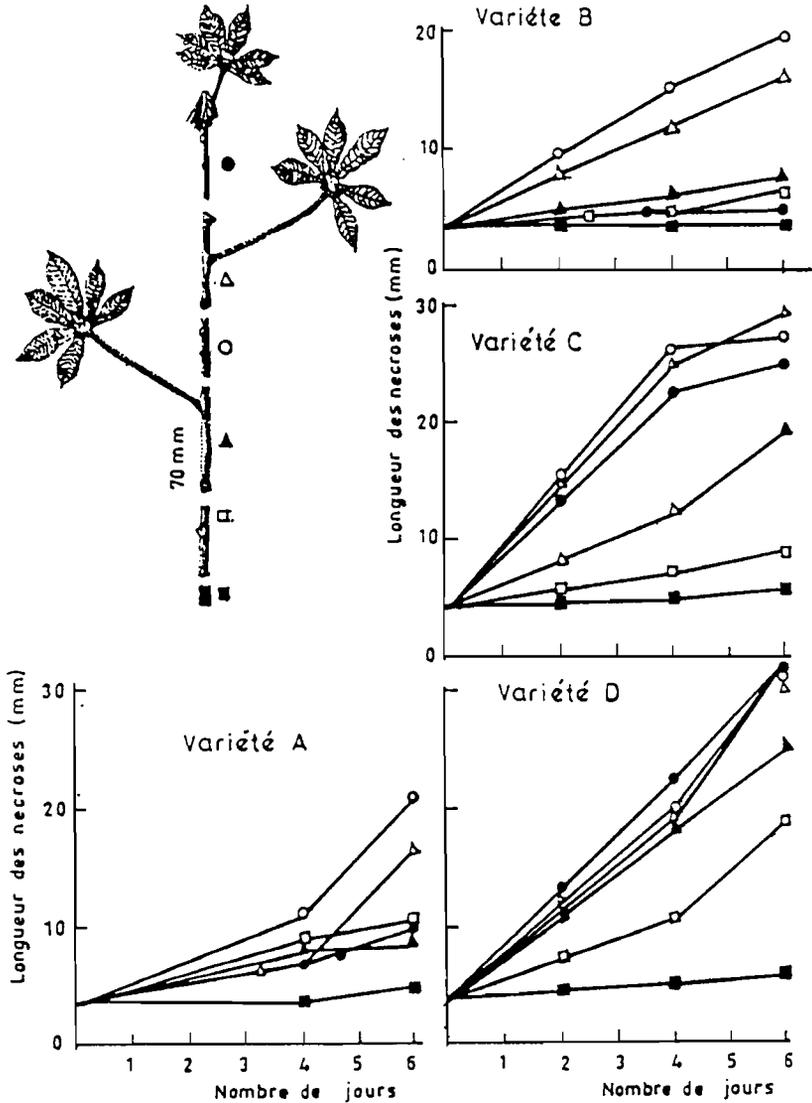
CONCLUSION ET DISCUSSION

L'installation de l'antracnose se déroule en deux étapes: réalisation d'une nécrose primaire par *Pseudotherapus devastans* et invasion de celle-ci par les conidies de *Colletotrichum gloeosporioides*. Les symptômes formés peuvent être obtenus artificiellement en réalisant des piqûres artificielles à l'aide d'une aiguille chauffée au rouge. La nature de blessure, une température favorable et un taux d'humidité proche de la saturation interviennent pour une réussite de l'inoculation.

La sensibilité de l'hôte vis à vis de *C. gloeosporioides* varie le long d'une tige de manioc. La zone caulinaires la plus favorable à l'action de *C. gloeosporioides* ne se situe pas au sommet de la tige, ni non plus dans les parties de la tige entièrement lignifiées. C'est au niveau de la zone subapicale non encore entièrement lignifiée que *C. gloeosporioides* différencie des nécroses caractéristiques. La sensibilité de la plante le long de la tige de manioc, présente une distribution qui subit l'influence du gradient de lignification. Les cultivars de manioc réagissent différemment vis à vis d'une souche de *C. gloeosporioides* et même, le pouvoir pathogène de ses souches diffère au sein d'un ensemble de souches.

On constate cependant, parmi plusieurs cultivars inoculés avec cinq souches une importante différence de sensibilité. Pour les cinq souches, le cultivar MPembé se révèle le moins sensible par rapport aux autres. Une résistance de type "vertical" apparaît dans ces conditions. Ces résultats nécessitent une étude d'interactions entre génotypes de l'hôte et génotypes du parasite, afin de confirmer l'existence de cette composante "verticale" de la résistance.

Figure 2. Variation de la sensibilité le long d'une tige de manioc inoculée artificiellement avec *C. manihotis*. L'évolution de l'infection est représentée par la longueur des nécroses obtenues sur chaque fragment inoculé pendant 6 jours chez 4 variétés de manioc, à 28°C.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Affran D.K. (1968). Cassava and its economic importance. *Ghana Farmer* 12: 172-178.
 Boisson et Renard (1967). Les maladies des plantes maraîchères en Côte d'Ivoire. *L'Agron. Trop.* 8: 669-675.
 Bourriquet G. (1946). Les maladies du manioc à Madagascar. *Bulletin économique de Madagascar, Tanananarive* 65: 198-237.
 Chand J.N., Kondal M.R. et Aggarwal R.K. (1968). Epidemiology and control of bitter rot of apple caused by *Gloeosporium fructigenum* Berk. *Indian Phytopathology* 21: 257-263.

- Chondhury M. and Ahmed (1969). Physiological specialisation of *Colletotrichum corhory*, the causal organism of anthracnose of jute (*Corchorus capsularis* L.). *Mycopathol. Mycol. Appl.* 38: 161-168.
- C.I.A.T. (Centro Internacional de Agricultura Tropical). (1972). C.I.A.T. Annual Report 1972. 192 pp., C.I.A.T., Cali, Colombia.
- Chevaugéon J. (1956). Les maladies cryptogamiques du manioc en Afrique occidentale. *Encycl. Mycol.* 28 Paul Lechalier, Edit. Paris.
- Denham G. and Waller J.M. (1981). Some epidemiological aspects of post bloom fruit drop disease. (*Colletotrichum gloeosporioides* in citrus). *Ann. appl. Biol.* 28, 65-77.
- Doku E.V. (1969). Cassava in Ghana. Faculty of Agriculture. Dept. of Crop Science. University of Ghana, Ghana University Press. 44 pp.
- Irvine F.R. (1969). Cassava (*Manihot utilissima*). In *West African Agriculture 2: West African Crops*. London, Oxford University Press. pp. 153-159.
- Lauritzen J.I., Harter L.L. and Whitney W.A. (1933). Environmental factors in relation to snap-bean diseases occurring in shipment. *Phytopathology* 23: 411-445.
- Leonard K.H. and Thompson D.L. (1976). Effects of temperature and host maturity on lesion development of *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 66: 635-639.
- Lozano J.C. and Booth R.H. (1974). Diseases of Cassava. (*Manihot esculenta* Crantz). *Pans* 20 no. 1, pp. 30-34.
- Makambila C. (1978). L'antracnose du manioc en République Populaire du Congo. In: *Diseases of Tropical Food Crops*. H. Maraité et J.A. Meyer Eds. Proceedings of an International Symposium. UCL Louvain -la- Neuve Belgium, 1-316.
- Makambila C. et Bakala Koumouno L. (1982). Inoculation artificielle des tiges de manioc avec *Colletotrichum manihotis* Henn. *L'Agron. Trop.* 37 (2). pp. 172-173.
- Makambila C. (1987). Etude de l'antracnose du manioc (*Manihot esculenta* Crantz) et son agent pathogène *Colletotrichum gloeosporioides* Penz f. sp. *manihotis* Henn. Thèse de Doctorat d'Etat. Univ. de Clermont II. France pp. 1-154.
- Machito - Tani, Norio Ishida and Fusurawa L. (1977). Effects of temperature on appressoria formation in spores of *Colletotrichum lagenarium*. *Can. J. Microbiol.* 23: 626-629.
- Norio L. and Shige Yasu Alai (1969). Relation of temperature to germination of conidia and appressorium formation in *Colletotrichum lagenarium*. *Mycologia* 1: 382-385.
- Nutman F.J. and Roberts F.M. (1960). Investigations of the diseases of *Coffea arabica* caused by a form of *Colletotrichum coffeanum* NOACK. II. Some factors affecting germination and infection and their relation to disease distribution. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 43 (4): 643-659.
- Ogowa J.M., Bose E., Manji B.I., and Petersen L.J. (1977). Life cycle and chemical control of Modesto tree anthracnose. *Plant Dis. Rept.* 61. 792-796.
- Resplandry R., Chevaugéon J., Delassus M. et Luc M. (1954). Première liste annotée de champignons parasites des plantes cultivées en Côte d'Ivoire. *Ann. Epiphytes* 1: 1-61.
- Soropad W.P. (1967). Effect of temperature on ability of *Colletotrichum graminicola* to form appressoria and penetrate barley leaves. *Can. J. Plant. Sciences* 47: 431-434.
- Vandermeyen A. (1962). Maladies cryptogamiques. In: *Précis des maladies et des insectes nuisibles sur les plantes cultivées au Congo, au Rwanda et au Burundi*. Septième partie pp. 471-480. Brussels, Institut National pour l'étude agronomique du Congo.
- Walker J.C. (1957). *Plant pathology*. McGraw-Hill. New York. 707 pp.

SEED INFECTION BY *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV *PHASEOLICOLA* AND MOVEMENT OF THE BACTERIUM IN *PHASEOLUS* BEANS

Betty GONDWE

Uyole Agricultural Centre P.O. Boz 400 Mbeya Tanzania

Abstract: Tests on detecting the movement of the halo blight bacterium are described in this paper. Some isolates of the halo blight bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* appear to survive and move in cultivars Edmund and Red Mexican. Results were not sufficient enough to arrive at any conclusions as to the extent of the bacterial movement in different parts of the bean plants. Additional studies with modifications should be carried out before any firm confirmation on bacterial movement in resistant bean cultivars is made. Indications that the bacteria can survive in resistant cultivars may partially account for the variations observed in races of pathovar *phaseolicola*. The infection rate in seeds collected from three districts in the southern highlands of Tanzania was low.

Résumé: Les tests réalisés pour détecter les mouvements de la bactérie agent de la gousse du haricot, sont décrits dans cette étude. Il semble que certains isolats de la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* survivent et se déplacent dans les cultivars Edmund et Red Mexican. Les résultats sont insuffisants néanmoins et ne permettent pas de déterminer l'importance relative de ces déplacements dans les différentes parties du haricot. Avant de pouvoir faire réellement la preuve que la bactérie se déplace dans les cultivars de haricots résistants, il est souhaitable de procéder à d'autres études auxquelles des modifications auront été apportées. Des indices laissant apparaître que la bactérie peut survivre dans des cultivars résistants peuvent expliquer en partie les variations observées dans des races de pathovars *phaseolicola*. On n'a constaté qu'une infection légère des semences collectées dans trois districts des hauts plateaux du sud de la Tanzanie.

The seed plays a major role in transmitting the disease halo blight (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* [Burk] Young et al. [= *P.s phaseolicola*], (Burkholder 1930, Zaumeyer 1932). Although several methods have been devised for detecting the halo blight bacterium in seed (Wilson 1938, Katznelson and Sutton 1951, Guthrie, Huber and Fenwick 1938, Wharton 1947, Taylor 1970, Trigalet and Rat 1975) little emphasis has been placed on disease transmission. Until now no firm evidence for the movement of the halo blight bacterium from seed to seedling and from seedling to other plant parts has been demonstrated. Work done by Omer and Wood (1969) suggested limited movement. Hilderbrand and Schroth (1971) demonstrated a more extensive movement while Taylor (1979) found no evidence for the translocation of the pathogen from other plant parts of infected plants to the seed.

However, progress has been made on the pathogenic variation of *P. s. phaseolicola*. Patel and Walker (1965) reported the existence of two races based on whether or not the bean cultivar Red Mexican has been infected. Taylor and Teverson (1985) reported the identification of a third race that was virulent toward the *P. vulgaris* L. cultivar with a single gene for resistance. Taylor and Teverson recently (1991 pers. comm.) described nine races of *P. s. phaseolicola* based on their interaction with eight differential cultivars. A five gene model described allows for possibly 32 races. In other accounts, (Schroth *et al.* 1970, Coyne *et al.* 1979, Gondwe 1990) reported the lack of homogeneity within strains of *P. s. phaseolicola* with respect to virulence when tested on a number of cultivars. The results of

these various workers might suggest that there is an infinite number of strains/races within *P. s. phaseolicola* ranging from mild to highly virulent.

New and possibly more virulent races of a pathogen could be developed through a number of processes. One possible means could be through a mutation and by selection on passing through a resistant or tolerant cultivar. Hill *et al.* (1972) observed that the halo blight bacteria could multiply in inoculated tolerant plants of GN Nebraska, # 1 selection 27 and PI 150414. This paper presents results on movement of the bacterium in cultivars Edmund and Red Mexican U13. Tests on seed infection by the pathogen are also reported.

MATERIALS AND METHODS

The experiments were conducted at the Uyole Agricultural Centre - Mbeya, in the southern highlands of Tanzania. With regard to the bacterial cultures, the origins of isolates used are shown in Table 1. Isolation was done using the standard bacteriological techniques as reviewed by Bradbury (Anon 1984). Kings medium B (King *et al.* 1954), was used for isolation and Yeast Dextrose Carbonate was used for maintenance of the cultures.

Table 1. Strains from halo blight infected beans and their reactions

Strain no.	Date collected	Host plant	Place of origin	Fluorescence	Pathogenicity on cw green pods
9113	Dec. 1990	<i>P. vulgaris</i>	Ileje	+	P
9114	Dec. 1990	<i>P. vulgaris</i>	Ileje	+	P
9117	Dec. 1990	<i>P. vulgaris</i>	UAC	-	B
9121	Jan	<i>P. vulgaris</i>	UAC	+	P
9122*	Jan	<i>P. vulgaris</i>	UAC	+	P
9134	Feb. 1991	<i>P. vulgaris</i>	UAC	+	NP
9161	Feb. 1991	<i>P. vulgaris</i>	UAC	+	N
9163a	March 1991	<i>P. coccineus</i>	UAC	+	NP
9163b	March 1991	<i>P. coccineus</i>	UAC	+	NP
9163c*	May 1991	Yellow lablab	UAC	+	P
9166a	May 1991	Yellow lablab	UAC	+	P
9166c*	May 1991	Yellow lablab	UAC	+	P
9166d*	May 1991	Yellow lablab	UAC	+	P
9166e*	May 1991	Yellow lablab	UAC	+	NP
9166h	May 1991	Yellow lablab	UAC	+	NP

* = Brown diffusible pigmentation in media, B = Browning at point of inoculation, P = Pathogenic on Canadian wonder green pods, Ileje = A district in Mbeya region bordering Malawi, NP = Non pathogenic, UAC = Uyole Agricultural Centre, CW = Canadian wonder.

Pathogenicity tests

Pathogenicity tests were done by pod inoculation. Freshly picked green pods of Canadian wonder plants grown in a glasshouse were stab inoculated using a needle charged with a 48 hour bacterial growth. Pods were stored in humid containers at room temperature and evaluated after four days. Positive reactions were recorded where grease spots were evident.

Test cultivars:

A set of differential cultivars previously used in halo blight race identification as described by Taylor and Teverson (1985) were used (Table 2). In addition, Yellow lablab and *coccineus* were tested. Four plants per pot were grown in sterile soil in 15 cm plastic pots in a greenhouse. Forty-eight hour growth cultures were used to inoculate the plants at crookneck stage. A sterile needle charged with the bacterial growth was stabbed through the hypocotyl. After inoculation, plants were kept on a bench in the glasshouse. Disease reactions were recorded 14 days after inoculation.

Table 2. Details of cultivars tested for reactions to the halo blight strains

Cultivar	Origin
Canadian wonder	Horticultural Research
Tendergreen	International-Wellesbourne
Edmund	UK
Red Mexican U13	
Yellow lablab	UAC-Pasture Research Section
<i>P. coccineus</i>	

Bacterial movement in resistant bean plants

Freshly picked primary leaves were macerated in a small amount of sterile distilled water (petiole and leaf blade separately) and left to stand for two hours before a loopful of the extract was streaked on dry plates of Kings Medium B. Plates were incubated at 25°C for three days. Fluorescent colonies were picked, subcultured on fresh media and tested for pathogenicity by inoculation on cultivar Canadian wonder. The trifoliolate was assayed (using a method similar to that followed in assaying the primary leaves) two weeks after the assay for primary leaves to the determine presence or absence of the bacterium in other plant parts,.

A similar procedure was followed for testing the bacterial presence in the blossoms. Green pods were assayed a month later. For the evaluation, bacterium was recorded present (+) after recovering it from the assayed plant part and proving its pathogenicity on the Canadian wonder cultivar. The symbol ++ was given where populations were very high (continuous streak), and the symbol + was given where populations were normal. Colonies were not counted because in most cases they coalesced.

Tests for seed infection

Bean seeds were collected from experimental stations, market places and from an individual farmer in Sumbawangas in the southern highlands of Tanzania. The dry seeds were ground to flour (using an electrically operated grinding mill) which was then dispensed in sterile distilled water (5 gms in 100 mls) shaken and left to stand for four hours, when the supernatant liquid (one drop) was plated on dry plates of Kings Medium B for three days at 25°C. Fluorescent colonies were subcultured and the pure cultures were subjected to pathogenicity tests (pod inoculation) for identification.

RESULTS

Excluding results from strains 9117, 9166h, 9121, 9134, 9166i and 9163b, which showed no reaction on cultivars Edmund, Tendergreen, Canadian wonder, Red Mexican U13, Lablab and *P. coccineus*; reaction of the remaining eight isolates are of differential value (Table 3). Cultivar Canadian wonder and Tendergreen were highly susceptible to all eight strains. All the plants from these cultivars were killed 14 days after inoculation. Cultivar Edmund showed complete resistance to 9113, 9114, 9122 and 9166e. Cultivar Red Mexican U13 showed susceptibility to strains 9166c, 9166e, 9166d and 9163c. Surprisingly, one plant from cultivar Red Mexican inoculated with strain 9166d survived. All the strains except 9166e were non-pathogenic to Yellow lablab. Moreover, *P. coccineus* showed susceptibility to strains 9122, 9166d and systemic reaction to strains 9166e, 9161, 9114, 9163c and 9113.

Table 3. Reaction of various bean cultivars to strains of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

Strain no.	Canadian wonder	Tender green	Edmund	Red Mexican	Yellow lablab	<i>Phaseolus coccineus</i>
9113	HS	HS	R	R	-	Systemic
9114	HS	HS	R	R	-	Systemic
9117	-	-	-	-	-	-
9121	-	-	-	-	-	-
9122b	HS	HS	R	-	-	S
9134	-	-	-	-	-	-
9161	HS	HS	SS	-	-	Systemic
9163a	-	-	-	-	-	-
9163b	-	-	-	-	-	-
9163cb	HS	HS	SS	S	-	S
9166a	-	-	-	-	-	-
9166cb	HS	HS	SS*	S	-	NT
9166db	HS	HS	SS	S	-	HS
9166eb	HS	HS	R	S	S	Systemic
9166h	-	-	-	-	-	-

HS = Highly susceptible, NT = Not tested, S = Susceptible, - = No reaction, SS = Severe stunting, b = Brown diffusible pigmentation, * = One plant exhibited after water soaking in media.

The results on bacterial movement in different plant parts are shown in Table 4. The pathogen was readily recovered from petioles and leaf blades of the primary leaves of the cultivars Red Mexican and Edmund, which survived after inoculation with the pathogen. Variation was noted in cultivar Edmund inoculated with strain 9114, where no bacterium was recovered. Strain 9113 could not be recovered from the petioles of cultivar Edmund. Strains 9122, 9161 and 9166d could not be recovered from the leaf blades of the primary leaves of cultivar Edmund. None of the strains tested could be recovered from any of the trifoliolate leaves of any of the cultivars used in the study.

The only blossom from which the bacterium was recovered was from cultivar Edmund inoculated with strain 9166c. Results from assays made on small green pods indicated slight presence of the bacterium that was recovered from cultivar Red Mexican U13 inoculated with strain 9161. In tests for seed infection, fluorescent colonies were recorded in cultivar Kabanyolo from Sumbawanga. Subcultures gave pure fluorescent colonies typical of *P.s. phaseolicola*. The strain proved to be pathogenic on Canadian wonder green pods. Yellowish, mucoid and white colonies with whorled centres were the most dominant growths in most of the isolation plates.

DISCUSSION

Halo blight of beans is mainly a seed-borne disease which implies that the bacterium must gain access to the seed through certain processes. Zaumeyer (1932) reported in his work that the bacteria can this access may occur by the penetration of the pod wall from external lesions and if infection occurs in the sutures of the pod, the bacteria will follow the vascular system of the sutures and enter the seed by way of the funiculus. Other workers suggest that the bacteria may travel from the base of the stem to the leaves without expression on the plant surface and that they may pass through the pod pedicel and continue into the pod and seed by way of the vascular system (Chupp and Sherf 1960). The general knowledge on translocation of the pathogen is systematically unsettled.

Work done by Omer and Wood (1969) suggested only limited movement, while Hilderbrand and Schroth demonstrated more extensive movement. In contrast, Taylor *et al.* (1971) found no evidence for the translocation of the bacteria from other parts of the plant to the seed. Working with *Xanthomonas phaseoli*, Aggour *et al.* (1989) reported the systematic transmission of the pathogen from inoculated pedicels of the flower buds and small pods through the vascular tissue of the pod to the seeds, causing internal infection without any external symptoms on either pods or seeds. They also found out that planting infected seed did not result in systemic transmission of the bacteria to the seeds. This study has shown that *P.s. phaseolicola* can be translocated up the bean stem from the inoculated hypocotyl to the primary leaves (Table 4). The results concur largely with those of Omer and Wood (1969), which suggested a limited movement of the bacterium. Failure to recover the bacterium from the trifoliolate and the inflorescence could be attributed to the diagnostic procedure followed. Assays for the different plant parts were done at diverse intervals. For example, the primary leaves were assayed four weeks after inoculation.

Table 4. Assays of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in different bean plant parts

Isolate no.	Cultivar	Primary leaf		Trifoliolate		Influorescence	Green pod (+/ves)	Pathogenicity of the isolates
		Petiole	Leaf blade	Petiole	Leaf blade			
9113	Red Mexican	+	+	-	-	-	-	+
	Edmund	-	+	-	-	-	-	+
9114	Red Mexican	++	+	-	-	-	-	+
	Edmund	-	-	-	-	-	-	-
9122	Red Mexican	+	+	-	-	-	-	+
	Edmund	+	-	-	-	-	-	+
9161	Red Mexican	+	+	-	-	-	-	+
	Edmund	+	-	-	-	-	-	+
9163c	Edmund	+	+	-	-	-	+	+
9166c	Edmund	+	++	-	-	+	NT	+
9166d	Edmund	+	-	-	-	-	-	+
9166e	Edmund	+	+	-	-	-	-	+

NT = Not tested, - = no growth, ++ = Continuous streak of pure growth on KMB, + = traces of Psp growth, + = Numerous colonies (not countable) on KMB,

Table 5. Infection of dry bean samples by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

Cultivar	Place of origin	Characteristics of bacterial cultures	
		Fluorescence	Pathogenicity
Nyamuhanga	Iringa market	-	-
Nyamuhanga-like	Sumbawanga	-	-
	Leonard	-	-
	Sungura	-	-
Kabanima	Nkundi	-	-
Kabanyolo	Sumbawanga	+	++
Lotu	UAC	-	-
UAC 41	Sumbawanga	-	-
Uyole 84	UAC	-	-
Chipukupuku	UAC	-	-
Ilomba	UAC	-	-

+ = Colony fluorescing, - = Not fluorescent, ++ = Large greasy spot at point of inoculation.

Subsequent tests for the trifoliolate and the blossoms were done at two-week intervals. The genotypic availability of the tested cultivars could also account for the observations made.

Genotypic variation in the multiplication of *P.s. phaseolicola* has been reported by Stadt and Saettler (1981), Katherman *et al.* (1980) and Omer and Wood (1969). Small pods were assayed one month after flower initiation. A trace of the *P.s. phaseolicola* was recovered from small pods of cultivar Red Mexican U13 inoculated with strain 9161. Taken together, these results indicate the transmission of the bacteria through the vascular tissue of the plant to the pods.

These findings are of practical importance. Working on *Erwinia stewarti*, the causal organism of Stewart's wilt of corn, Wellhausen (1937) and Lincoln (1940) showed that the virulence of a bacterial population of *Erwinia stewarti* increased through mutation and selection by passage through a tolerant corn cultivar. Resistant cultivars are traditionally developed on the basis of disease symptoms. The ability of a resistant cultivar to support the growth of a pathogen in the absence of symptoms is therefore an obvious danger. The role of systemic transmission of *P.s. phaseolicola* in tolerant/resistant bean cultivars as it relates to development of strains with altered virulence is another area of importance that should be studied. Such studies are necessary to verify these results and the conclusions by Schroth *et al.* (1970) that indicate that there is probably an infinite number of races of halo blight ranging from mild to highly virulent.

Results from the current study indicate that *P.s. phaseolicola* multiplied in some plant parts of the two bean genotypes. Studies on population size are needed to determine population levels in different bean cultivars. Such studies will provide useful information for the bean seed industry.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank Mrs E. Mgaya and Mr Elias of Plant Protection Section (Uyole Agricultural Centre) for their assistance. The cooperation of technicians in the Chemical Laboratory is also gratefully acknowledged. Thanks are also extended to Mrs. Rehema Mwatawala for typing the manuscript. Continuation of work on halo blight in the southern highlands of Tanzania has been possible thanks to support from the International Foundation for Science, to whom I am very grateful.

REFERENCES

- Aggour A.R., Coyne D.P., Vidaver A.K. and Eskridge K.M. (1989). Transmission of the common blight of pathogen in bean seed. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. b) 1008 (En, 14 ref) University of Nebraska, Lincoln (Abst.).
- Bulkholder W.H. (1930). The bacterial diseases of the bean. *Memoirs. Cornell University Agricultural Experiment Station. Bulletin No. 27.*
- Chupp C. and Sherf A.F. (1960). *Vegetable diseases and their control*. Constable, London. pp. 104-115.
- Coyne D.P., Schuster M.L. and Erwin C. (1979). Reaction of *Phaseolus vulgaris* germplasm to new virulent strain of *Pseudomonas phaseolicola*. In: *Annual Rept. Bean Improvement Coop. (Mimeo)*. M.H. Dickson Ed. N.Y. Agr. Ext. Sta. Geneva N.Y. pp. 20-21.

- Gondwe B. (1990). Reaction of *Phaseolus vulgaris* L. to isolates of the halo blight bacterium from Mbeya. Paper presented to the 9th SUA/WSU Bean CRSP and 2nd SADCC/CIAT Regional Bean Research Workshop Sept. 17-22 1990. Morogoro, Tanzania. (In press).
- Guthrie J.W., Huberd D.M. and Fenwick H.S. (1965). Serological detection of halo-blight. *Plant Disease Reporter* 49: 297-299.
- Hildebrand C.D. and Schroth M.N. (1971). Isolation of *Pseudomonas phaseolicola* from bean leaves exhibiting systemic symptoms. *Phytopathology* 61: 580-581.
- Hill K., Coyne D.P. and Schuster (1972). Leaf, pod and systemic chlorosis in *Phaseolus vulgaris* to halo blight controlled by different genes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 97: 494-498.
- Katherman M.J., Wilkinson R.E. and Beer S.V. (1980). The potential of four dry bean cultivars to serve as sources of *Pseudomonas phaseolicola* inoculum. *Plant Disease* 64: 72-74.
- Katznelson H. and Sutton M.D. (1952). A rapid phage plaque count method for the detection of bacteria as applied to the demonstration of internally-borne bacterial infections of seed. *Journal of Bacteriology* 61: 689-701
- King E.O., Ward M.K and Raney D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluoroscin. *Journal of laboratory and clinical medicine* 44: 301-307.
- Lincoln R. (1940). Bacterial wilt resistance and genetic host - parasite interaction in maize. *Journal of Agricultural Research* 60: 217-239.
- Omer M.E.H. and Wood R.K.S. (1969). Growth of *Pseudomonas phaseolicola* in susceptible and resistant bean plants. *Annals of Applied Biology* 63: 103-116.
- Patel P.N. and Walker J.C. (1965). Inheritance of tolerance to halo blight in bean. *Phytopathology* 56: 681-682.
- Schroth M.N., Vitanza V.B. and Hilderbrand D.C. (1970). Pathogenic and nutritional variation in the halo blight group of fluorescent *Pseudomonas* of beans. *Phytopathology* 61: 852-857.
- Stadt S.J., Saettler A.W. (1981). Effect of host genotype on multiplication of *Pseudomonas phaseolicola*. *Phytopathology* 71: 1307-10.
- Taylor J.D. (1970). The quantitative estimation of the infection of bean seed with *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.). Dowson. *Annals of Applied Biology* 66: 29-36.
- Taylor J.D., Pehlps K. and Dudley C.L. (1979). Epidemiology and strategy for the control of halo-blight of beans. *Annals of Applied Biology* 93: 163-172.
- Taylor J.D. and Teverson D.M. (1985). Halo blight of *Phaseolus bean*. Report of the National Vegetable Research Station for 1984. NVRS. Wellesbourne. 87 pp.
- Trigalet A. and Rat B. (1975). Immunofluorescence as a tool for detecting the internally seed borne bacterial diseases: *Corynebacterium michiganese* (E.F. Smith) Jensen and *Pseudomonas phaseolicola* (Burkholder) Dowson. In Report of the 15th International Workshop on Seed Pathology. 8-14 September 1975. Paris 16 pp.
- Wellhausen E.J. (1937). Effect of the genetic constitution of the host on the virulence of *Phytomonas stewarti*. *Phytopathology* 27: 1070-1089.
- Wharton A.L. (1967). Detection of infection by *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.). Dowson in white seeded dwarf bean stocks. *Annals of Applied Biology* 60: 305-312
- Wilson R.D. (1934). A selective medium for *Bacterium medicaginis* var. *phaseolicola* (Burkholder) Link and Hull. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* 4: 47-49.
- Zaumeyer W.J. (1932). Comparative pathological histology of three bacteria diseases of bean. *Journal of Agricultural Research* 44: 605-632.

ETUDE DU MODE D'ACTION DE *MACROPHOMINA PHASEOLINA* (TASSI) GOID. SUR *VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP.

Toudou ADAM*, Léontine DAN-DICKO-ZAFIMAHOVA** et Michel LE NORMAN***

*Maître-Assistant, Faculté d'Agronomie, Université de Niamey, B.P. 10960 Niger

**Professeur, Faculté des Sciences, Université de Niamey, B.P. 10662 Niger

***Professeur, Chaire de Botanique, ENSA, 65 rue de St-Brieuc 35042, Rennes, France

Résumé: *Macrophomina phaseolina* est le champignon le plus dévastateur du niébé au Niger. La plante peut être tuée précocement et brutalement (fonte de semis), ou progressivement. En plein champ, la maladie commence sur des plantes adultes par un léger flétrissement sur quelques feuilles terminales, flétrissement qui gagne rapidement les parties basales en s'aggravant. La plante entière peut être tuée en moins de sept jours. Les racines sont détruites, leur cortex se détache aisément. Tous les organes affectés (racines, tiges, gousses, graines) sont couverts de sclérotés et parfois de pycnides noires qui donnent à l'ensemble un aspect cendré. La maladie se propage ainsi de plante à plante à partir de ce foyer primaire. Lorsque l'on réalise artificiellement l'infection in vitro, on remarque que le parasite inhibe puis détruit les racines qui noircissent. Le mycélium envahit le collet, et, au bout de 72 à 96 heures, la plantule s'affaisse et meurt. Elle est couverte de sclérotés et de pycnides. L'observation de coupes histologiques et cytologiques révèle la présence d'un mycélium intercellulaire, avec parfois l'intrusion de quelques hyphes dans les cellules. De nombreux sclérotés formés dans les espaces intercellulaires écartent les cellules et dégradent les structures. Les pycnides sont trop grosses pour rester dans les tissus: elles déchirent ces derniers pour s'extérioriser partiellement. Ces multiples altérations des tissus expliqueraient les symptômes décrits plus haut. L'implication d'enzymes lytiques de toxines dans l'évolution de la maladie est également discutée.

Abstract: *Macrophomina phaseolina* is the most devastating fungi of cowpea crops in Niger. The young plant can be killed either early and abruptly or gradually. In the field, the disease starts by causing the terminal leaves of mature plants to wilt. Wilting worsens and extends to the lower part of the plant. The whole plant can be destroyed in less than seven days. The roots are destroyed and the cortex can be detached easily. All the parts (roots, stems, pods, seed) are covered with sclerotia and sometimes with black pycnidia which makes the plant look ashen. The disease spreads from plant to plant from this primary focus. In the case of in vitro infection, the parasite inhibits and then destroys the roots, which turn black. The mycelium invades the collar of the plant. Between 72 and 96 hours later the plantlet wilts away and dies, covered with sclerotia and pycnidia. Histological and cytological cuts reveal intercellular mycelium, and in some instances, hypha grow into the cells. The numerous intercellular sclerotia that are formed separate the cells and damage the structure. The pycnidia are too large to be enclosed in the tissue. They disrupt the cells and partially emerge. This tissue damage explains the symptoms described above. The role of lytic enzymes and toxins in the disease is also discussed.

Depuis plus de 10 ans, le champignon de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanitch (Sphærospidiaceae) occasionne des dégâts considérables sur le niébé (*Vigna unguiculata* [L.] Walpers), principale légumineuse alimentaire et troisième culture au Niger. Des travaux antérieurs (Adam 1986, 1987, 1990, Dhingra et Sinclair 1978) ont permis de mieux caractériser ce parasite et de comprendre sa biologie. L'étude de l'évolution des symptômes

au champ et *in vitro*, ainsi que l'observation des coupes histologiques et cytologiques permettent d'apprécier les interactions entre le niébé et ce parasite.

MATERIEL ET METHODES

Essai en plein champ: Les variétés de niébé TN-3 71 et TVX-32 36 sont semées à forte densité sur de petites parcelles de 1,50 m x 1 m et aménagées sur un terrain sableux à Niamey. Ce terrain est naturellement infesté par plusieurs cultures successives de niébé sensible parasité. Après la levée, l'arrosage est assuré tous les 10 jours avec 20 mm d'eau. Tous les cinq jours, on note l'évolution des symptômes et des effectifs, et ceci pendant les trois mois que dure le cycle de la culture.

Essai in vitro: Des graines des variétés TN-3-71 et TN-88-63 sont désinfectées d'abord au mercryl Laurylé 3% puis à l'hypochlorite de calcium 6%. Après trois rinçages, elles sont mises à germer sur eau gélosée 2% dans des boîtes de Pétri stériles. Au bout de trois jours d'incubation à température ambiante, les plantules saines et vigoureuses sont repiquées dans des tubes de culture de 3 cm de diamètre et 16 cm de hauteur contenant 20 ml de milieu stérile de Murashige et Skoog (sans phytohormone mais additionné de 2% de glucose). A partir d'une culture de *M. phaseolina* de cinq jours sur PDA, on prélève un fragment mycélien que l'on dépose aseptiquement à la base des plantules. La moitié des tubes sont inoculés le jour du repiquage (J0) et la 2ème moitié, 4 jours plus tard (J4). Tous les tubes sont incubés en salle de culture maintenue à $30 \pm 3^\circ\text{C}$ et éclairée 12g/24 par des tubes fluorescents (type lumière du jour, intensité d'éclairage de 1000 lux). L'évolution des symptômes est notée tous les jours.

Les plantules infectées ou saines sont prélevées pour être fixées après 0 h (Témoin), 24 h, 48 h, 72 h et 96 h de contact entre l'hôte et le parasite. Chaque prélèvement est immédiatement fixé, et les fixateurs ont été le Navashine et le FAA pour le matériel inclus dans la paraffine. Dans ce cas, les coupes transversales au niveau de la tige et dans les racines sont colorées à l'hématoxyline de Régaud. Le glutaraldéhyde post-osmié est le fixateur utilisé pour le matériel inclus dans l'éponge. Les coupes semi-fines colorées par le paragon ont servi aux observations en microscopie électronique à transmission (M.E.T.).

RESULTATS

Développement de la maladie au champ

La maladie se développe sensiblement de la même façon sur les deux variétés: durant les trois premières semaines de culture, il y a une importante manifestation des fontes de semis, soit par destruction des graines en germination, soit par mort des plantules levées. Ainsi TN-3 71 et TVX-32-36 perdent respectivement 64,6% et 50% de leurs effectifs dans cette période (Tableau 1). Après cette première vague d'attaque, il y a une forte réduction ou une interruption des mortalités, puis la maladie se déclare à nouveau pour atteindre un maximum entre 65 et 70 jours après semis. Les symptômes développés sont des nécroses des tiges, le

flétrissement, la pourriture cendrée des parties nécrosées et des gousses et la mort précoce de la plante qui se couvre de microsclérotés et parfois de pycnides du parasite.

Tableau 1. Evolution de la mortalité en plein champ

Age des plants (en jours)	0 à 25	45	55	60	65	70	75	80
TN-3 71	64,6 (1)	0	1	2	10	11	2	2
TVX-32 36	50,0 (1)	3	5	6	7	7	2	2
Total	57,3 (2)	3	6	8	17	18	4	4

NB: (1) Pourcentage de fontes de semis et les chiffres suivants indiquent le nombre de plants tué. (2) Pourcentage moyen sur les deux variétés et les chiffres suivants indiquent le total des plants tués pour les 2 variétés.

Le flétrissement progressif est très caractéristique: il commence toujours sur les feuilles terminales, puis atteint rapidement les parties basales. La plante entière meurt au plus tard sept jours après le début du flétrissement. Une importante lésion translucide est perceptible au niveau du collet. Le cortex des racines et du collet se détache aisément. Les racines sont détruites et la plante s'arrache sans effort. A partir de ce foyer primaire, la maladie se propage de la même façon de plante en plante. Toute la parcelle peut être détruite en quelques jours et ce d'autant plus vite que le semis est dense.

Symptômes in vitro et étude du mode d'action

Lorsque l'inoculation est faite en même temps que le repiquage des plantules, la croissance et l'agressivité du parasite sont telles qu'il envahit son hôte et le détruit avant la reprise de végétation de ce dernier. Ainsi, toutes les plantules du premier lot sont tuées. Par contre, avec le deuxième lot, la reprise de végétation des plantules est totale, le système racinaire bien développé dans les quatre jours qui précèdent l'inoculation. Le Tableau 2 résume les différentes observations.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Macrophominia phaseolina se propage à partir d'un foyer primaire, essentiellement par le contact racinaire (Roger 1952). Il détruit le système racinaire et donc les tissus vasculaires, d'où le flétrissement observé. Les coupes cytologiques ont révélé l'invasion de tous les tissus par les différents organes du champignon, dont l'action mécanique contribue à dégrader les structures cellulaires. En plus de l'action mécanique, on pourrait penser à l'intervention de médiateurs biochimiques. En effet, l'agrandissement des méats suggère la production des pectinases comme armes principales du parasite au début de l'infection. La progression ultérieure dans les cellules correspondrait à l'action des cellulases (Adam *et al.*, 1991). Cette hypothèse biochimique est d'autant plus vraisemblable que les coupes observées ne révèlent

pas la présence des *haustoria*, structures de nutrition de plusieurs champignons. Nos travaux actuels tentent de détecter, par électrophorèse, les éventuelles protéines et enzymes mises en oeuvre dans cette interaction entre le niébé et le *M. phaseolina*.

Tableau 2. Croissance et développement de *M. phaseolina*, évolution des symptômes et observation des coupes histologiques et cytologiques

Durée d'incubation	Aspect du parasite	Symptômes visibles	Etat des coupes cytologiques et histologiques
6-10 h	Emission 1ers tubes germinatifs	Néant	Néant
24 h	Mycélium hyalin abondant	Néant	Néant
48 h	Mycélium de plus en plus noir + 1ers sclérotés	Néant à légère perte de vigueur	Mycélium et sclérotés dans les cellules du parenchyme cortical. Début dégénérescence des cellules.
72 h	Mycélium noir, beaucoup de sclérotés	Lésions noires sur racines et collet. Arrêt croissance racinaire. 28% des plantules sont flétries.	Accentuation des dommages subis par les cellules. Invasion de tous les tissus par les hyphes et sclérotés.
≥ 96 h	Mycélium noir, + + + sclérotés, + + + pycnides.	Flétrissement de tous les plants, chute des feuilles, mort des plantules.	<i>Tissus envahis:</i> parenchymecortical, endoderme, cylindre central, péricycle, vaisseaux conducteurs nécrosés et dégénérés. Libération vésicules par exocytose.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam T. (1986). Contribution à la connaissance des maladies du niébé (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) au Niger, avec mention spéciale au *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Göïd. Thèse de docteur-ingénieur, ENSA/Université de Rennes I, France, 131 pages.
- Adam T. (1987). Quelques aspects de la biologie du *Macrophomina phaseolina*, parasite du niébé (*Vigna unguiculata*) au Niger. In: Colloque International AUPELF/Université de Niamey, 19-22 novembre 1985. Prof. J. Huignard Ed. 151-153.
- Adam T. (1990). Cowpea diseases in Niger. *Ambio*, Vol XIX, no. 8, 358-360.
- Adam T., Dan-Dicko-Zafimahova L. et Batcho M. (1991). Aspects cytologiques du mode d'action de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Göï. sur des plantules de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Annales de l'Université de Niamey, Tome IV.
- Dhingra O.D. and Sinclair J.B. (1978). Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina*. Universidad de Viçosa, Brasil.
- Roger L. (1952). *Phytopathologie des pays chauds*. Paul Lechevalier (Ed.) Paris, Tome II. 1704-1716.

ADAPTATION DES *BACILLUS* FIXATEURS D'AZOTE A LA RHIZOSPHERE DES GRAMINEES: UNE IDEE QUI FAIT SON CHEMIN

T. HEULIN, P. MAVINGUI, L. GOUZOU et O. BERGE

Equipe d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère

Centre de Pédologie Biologique, UPR 6831 du CNRS associée à l'Université de Nancy I.
BP5, F-54501 Vandoeuvre les Nancy, France

Résumé: Peu de temps après la découverte de "*Clostridium polymyxa*" (Prazmowski 1880), G. Bredemann (1908) publiait un important article sur l'isolement de souches de "*Bacillus asterosporus*" de différentes rhizosphères provenant de très nombreux pays. Dans cet article il mettait en évidence le caractère fixateur d'azote de ces souches. Par la suite, ces deux espèces furent rebaptisées *Bacillus polymyxa* (Smith et al. 1952) et le caractère fixateur d'azote définitivement confirmé par Hino et Wilson (1958). L'intérêt des chercheurs pour cette espèce bactérienne fut relancée par une publication de Neal et Larson en 1976. Ces chercheurs canadiens mettaient alors en évidence que la lignée de substitution chromosomique de la variété de blé de printemps Cadet (C-R5D) entretenait dans sa rhizosphère une activité fixatrice d'azote contrairement à la lignée non substituée. Les bactéries responsables de cette activité étaient des *Bacillus* fixateurs d'azote. En 1988, un autre groupe canadien montrait que l'effet de promotion de croissance de ces *Bacillus* fixateurs d'azote n'était visible que lorsque les souches inoculées à un cultivar de blé provenaient d'un sol sur lequel ce cultivar avait été cultivé les cinq dernières années (Chanway et al. 1988). L'hypothèse d'une co-adaptation entre le blé de printemps et les *Bacillus* fixateurs d'azote était alors avancée. Entre temps une équipe suédoise avait également isolé de la rhizosphère de céréales et de graminées prairiales cultivées sur des sols suédois, un grand nombre de souches de *Bacillus polymyxa* (Lindberg et Granhall 1984). Plus récemment, nous avons pu montrer dans notre laboratoire qu'une sous-population de *Bacillus polymyxa* isolée d'un sol brun faiblement lessivé était phénotypiquement (galeries API), sérologiquement (ELISA) et génétiquement (RFLP) différente d'une autre sous-population de cette espèce isolée de blé (rhizoplan) cultivé sur ce même sol (Mavingui et al. 1991). Là aussi l'hypothèse de l'adaptation des *Bacillus polymyxa* aux racines de blé est avancée. Les caractères d'adaptation seront discutés. Sur la base des résultats de la littérature, *Bacillus polymyxa* est donc une espèce fixatrice d'azote contenant des souches promotrices de la croissance des plantes, antagonistes de champignons phytopathogènes et capables de modifier l'environnement physico-chimique des racines de blé.

Abstract: Not long after the discovery of "*Clostridium polymyxa*" (Prazmowski 1880), G. Bredemann (1908) published an important article on the isolation of strains of *Bacillus asterosporus* from various plant rhizospheres originating in different countries. In this article, he highlighted the nitrogen-fixing character of these strains. Thereafter, these two species were renamed *Bacillus polymyxa* (Smith et al. 1952), and the nitrogen fixation was confirmed by Hino and Wilson (1958). Scientific interest in this bacterial species was revived in 1976 by a publication of Neal and Larson. These Canadian scientists showed that the spring wheat cultivar Cadet modified by a chromosomal substitution had a higher nitrogen-fixing activity in its rhizosphere, but this was not the case with the unsubstituted cultivar. *Bacillus* spp., which have nitrogen-fixing capacities were shown to be responsible for this activity. In 1988, another Canadian team showed that the wheat plant promotion effect of these nitrogen-fixing *Bacillus* was only visible when the inoculated strains were from a soil in which the same cultivar had been grown for the last five years (Chanway et al. 1988). This led to the

hypothesis of co-adaptation between spring wheat and nitrogen-fixing Bacillus. In the meantime, a Swedish team had also isolated a large number of Bacillus polymyxa strains from the rhizosphere of cereals and forage grasses grown in Sweden (Lindberg and Granhall 1984). More recently, in our laboratory we have demonstrated that the sub-population of Bacillus polymyxa, isolated from a Eutric Cambisol, was phenotypically (API tests), serologically (ELISA), and genetically (RFLP) different from another sub-population of the same species that was isolated from the roots of wheat (rhizoplan) cultivated on the same soil (Mavingui et al. 1991). Here again, the hypothesis of the adaptation of Bacillus polymyxa to the wheat roots was confirmed and its adaptive character discussed. Results reported in literature indicate that Bacillus polymyxa strains are able to fix atmospheric nitrogen, promote plant growth, antagonize phytopathogenic fungi, and are also capable of modifying the physico-chemical environment of wheat roots.

L'isolement et la mise en évidence du pouvoir fixateur d'azote de *Bacillus polymyxa* et de *Rhizobium* ont eu lieu à la même époque. Au cours d'un travail que l'on peut considérer comme pionnier, sur "*Bacillus asterosporus*" rebaptisé plus tard *Bacillus polymyxa*, Von G. Bredemann a isolé une trentaine de souches de la rhizosphère de plantes (riz, avoine, luzerne, graminées prairiales), d'arbres (pin, épicéa, acacia) et de termites. Le caractère ubiquiste de la répartition de *B. polymyxa* était également établi puisque ces souches provenaient des cinq continents. De plus l'auteur établissait qu'après culture de souches de cette espèce, le milieu de culture était enrichi en azote, indiquant une très probable réduction de N₂ en ammoniacque (méthode Kjeldahl). La confirmation de cette activité fut apportée beaucoup plus tard par Hino et Wilson (1958). Par comparaison, l'isolement de souches d'*Azospirillum* associées aux racines de céréales est plus récente.

	Isolement	Fixation de N ₂
<i>Rhizobium</i>	Franck 1879	Hellriegel and Willfarth 1886
<i>Bacillus polymyxa</i>	Prazmowski 1880 ("Clostridium polymyxa") Beijerinck 1893 ("Granulobacter polymyxa") Bredemann 1908 ("Bacillus asterosporus") Smith et al. 1952 (<i>Bacillus polymyxa</i>)	Bredemann 1908 Hino and Wilson 1958
<i>Bacillus circulans</i>	Jordan 1890	
<i>Azospirillum</i>	Beijerinck 1925 ("Spirillum lipoferum") Tarrand et al. 1978 (<i>Azospirillum lipoferum</i>)	Beijerinck 1925 Becking 1963

Plusieurs auteurs ont confirmé la présence de *Bacillus polymyxa* dans la rhizosphère du blé (Rovira 1963, Nelson *et al.* 1976, Lethbridge *et al.* 1982, Lindberg et Granhall 1984, Höflich et Steinbrenner 1988, Chanway et Nelson, 1990, Mavingui *et al.* 1991), la rhizosphère de graminées prairiales (Weihs et Jagnow 1988), dans des sols de prairies permanentes (Dorner 1924, Line et Loutit 1971, Holl *et al.* 1988) et des sols forestiers (Jensen 1963, Jurgensen et Davey 1970).

Deux raisons ont motivé notre intérêt pour cette association entre *B. polymyxa* et les racines du blé:

- L'étude des populations fixatrices d'azote dominantes dans la rhizosphère du blé cultivé sur sept sols français différents, nous avait permis de montrer que dans la majorité des cas (6 sur 7) la population de *B. polymyxa* était dominante (de 1 à 5 10^5 bactéries/g de sol rhizosphérique). Ces résultats sur la fréquence et sur la dominance au sein du peuplement fixateur d'azote confirment ceux des auteurs cités précédemment.
- En 1970, Neal et ses collaborateurs démontraient l'importance de la substitution d'une paire des chromosomes (5B) chez le blé tendre (*Triticum aestivum*) sur la présence de rhizobactéries antagonistes d'un champignon phytopathogène (*Cochliobolus sativus*) agent de la pourriture des racines. Cette année là, la même équipe mettait en évidence que la substitution de la paire de chromosomes 5B issue d'un cultivar sensible à ce champignon (Rescue) dans un cultivar résistant (Cadet) rendait ce dernier (C-R5B) sensible à la maladie (Larson et Atkinson 1970). Cette sensibilité acquise par la lignée C-R5B s'accompagne, dans un sol dépourvu de ce champignon pathogène, d'une augmentation significative de la microflore totale, ainsi que des peuplements cellulolytiques, pectinolytiques, amylolytiques et ammonifiants par rapport au cultivar parental résistant Cadet.

La taille de ces peuplements était alors équivalente à celle du cultivar sensible Rescue (Neal *et al.* 1973). Les auteurs en concluaient que les modifications dans la composition des peuplements bactériens rhizosphériques est directement liée à une substitution chromosomique dans le génome de la plante hôte et n'est pas une réponse secondaire à la présence du champignon. La relation entre cette modification de la composition de la microflore rhizosphérique consécutive aux modifications génétiques de la plante et l'acquisition de la sensibilité à la maladie restait à établir de façon directe.

Ces mêmes auteurs, poursuivant leur travail sur les substitutions chromosomiques, montrèrent que le cultivar Cadet (C-R5D), dans lequel une substitution de la paire des chromosomes 5D (provenant du cultivar Rescue) avait été effectuée, hébergeait dans sa rhizosphère une activité fixatrice d'azote impliquant des *Bacillus* (Neal et Larson 1976). Ni les cultivars parents (Cadet et Rescue) ni l'autre lignée substituée C-R5B ne présentaient les mêmes propriétés. Cela signifiait que dans le cas du blé, au moins un gène sur le chromosome 5D du cultivar Rescue, différant de son allèle sur 5D de Cadet, est en interaction avec un ou plusieurs gènes sur le reste du génome de Cadet. De nouveau ces auteurs montraient qu'une modification génétique du blé se traduisait par des changements qualitatifs de la microflore rhizosphérique (présence ou non de *Bacillus* fixateurs d'azote). Une modification de la nature des exsudats racinaires après substitution chromosomique pourrait expliquer les variations observées dans les peuplements rhizosphériques.

Plus récemment, d'autres chercheurs canadiens ont mis en évidence un effet positif de l'inoculation de souches de *Bacillus* fixateurs d'azote sur le poids de matière sèche de racines de blé de printemps cv. Katepwa (Chanway *et al.* 1988). Ces mêmes souches étaient sans effet sur deux autres cultivars (Neepawa et HY 320). Or, les sept souches testées dans ce travail provenaient d'un sol cultivé les cinq dernières années avec le cultivar Katepwa et les 12 précédentes avec le cultivar Neepawa. Les auteurs suggèrent que l'adaptation bactérienne à la plante hôte peut s'effectuer en cinq ans ou moins. Si l'on relie ces résultats à ceux de Neal *et al.* (1970, 1973) montrant que les substitutions chromosomiques chez le blé affectaient quantitativement et qualitativement la microflore rhizosphérique, il apparaît que les effets de promotion de croissance de souches proches de *B. polymyxa* (probablement *B. circulans*) dépendent de modifications génétiques mineures de la plante hôte.

Le but de notre travail est d'évaluer le caractère adaptatif de la colonisation des racines de blé par l'espèce *Bacillus polymyxa*. Nous avons développé pour cela une approche différente de celles utilisées jusqu'ici. Il s'agit d'une approche populationnelle de la diversité génétique et phénotypique de l'espèce *B. polymyxa* au sein d'environnements différents tels que le sol, le sol adhérent aux racines (rhizosphère) et la surface des racines (rhizoplan). Une telle approche vise deux objectifs:

- Comparaison de cette diversité dans ces trois environnements. La question est: la diversité de la sous-population racinaire est-elle plus faible que celle de la sous-population du sol non-rhizosphérique? Une baisse de la diversité pourrait être interprétée comme une adaptation à la plante hôte.
- A partir de l'étude de la diversité phénotypique basée sur des caractères d'utilisation de différentes sources de carbone, déduction des caractères trophiques d'adaptation.

RESULTATS

ETUDE DE LA DIVERSITE

Isolement des souches de *B. polymyxa*

Le sol utilisé est un Eutric Cambisol, sablo-limoneux (pH 5,5) provenant de la région de Nancy (Dieulouard), France. Une rotation classique est pratiquée sur ce sol: colza/blé/blé. Trois échantillons de l'horizon de surface ont été prélevés en dehors de la zone cultivée. Trois pots ont été remplis avec 1,5 kg de sol de chaque échantillon et semés avec du blé de printemps (*Triticum aestivum* L., cv Fidel). Des pots non semés, traités dans les mêmes conditions (températures de jour et de nuit, 21 ± 2 et $15 \pm 2^\circ\text{C}$, photopériode 16 heures à 300 microeinsteins $\text{m}^2 \text{S}^{-1}$, humidité de $85 \pm 5\%$), ont servi de témoins "sol non rhizosphériques". Les souches de *Bacillus polymyxa* ont été à l'aide d'une technique récemment mise au point pour cette espèce au laboratoire (Mavingui *et al.* 1991). Cette méthode, appelée "immunopiégeage", utilise le caractère antigénique des bactéries. Des lapins sont immunisés par injection des bactéries entières. Ces anticorps de lapin partiellement purifiés, dirigés contre une souche de *B. polymyxa* sont déposés au fond d'une

plaque de microtitration. Les échantillons de sol ou de racines sont alors ajoutés. L'affinité des anticorps utilisés vis à vis des souches de *B. polymyxa* permet de les isoler facilement après étalement sur un milieu gélosé contenant du saccharose (Mavingui *et al.* 1991).

Après purification et identification à l'aide de critères morphologiques et biochimiques (galeries API), 130 souches de *B. polymyxa* ont été isolées de trois "compartiments": SNR, sol non rhizosphérique (pots témoins); SR, sol rhizosphérique (sol adhérant aux racines) et RP, rhizoplan (racines lavées) (Tableau 1). La taille de la population de *B. polymyxa* varie de $2,5 \cdot 10^5$ /g dans le sol nu à $6,2 \cdot 10^5$ /g sur les racines. Cette population est stable dans l'ensemble des sols français (résultats non publiés) et représente environ 0,1% de la microflore totale.

Diversité phénotypique

L'analyse de la diversité phénotypique a été effectuée sur des caractères d'acidification de sources de carbone à l'aide de galeries API 50 CH et API 20 B. Cette analyse a été réalisée grâce au logiciel APILAB par le service de M. Boeufgras (API, bioMérieux). La constitution des groupes de similarité est basée sur la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Average) et le coefficient de similarité de Gower permet l'estimation des distance entre groupes. Cette analyse aboutit à la constitution de deux branches A et B (Figure 1). La branche A se divise en trois groupes de similarité à 93% (groupes I, II et III) alors que la seconde (B) n'est reliée qu'à un seul groupe (IV). Ce dernier groupe contient exclusivement des souches isolées sur la racine (rhizoplan). Quelques souches du rhizoplan se retrouvent dans le groupe III, constitué en grande partie de souches de la rhizosphère. Dans les groupes I et II, on peut noter la présence d'une majorité de souches du sol nu, de quelques souches de la rhizosphère et de façon très minoritaire de souches provenant des racines.

Près de 90% des souches isolées du rhizoplan appartiennent à un même groupe (IV) indiquant une homogénéité de cette sous-population contrastant avec une diversité supérieur des sous-populations provenant de la rhizosphère et surtout du sol nu. Dans le cas de cette étude sur la diversité phénotypique, nous avons exclusivement regardé les caractères trophiques, c'est-à-dire les capacités à utiliser certains substrats carbonés. Nous traiterons, dans le paragraphe suivant, de la diversité sérologique, qui est également liée à une expression phénotypique, mais que nous avons séparé car ce n'est plus seulement une relation trophique qui est évaluée mais également des mécanismes d'association avec la plante hôte, pouvant impliquer des mécanismes d'attachement par exemple.

Diversité sérologique

L'étude de la diversité sérologique consiste donc à regarder quelles sont les molécules antigéniques (épitopes) à la surface des bactéries. Dans le cas des bactéries Gram positives comme *B. polymyxa* ces épitopes sont essentiellement des enzymes extracellulaires, des protéines et des polysaccharides. Certaines de ces molécules interviennent strictement dans les relations trophiques avec la plante hôte (amylase, levane-saccharase), d'autres à la fois pour leur fonction trophique mais également pour leur rôle dans la colonisation des racines

(cellulase, endoglucanase, cellobiase, polygalacturonase, pectate-lyase) et enfin celles qui jouent essentiellement un rôle dans l'attachement aux racines (adhésines, polysaccharides). Une autre famille d'exo-enzymes potentiellement immunogènes concernent les interactions entre ces bactéries et des champignons (enzymes antifongiques telles que les chitinases et les glucanases).

Nous avons employé les mêmes anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la souche *B. polymyxa* CF43 (cf. l'immunopiege) à la dilution 10^4 . Nous avons confirmé que ces anticorps reconnaissent spécifiquement les souches de *B. polymyxa*. Par contre, bien que toutes les souches étudiées aient été isolées avec des anticorps dirigés contre la souche CF43, nous avons pu constater qu'elles présentaient une diversité sérologique importante (Figure 2). Les souches isolées du sol rhizosphérique du blé ont les réactions croisées les plus fortes, équivalentes à celle de la souche homologue CF43, elle-même isolée de la rhizosphère du blé cultivé sur un autre sol français. Tout comme les souches isolées du sol non-rhizosphérique, ces souches isolées de la rhizosphère possèdent des compositions en épitopes différentes entre elles, leur conférant une variabilité sérologique supérieure à celle des souches isolées du rhizoplan. La diversité sérologique, nette pour les souches isolées du sol, diminue lorsqu'elles sont isolées à partir des racines. Ce résultat confirme celui sur la diversité phénotypique.

Diversité génétique

Nous avons échantillonné dans chacun des groupes (SNR, SR et RP), 12 souches pour l'étude de cette diversité génétique (soit 36 souches au total). La méthode utilisée, dans un premier temps, est celle des RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Il s'agit donc de comparer le polymorphisme des fragments d'ADN obtenus après digestion par une enzyme de restriction. Dans ce travail deux enzymes ont été retenues: *Pst*I et *Bg*III. L'analyse des profils obtenus après digestion totale de l'ADN sur gels d'agarose s'avère très délicate. Pour faciliter cette analyse chacun de ces profils est hybridé avec la sonde pBA2 portant les gènes codant pour l'ARNr 16S, après transfert sur membrane nylon (Southern). Le marquage de la sonde à la digoxigénine, l'hybridation et la détection des fragments d'hybridation ont été réalisés par un marquage non radioactif et un kit de détection (Boehringer Mannheim). Une analyse des profils d'hybridation (Figure 3) a été réalisée à l'aide d'une méthode d'appariement des profils deux à deux (Nei and Li 1979) et une méthode de regroupement par chaînage moyen (UPGMA).

Cette analyse fait apparaître quatre groupes dans lesquels les souches entre elles ont moins de 3,4% de divergence (Figure 4). Dix des 12 souches isolées du rhizoplan (RP) ont exactement le même profil d'hybridation (groupe A). Les deux autres souches du rhizoplan (PMD 218 et PMD 259) ont des profils différents et sont également phénotypiquement différentes puisque par exemple elles n'acidifient pas le sorbitol. Nous discuterons plus loin de ce résultat. Donc les souches "typiques" du rhizoplan (sorbitol +), appartenant au même groupe phénotypique (IV) sont génétiquement identiques. Ces souches ne proviennent pas d'un seul clone puisqu'elles ont été isolées de trois rhizoplans différents (Tableau 2). Par contre, 10 des 12 souches isolées du sol non rhizosphérique ont des profils d'hybridation différents et répartis dans les quatre groupes. De la même façon, neuf des 12 souches de la

rhizosphère ont des profils différents, répartis dans trois groupes (Figure 4). Les résultats sur la diversité génétique sont résumés dans le Tableau 2.

Tout se passe comme si l'espèce *B. polymyxa* dans un sol nu était composée d'individus génétiquement et phénotypiquement différents alors qu'à la surface des racines de blé un génotype particulier était sélectionné. Il faut remarquer que ce génotype n'a pas été isolé dans le sol non rhizosphérique et représentait donc moins de 6% au sein de l'espèce *B. polymyxa* du sol nu.

A la première question posée dans l'introduction, il est possible de répondre que la diversité de l'espèce *B. polymyxa* diminue lorsque la diversité de l'espèce *B. polymyxa* diminue lorsque l'on passe du sol non rhizosphérique à la surface de la racine. La population de *B. polymyxa* du sol rhizosphérique qui est l'intermédiaire spatial entre ces deux compartiments, possède plus de ressemblance avec celle du sol nu qu'avec celle du rhizoplan. La diversité génétique, phénotypique et sérologique des individus appartenant à l'espèce *B. polymyxa*, présents dans le sol nu, est probablement nécessaire pour répondre à des variations biotiques et abiotiques importantes subies par ce sol, alors que les individus présents à la surface des racines sont soumis à une pression de sélection particulière qui est l'environnement racinaire. La population du sol nu subirait une sélection diversifiante tandis que celle du rhizoplan serait sous l'influence d'une sélection directionnelle.

Cette baisse de la diversité peut raisonnablement s'interpréter comme un indice de l'adaptation de cette espèce à la plante hôte. Afin de déterminer quels sont les caractères trophiques d'adaptation de *B. polymyxa* à l'habitat rhizosphérique du blé, il nous a semblé plus facile dans un premier temps d'interroger les bactéries (catabolismes) plutôt que la plante (nature des exsudats). L'étude d'autres caractères d'adaptation, comme la production d'exo-enzymes en relation avec la plante, sont en cours d'étude. La baisse de la diversité sérologique mentionnée plus haut nous permet d'espérer mettre en évidence des variations entre les populations du sol nu et du rhizoplan concernant des molécules, potentiellement antigéniques, sécrétées par les bactéries.

CARACTERES D'ADAPTATION

En réponse à la seconde question relative aux caractères trophiques d'adaptation, nous avons utilisé les résultats présentés dans le paragraphe sur la diversité phénotypique. En effet, les caractères étudiés sont essentiellement l'utilisation de substrats carbonés et reflètent donc une partie du métabolisme carboné des bactéries. L'étude des pourcentages de souches positives pour certains de ces caractères biochimiques fait apparaître deux tendances opposées (Tableau 3).

La fréquence de souches positives diminue depuis le sol nu vers le rhizoplan pour les caractères comme l' α -méthyl-mannoside et le L-rhamnose. A l'inverse seules les souches du rhizoplan dans leur grande majorité utilisent le sorbitol. Quelques souches capables d'utiliser le sorbitol utilisent également le xylitol.

Figure 1. Dendrogramme de similitude montrant la diversité phénotypique des sous populations de *Bacillus polymyxa* isolées par immunopieçage du sol non rhizosphérique (SNR), du sol rhizosphérique (SR) et du rhizoplan (RP) de Blé.

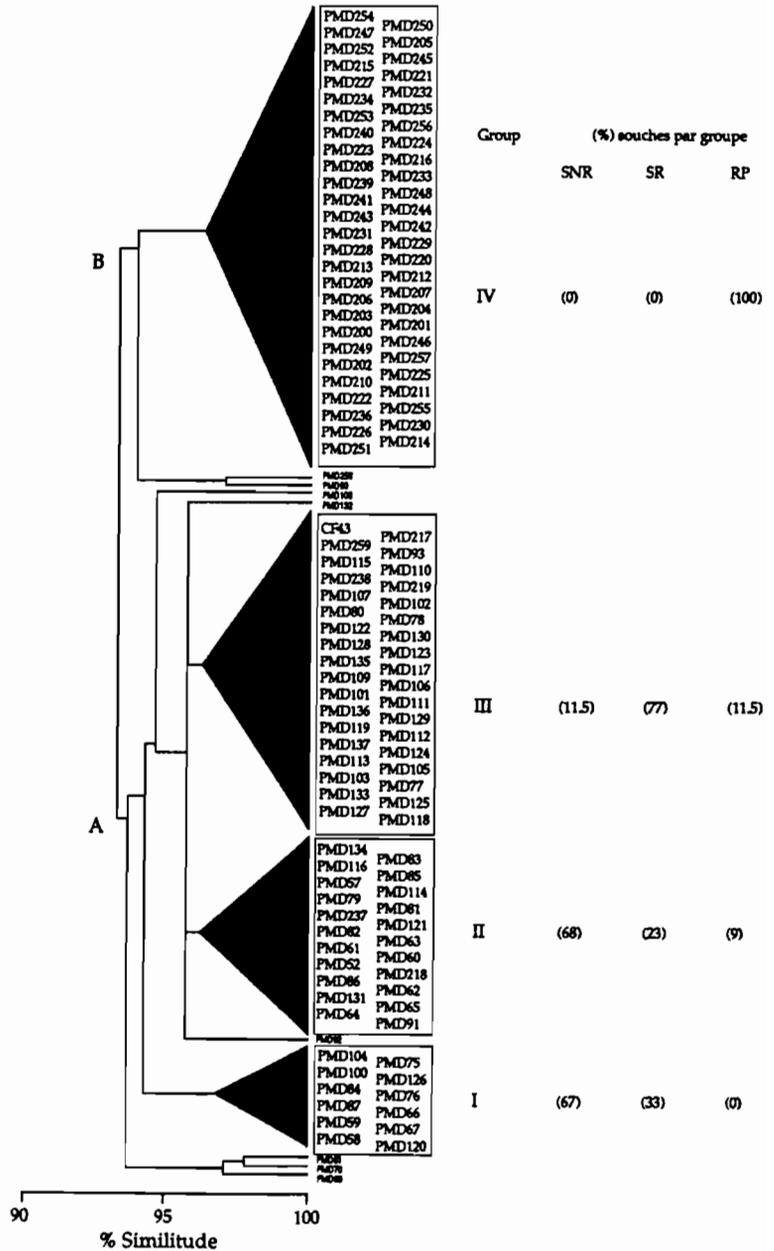
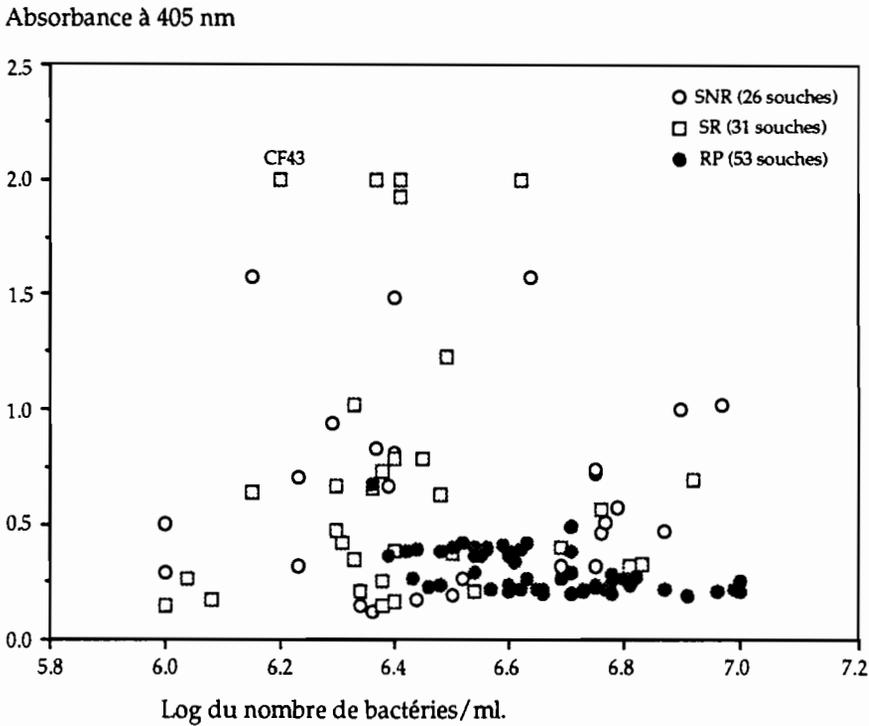


Figure 2. Variabilité sérologique des souches de *Bacillus polymyxa* évaluée en ELISA par la réaction avec le sérum polyclonal anti-*B. polymyxa* CF43 dilué au 1/10000.



Nous pouvons conclure au stade actuel de notre travail que l'adaptation de *B. polymyxa* à la racine de blé semble s'effectuer par la sélection d'un génotype bactérien particulier s'accompagnant de la contre-sélection du métabolisme de l' α -méthyl-mannoside et du L-rhamnose et la sélection du métabolisme du sorbitol.

Tableau 1. Origine et nombre de souches de *Bacillus polymyxa* immuno-isolées du sol non-rhizosphérique (SNR), du sol rhizosphérique (SR) et du rhizoplan de blé (*Triticum aestivum* L., cv Fidel) de 18 jours n: nombre de souches

Echantillon	SNR	SR	RP
1	PMD51, 52, 57, 66, 67, 69, 70, 75, 76	PMD100, 101, 102, 112, 113, 120, 121, 123, 124, 127, 134	PMD200 to PMD219
2	PMD58, 59, 60, 61, 77, 78, 79, 80, 81, 82	PMD103, 105, 106, 114, 116, 117, 118, 119, 122, 125, 128, 133	PMD220 to PMD239
3	PMD62, 63, 64, 65, 83, 84, 85, 86, 87, 90, 91, 92, 93	PMD104, 107, 108, 109, 110, 111, 115, 126, 129, 130, 131, 132, 135, 136, 137	PMD240 to PMD259
n*	32	38	60

Figure 3. Profils d'hybridation des fragments de restriction de l'ADN total des souches de *Bacillus polymyxa* obtenus avec la sonde pBA2 codant pour les gènes de l'ARNr 16S de *Bacillus subtilis*. Planche A: digestion par l'endonucléase *Pst*I; planche B: digestion par l'endonucléase *Bgl*II.

Les souches types de *Bacillus polymyxa* ATCC 842, *Bacillus macerans* ATCC 8244 et *Bacillus circulans* NCIB 9374 ont été également incluses. La taille (en kilobases) et la migration relative du marqueur de poids moléculaire des fragments d'ADN sont indiquées à gauche des planches.

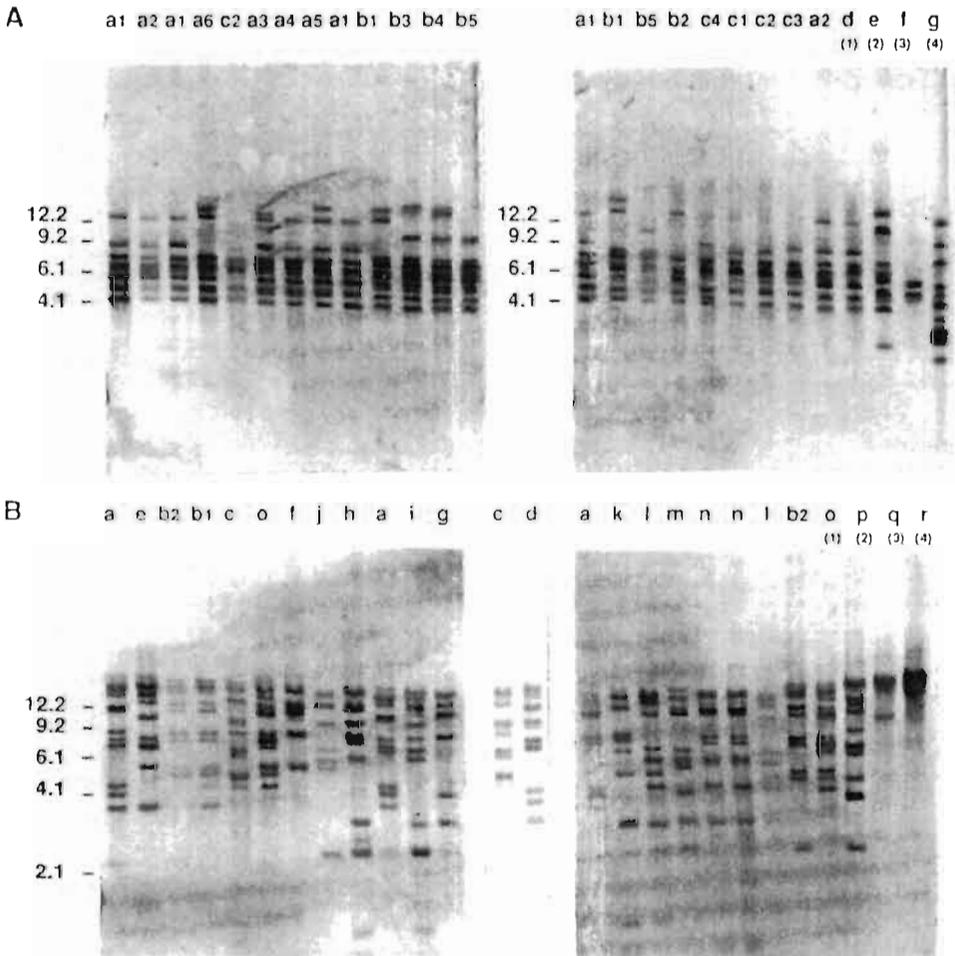


Figure 4. Dendrogramme de divergence montrant la diversité génétique entre les souches de *Bacillus polymyxa* isolées par immunopieçage du sol non rhizosphérique (SNR), du sol rhizosphérique (SR) et du rhizoplan (RP) de blé

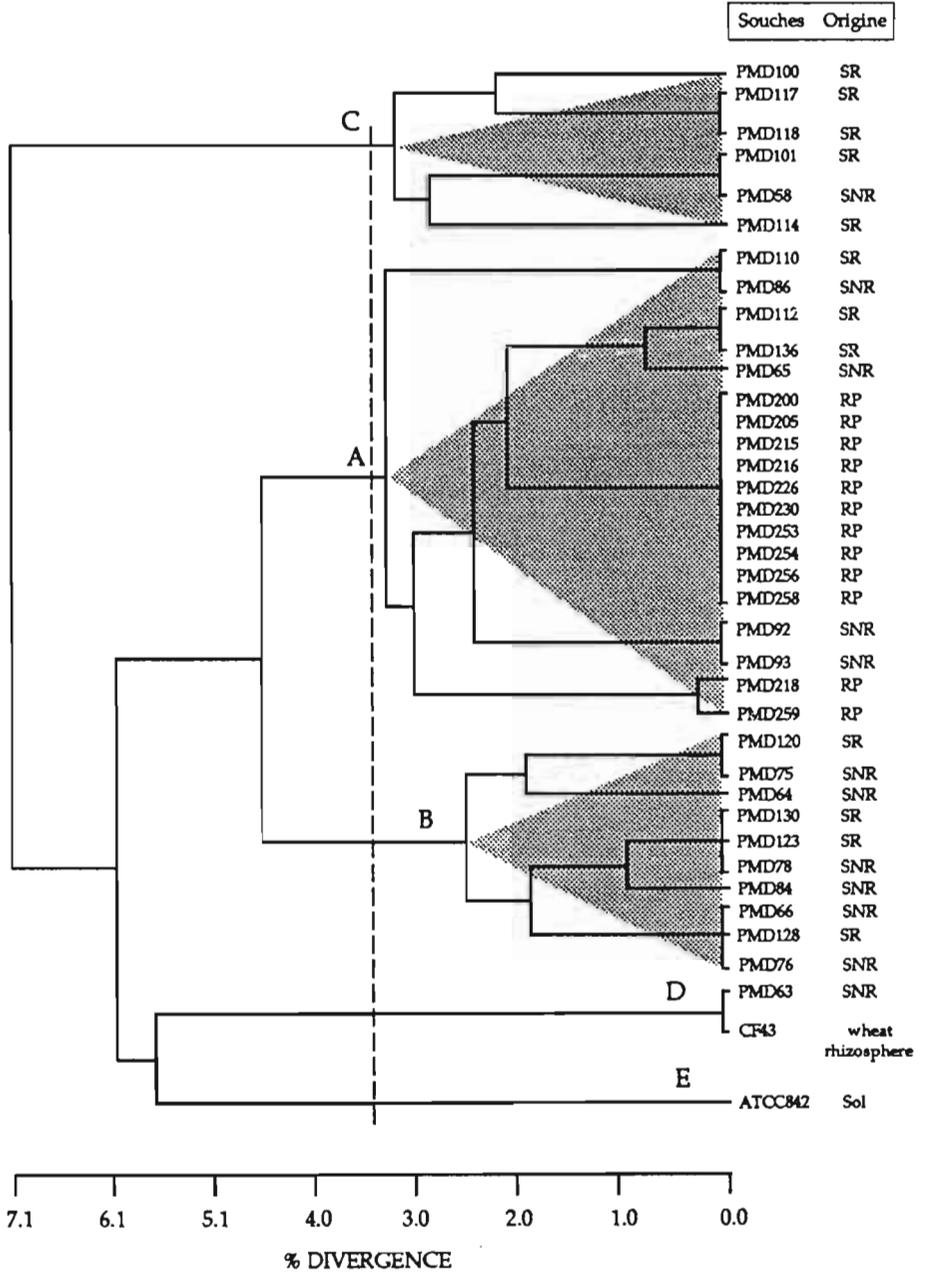


Tableau 2. Répartition des groupes (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p) et sous groupes (1, 2, 3, 4, 5, 6) de profils RFLP des souches de *Bacillus polymyxa* dans les différents échantillons des trois compartiments étudiés

Groupe génotypique(1)	Profils d'hybridation par pBA2		Souches	Echantillonnage (2)	
	<i>Pst</i> I	<i>Bgl</i> II		compartiment	échantillon
A	a ₁	a	200	RP	1
A	a ₁	a	205	RP	1
A	a ₁	a	215	RP	1
A	a ₁	a	216	RP	1
A	a ₁	a	226	RP	2
A	a ₁	a	230	RP	2
A	a ₁	a	253	RP	3
A	a ₁	a	254	RP	3
A	a ₁	a	256	RP	3
A	a ₁	a	258	RP	3
A	a ₁	b ₁	65	SNR	3
A	a ₂	b ₂	136	SR	3
A	a ₂	b ₂	112	SR	1
A	a ₃	c	259	RP	3
A	a ₄	c	218	RP	1
A	a ₅	d	86	SNR	3
A	a ₅	d	110	SR	3
A	a ₆	e	92	SNR	3
A	a ₆	e	93	SNR	3
B	b ₁	f	120	SR	1
B	b ₁	f	75	SNR	1
B	b ₂	g	64	SNR	3
B	b ₃	h	130	SR	3
B	b ₃	h	123	SR	2
B	b ₃	h	78	SNR	2
B	b ₄	i	84	SNR	3
B	b ₅	j	66	SNR	1
B	b ₅	j	128	SR	2
B	b ₅	j	76	SNR	1
C	c ₁	k	100	SR	1
C	c ₂	l	117	SR	2
C	c ₂	l	118	SR	2
C	c ₃	m	114	SR	2
C	c ₄	n	101	SR	1
C	c ₄	n	58	SNR	2
D	d	o	63	SNR	3
D	d	o	CF43*	Rhizosphère	
E	e	p	842*	Sol	

(1) Groupes issus de l'analyse dendrogrammique basée sur les profils d'hybridation de l'ADN (voir Fig. 4). (2) Echantillonnage du sol et des racines (voir Tableau 1). *CF43 est la souche de *Bacillus polymyxa* isolée de la rhizosphère du blé; 842 est la souche type de *Bacillus polymyxa* de la collection américaine ATCC (American Type Culture Collection).

Tableau 3. Pourcentages des souches positives aux tests biochimiques dans les compartiments de sol non rhizosphérique (SNR) et rhizosphérique (SR) et le rhizoplan (RP). Le nombre de souches testées figure entre parenthèses.

Caractères biochimiques	Compartiments étudiés		
	SNR (32)	SR (37)	RP (60)
α -méthyl-Mannoside	41	34	0
L-Rhamnose	31	13	0
β -méthyl-Xyloside	72	58	28
Nitrate*	12	71	45
Gélatine	9	76	53
Sorbitol	0	0	88
Xylitol	0	0	12

Les différents tests biochimiques proviennent des galeries API 50 CHB et 20 B.

* Nitrate: réduction des nitrates en N_2 .

CONCLUSION

L'histoire de cette espèce bactérienne est paradoxale puisqu'elle est décrite associée aux plantes depuis aussi longtemps que le *Rhizobium*, qu'elle est décrite comme fixatrice d'azote depuis beaucoup plus longtemps qu'*Azospirillum*, qu'elle possède des propriétés de promotion de croissance (Holl *et al.* 1988) alors qu'elle ne suscite actuellement que peu d'intérêt de la part des microbiologistes du sol, exceptée l'école canadienne. Nous avons pu démontrer qu'il existait une adaptation de la population de *B. polymyxa* du sol à l'habitat racinaire du blé (Mavingui *et al.* 1992), comme l'avaient fait précédemment les chercheurs canadiens avec une espèce bactérienne proche. Une meilleure connaissance des souches de *B. polymyxa* adaptées à l'environnement rhizosphérique et racinaire ainsi que l'étude des mécanismes de cette adaptation permettront de sélectionner les souches, en vue de leur inoculation au blé, sur des bases plus écologiques que celles qui ont prévalu jusqu'ici.

REFERENCES

- Beijerinck M.W. (1893). Über die butylalkoholgärung und das butylferment. *Verh. Kon. Akad. Wetensch. (Sect. 2)* 1: 1-51.
- Beijerinck M.W. (1925). Über ein Spirillum, welches freien stickstoff binden kann? *Centralbl. Bakt. II Abt.* 63: 353-357.
- Becking J.H. (1963). Fixation of molecular nitrogen by an aerobic vibrio or spirillum. *J. Microbiol. Serol.* 29, 326.
- Bredemann G. (1908). Untersuchungen über die Variation und das Stickstoffbindungsvermögen des *Bacillus asterosporus* A.M., ausgeführt an 27 Stämmen verschiedener Herkunft. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. II*, 22: 44-89.

- Chanway C.P., Nelson L.M. and Holl F.B. (1988). Cultivar specific growth promotion of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) by coexistent *Bacillus* species. *Can. J. Microbiol.* 34: 925-929.
- Chanway C.P. and Nelson L.M. (1990). Field and laboratory studies of *Triticum aestivum* L. inoculated with co-existent growth-promoting *Bacillus* strains. *Soil Biol. Biochem.* 22: 789-795.
- Dorner W. (1924). Observation on the behaviour of the spores and vegetative forms of *Bacillus amylobacter* A.M. et Bredemann by detection and pure culture investigations. *Land. Jb Schweiz* 38: 175-202.
- Franck B. (1879). Ueber die Parasiten in den Wurzelanschwillungen der Papilionaceen. *Ber. Deut. Bot. Ges.* 37: 376-387, 394-399.
- Hellriegel H. and Willfarth H. (1886). Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineren und Leguminosen. *Beilage Z. Vers. Rubenzuckerind* 1(12), 234.
- Hino S. and Wilson P.W. (1958). Nitrogen fixation by facultative *Bacillus*. *J. Bacteriol.* 75: 403-408.
- Höflich G. and Steinbrenner K. (1988). Effect of agricultural practices on several soil-biological factors. *Zentralbl. Mikrobiol.* 143: 611-620.
- Holl F.B., Chanway C.P., Turkington R. and Radley R.A. (1988). Response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. *Soil Biol. Biochem.* 20: 19-24.
- Jensen V. (1963). Studies on the microflora of Danish beech forest soils. 3. Properties and composition of the bacterial flora. *Zentbl. Bakt. Abt.* 116: 593-611.
- Jordan E.O. (1890). A report on certain species of bacteria observed in sewage. In: Sedgewick, A report of the biological work of the Lawrence Experiment Station, including an account of methods employed and results obtained in the microscopical and bacteriological investigation of sewage and water. Report on water supply and sewerage (Part II) Rep. Mass. Bd. Publ. Hlth. pp. 821-844.
- Jurgensen M.F. and Davey C.B. (1970). Nonsymbiotic nitrogen-fixing microorganisms in acid soils and the rhizosphere. *Soils and Fertilizers* 33: 435-446.
- Larson R.I. and Atkinson T.G. (1970). A cytogenetic analysis of reaction to common root rot in some hard red spring wheats. *Can. J. Bot.* 48: 2059-2067.
- Lethbridge G., Davidson M.S. and Sparling G.P. (1982). Critical evaluation of acetylene reduction test for estimating the activity of nitrogen-fixing bacteria associated with the roots of wheat and barley. *Soil Biol Biochem.* 14, 27-35.
- Lindberg T. and Granhall U. (1984). Isolation and characterization of dinitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of temperate cereals and forage grasses. *Applied Environ. Microbiol.* 48: 683-689.
- Line M.A. and Loutit M.W. (1971). Non-symbiotic nitrogen-fixing organisms from some New Zealand tussock grassland soils. *J. Gen. Microbiol.* 66: 309-318.
- Mavingui P., Berge O. and Heulin T. (1991). Immunotrapping of *Bacillus polymyxa* in soil and in the rhizosphere of wheat. *Symbiosis* 9: 215-221.
- Mavingui P., Laguerre G., Berge O. and Heulin T. (1992). Diversity of *Bacillus polymyxa* associated with the wheat rhizosphere: a populational approach. *Accepté dans Applied Environ. Microbiol.*
- Neal J.L., Jr., Atkinson T.G. and Larson R.I. (1970). Changes in the rhizosphere microflora of spring wheat induced by disomic substitution of a chromosome. *Can. J. Microbiol.* 16: 153-158.
- Neal J.L., Jr., Larson R.I. and Atkinson T.G. (1973). Changes in rhizosphere populations of selected physiological groups of bacteria related to substitution of specific pairs of chromosomes in spring wheat. *Plant and Soil* 39: 209-212.
- Neal J.L. and Larson R.I. (1976). Acetylene reduction by bacteria isolated from the rhizosphere of wheat. *Soil Biol. Biochem.* 8: 151-155.
- Nei M. and Li W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
- Nelson A.D., Barber L.E. Tjepkema J., Russell S.A., Powelson R. and Evans H. (1976). Nitrogen fixation associated with grasses in Oregon. *Can J. Microbiol.* 22: 523-530.

- Prazmowski A. (1880). Untersuchung über die Entwicklungsgeschichte und Ferment-wirkung einiger Bacterien-Arten. Inaug. Diss. Hugo Voigt, Leipzig. pp. 1-58.
- Rovira A.D. (1963). Microbial inoculation of plants. I. Establishment of free-living nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere and their effects on maize, tomato and wheat. *Plant and Soil* 19: 304-314.
- Smith N.R., Gordon R.E. and Clark F.E. (1952). Aerobic spore-forming bacteria. U.S. Dept. Agric. Washington D.C. Agric. Monogr. 16.
- Tarrand J.J., Krieg N.R. and Döbereiner J. (1978). A taxonomic study of *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 28: 967-980.
- Weihls V. and Jagnow G. (1988). Occurrence of *Bacillus polymyxa* in the rhizosphere of grasses and cereals in the Northeast of Western Germany and some of its characteristics. In: *Nitrogen Fixation: hundred years after*. H. Bothe, F.J. de Bruijn, W.E. Newton, Eds. Fischer Stuttgart. 795 pp.

ANTAGONISME ENTRE MICROORGANISMES SYMBIOTIQUES ET ASYMBIOTIQUES DU SOL DE DJIBELOR

Ousman DIAGNE

Direction des Recherches sur les Productions forestières
Institut sénégalais de Recherches agricoles BP 2312 Dakar, Sénégal

Résumé: *L'antagonisme entre des Rhizobium (sens large) et des actinomycètes a été étudié "in vitro" en mettant en présence les deux types de microorganismes dans le même milieu de culture. Deux méthodes d'investigation ont été utilisées. La première a consisté en la recherche des actinomycètes antagonistes des Rhizobium à l'aide de cultures pures ensemencées sur une seule couche de milieu gélosé. La deuxième méthode a consisté en l'utilisation d'un milieu nutritif gélosé à trois couches afin de permettre l'ensemencement successif du milieu avec une suspension de sol puis avec une souche de Rhizobium. Cette méthode a permis de visualiser directement l'inhibition de Rhizobium par les colonies d'actinomycètes obtenues à partir de la suspension de sol. Le pourcentage de souches d'actinomycètes antagonistes obtenu dans cette étude était très variable suivant la souche de Rhizobium testée. Il variait entre 9,7 et 44% et ne dépendait ni de l'origine ni de la vitesse de croissance des Rhizobium. Le sol de Djibélor contenait moins d'actinomycètes que certains autres sols testés ($7,4 \cdot 10^5$ /g de sol sec). Cependant sa population d'antagonistes aux Rhizobium était 1,5 à 3 fois supérieure à celle des autres sols (17,5%). C'est pourquoi des résultats ultérieurs ont suggéré que la déficience de nodulation des arbres fixatrices d'azote constatée dans ce sol était liée à l'importance des actinomycètes antagonistes qu'il renferme.*

Abstract: *Antagonism between Rhizobium (sensu lato) and actinomycetes was studied in vitro by placing the two types of microorganisms in the same culture medium. Two methods of investigation were used. The first consisted of the detection of the actinomycetes that were antagonistic to Rhizobium by using pure cultures inoculated in a single layer agar medium. The second consisted of using a three-layer nutrient agar medium, thus allowing first the inoculation of soil suspensions and then the inoculation of a Rhizobium strain. This method made it possible to see the inhibition of Rhizobium directly by colonies of actinomycetes obtained from the soil suspension. The percentage of antagonistic actinomycete strains obtained in this study was very variable (between 9.7% and 44%), and depended on the strain of Rhizobium tested, but was independent of the origin and growth rate of the Rhizobium. The Djibélor soil contained less actinomycetes than certain other soils that were tested ($7.4 \cdot 10^5$ /g of dry soil). The population that was antagonistic to Rhizobium was between 1.5 and 3 times greater than in other soils (17.5%). That is why later results suggested that the nodulation deficiency in nitrogen-fixing trees observed on this soil was related to the number of antagonistic actinomycetes present in the soil.*

Il a été démontré que l'antagonisme microbien est un facteur biologique important non seulement pour le développement de la plante (Patel 1969) mais également pour l'étude de la survie et de la multiplication des *Rhizobium* dans le sol (Holland et Parker 1966, Chatel et Parker 1972). Les études consacrées aux bactéries, champignons, bactériophages ont révélé que ces microorganismes peuvent être antagonistes vis-à-vis des *Rhizobium*.

Cette étude a été axée sur les actinomycètes pour tester le phénomène d'antagonisme parce qu'ils constituent le group le plus important de microorganismes capables de produire des

substances antibiotiques. Ils jouent ainsi un grand rôle dans la lutte biologique (Johnson 1954). La production de substances toxiques affectant le développement des *Rhizobium* a été mise en évidence au laboratoire par plusieurs travaux (Chhonkar et Subba-Rao 1966, Smith et Miller 1974). Certains auteurs ont même montré l'existence d'antagonismes entre les actinomycètes et les *Rhizobium* du sol (Visona et Tardieux 1964, Pugashetti *et al.* 1982).

L'antagonisme entre des *Rhizobium* (sens large) et des actinomycètes a été mis en évidence dans cette étude *in vitro* en mettant en présence les deux types de microorganismes dans le même milieu de culture. Deux méthodes d'investigation ont été utilisées. La première était basée sur la recherche des actinomycètes antagonistes des *Rhizobium* à l'aide de cultures pures et la seconde sur l'utilisation de milieu gélosé à trois couches.

MATERIEL ET METHODES

Préparation de la suspension de sol

Le dénombrement de la population d'actinomycètes a été fait à partir du sol de Djibélor où une déficience de la nodulation a été constatée à partir d'autres sols (Diouloulou, Bayottes, Dabo et Botou) pour avoir des points de comparaison. Après prélèvement dans la nature, le sol a été soustrait des débris végétaux puis passé sous un tamis de 2 mm de maille. Dix grammes de ce sol ont été mis dans un erlenmeyer contenant 90 ml d'eau stérile. Cette suspension a été soumise à une agitation magnétique pendant 30 mn. Ensuite 631 mg de phénol a été ajouté à la suspension, sous une hotte, avant la poursuite de l'agitation pendant 10 mn encore. Cinq tubes à essai contenant chacun 9 ml d'eau stérile ont été préparés. Un millilitre de la suspension de sol a été prélevé et dilué dans un des tubes. Cette série de dilution a continué jusqu'à 10^{-6} (la suspension mère correspond à la dilution 10^0).

Culture des actinomycètes

La culture des actinomycètes a été faite sur milieu Lechevalier (El-Nakeeb et Lechevalier 1963) dont la composition est la suivante: Glycérol 12,5 g; Arginine 1,0 g; Na Cl 1,0 g; K_2HPO_4 1,0g; $Mg SO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,5 g; Actidione 0,05 g; H_2O 1 000 ml; Agar-Agar 15 g.

Le pH du milieu a été ajusté à 7 et l'actidione ajouté à travers un filtre millipore ($0,45 \mu m$) après stérilisation du milieu à l'autoclave ($120^\circ C$ pendant 20 mn). Le milieu a été réparti sur 12 boîtes de Pétri. 0,5 ml de la suspension de sol aux dilutions 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} a été étalé sur chaque boîte après solidification à raison de quatre boîtes par dilution. Les boîtes ont été mises à l'étuve à $26^\circ C$ pendant une semaine.

Après incubation, les colonies d'actinomycètes ont été comptées. Ensuite 80 colonies d'actinomycètes ont été prélevées sur quatre boîtes de Pétri de dilution appropriée à raison de 20 colonies par boîte. Chaque colonie a été prélevée soit en totalité, soit en fragments avec un morceau de gélose puis repiquée dans un flacon contenant du milieu Lechevalier gélosé, incliné. Les flacons ont été remis à l'étuve pendant une semaine pour permettre la multiplication des colonies isolées puis gardées dans une chambre à $30^\circ C$ jusqu'à leur

utilisation. Les colonies ont été repiquées dans d'autres flacons tous les quatre mois pour renouveler la collection.

Culture des souches de Rhizobium

Le milieu et la technique d'isolement des souches de *Rhizobium* ont été basés sur les travaux de Vincent (1970, 1977). De nouvelles cultures sur milieu liquide YEM ont été faites à partir des souches de *Rhizobium* de collection. Après développement des souches, les cultures ont été diluées si nécessaire dans de l'eau stérile pour avoir à peu près la même densité optique pour tous les inoculums, c'est-à-dire 0,15. Celle-ci correspond environ à une population bactérienne de 10^9 cellules/ml.

Recherche des actinomycètes antagonistes des Rhizobium à l'aide de cultures pures

La recherche des antagonistes a été faite à partir de la culture des actinomycètes sur le même milieu que la souche de *Rhizobium* utilisée. La méthode employée est analogue à celle déjà employée par certains auteurs (Vojinovic 1970). Le milieu de culture commun qui permet la croissance des actinomycètes et des *Rhizobium*, est à base de glycérol, d'arginine, de mannitol et d'extrait de levure. Sa composition est la suivante:

Glycérol 12,5 g; L-arginine 1,0 g; Mannitol 10 g; extrait de levure 1 g; $K_2 HPO_4$ 1 g; Mg SO_4 , 7 H_2O 0,5 g; Na Cl 1 g; H_2O 1000 ml; Agar-Agar 16 g. Le pH a été ajusté à 6,8.

Le milieu de culture a été réparti sur les boîtes de Pétri après stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20 mn. A partir des cultures pures d'actinomycètes, quelques fragments de colonies ont été prélevés puis repiqués sur les boîtes. Dans chaque boîte il y a eu six fragments d'actinomycètes différents. La disposition a été telle que chaque colonie représentait le sommet de l'hexagone ainsi constitué. Cette opération a été répétée avec les mêmes colonies sur une autre boîte. L'ensemble des boîtes a été transféré ensuite à l'étuve à 28°C.

Après six jours d'incubation les boîtes ont été sorties afin d'ensemencer les souches de *Rhizobium* en faisant des stries entre celles des actinomycètes à raison d'une souche de *Rhizobium* par boîte. Les stries de *Rhizobium* de celle-ci forment les diagonales de l'hexagone (voir schéma A). Ensuite les boîtes ont été remises à l'étuve à la même température pendant deux à quatre jours selon que la souche de *Rhizobium* utilisée est à croissance rapide ou à croissance lente.

A la fin de la durée d'incubation, les boîtes ont été examinées pour la recherche des zones d'inhibition de la croissance des souches de *Rhizobium*. Une fois répertoriées, les souches d'actinomycètes antagonistes ont été remises en culture avec d'autres souches de *Rhizobium* pour retester leur pouvoir inhibiteur. Cette fois, un autre dispositif a été utilisé. Au milieu de chaque boîte une souche d'actinomycète a été étalée par la méthode des stries après dilution dans un peu d'eau stérile d'une colonie prélevée d'un flacon de la collection.

INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

Après six jours d'incubation à l'étuve, plusieurs souches de *Rhizobium* ont été repiquées sur les boîtes en faisant des stries parallèles de chaque côté de la culture d'actinomycète (schéma B). Cinq souches de *Rhizobium* ont été repiquées dans chaque boîte. Les zones d'inhibition ont été examinées après réincubation des boîtes à l'étuve.

Schéma A: Culture de six actinomycètes et d'une souche de *Rhizobium* sur milieu gélosé

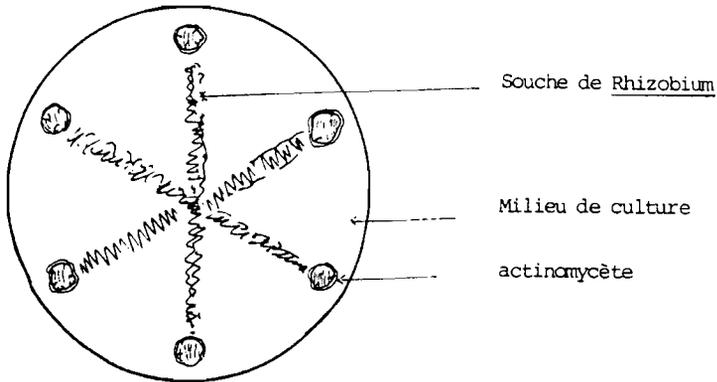
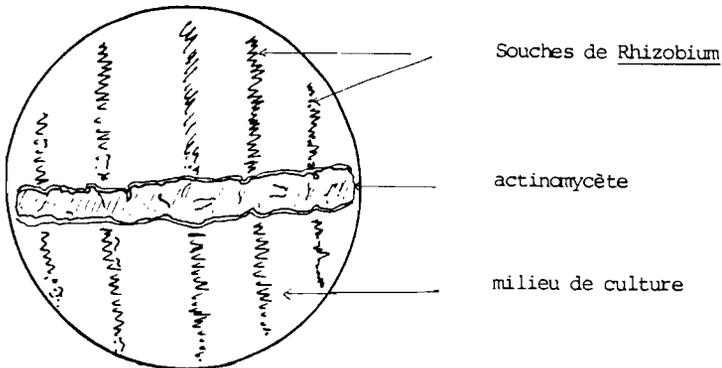


Schéma B: Culture d'un actinomycète et de cinq souches de *Rhizobium* sur milieu gélosé



Méthode d'isolement direct d'actinomycètes antagonistes des Rhizobium

La méthode mise au point par Panthier *et al.* (1979) et utilisée ensuite avec succès par Pugashetti *et al.* (1982) a été appliquée. Cette méthode permet de visualiser directement l'inhibition de *Rhizobium* par les colonies d'actinomycètes obtenues à partir d'une suspension de sol. Elle consiste à utiliser un milieu nutritif gélosé à trois couches afin de permettre l'ensemencement successif du milieu avec la suspension de sol puis avec une souche de *Rhizobium*.

Préparation de la première couche de gélose: 90 ml de milieu Lechevalier gélosé a été préparé dans un erlenmeyer et stérilisé puis refroidi à 40 ou 45°C avant l'addition de 100 mg de cycloheximide. A ce milieu a été ajouté 10 ml de la suspension de sol convenablement diluée (10^{-3} et 10^{-4}). Ce mélange a été coulé dans des boîtes de Pétri à raison de 10 ml par boîte et quatre répétitions par dilution.

Formation de la deuxième couche: Après solidification des boîtes, 5 ml d'eau gélosée à 2% préalablement stérilisée puis refroidie à 50°C a été ajouté au-dessus de la première couche. Les boîtes ont été ensuite mises à incuber comme précédemment à l'étuve pendant six jours.

Préparation de la troisième couche: Cette couche était constituée par 5 ml de milieu de Yema par boîte qui a été coulé, après stérilisation et refroidissement à 40°C au-dessus de la 2^e couche. Une culture de *Rhizobium* avec 10^9 bactéries par ml environ a été ensuite préparée. 0,5 ml de cette culture a été étalé à la surface de la couche de Yema. Les boîtes ont été remises à l'étuve pendant trois jours encore.

RESULTATS

Recherche des actinomycètes antagonistes de Rhizobium à l'aide de cultures pures

Estimation de la population d'actinomycètes de cinq sols du Sénégal

Les colonies d'actinomycètes ont été comptées sur toutes les boîtes. Cependant nous n'avons retenu que les résultats obtenus avec la dilution 10^{-3} qui nous a semblé la plus appropriée pour le dénombrement. Les résultats sont consignés dans le tableau 1. Ce tableau permet de regrouper les sols utilisés en deux, suivant le nombre d'actinomycètes qu'ils renferment. D'abord les sols de Djibélor, Dabo et Botou qui ont entre 6,66 et 8,4. 10^5 actinomycètes par gramme de sol sec. Ensuite les sols de Diouloulou et des Bayottes qui ont une population d'actinomycètes deux fois plus élevée que celle des trois autres sols (13 à 17,17. 10^5 /g de sol sec).

Recherche sur l'inhibition des souches de Rhizobium par les actinomycètes isolés du sol de Djibélor

Trois souches de *Rhizobium* (Al₆, Pa7 et ORS 911) ont été cultivées en présence de 80 souches d'actinomycètes isolées du sol de Djibélor. La longueur d'inhibition de chaque

INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

souche de *Rhizobium* a été mesurée dans les boîtes décrites dans la section *Recherche des actinomycètes antagonistes des Rhizobium à l'aide de cultures pures*. Les résultats sont donnés dans le tableau 2. Les souches d'actinomycètes qui n'ont provoqué aucune inhibition ne figurent pas dans ce tableau.

Ce tableau préliminaire montre que le nombre de souches d'actinomycètes antagonistes est très variable suivant la souche de *Rhizobium* testée. Ainsi les pourcentages d'actinomycètes inhibiteurs sont: 9,7% pour la souche Al₆; 13,3% pour Pa7 et 44% pour ORS 911. Ce résultat préliminaire a suggéré à retester les souches de *Rhizobium* par quelques actinomycètes isolés à partir du sol de Djibélor.

L'inhibition des souches de *Rhizobium* testées est représentée par les figures 1 et 2 et le tableau 3. Le tableau 3 montre comme dans l'expérience précédente, que la sensibilité des souches de *Rhizobium* à l'activité inhibitrice des actinomycètes varie d'une souche à l'autre et que cette sensibilité n'est liée ni à l'origine ni à la vitesse de croissance des *Rhizobium*.

La figure 1 montre qu'il existe parmi les *Rhizobium*, des souches très résistantes (Al₆) ou au contraire des souches très sensibles (Pa₁) aux actinomycètes inhibiteurs. Entre ces deux types, se trouvent des souches de *Rhizobium* à sensibilité intermédiaire à tous les niveaux. La Figure 2 montre qu'il existe dans le sol de Djibélor, de nombreux actinomycètes capables d'inhiber, du moins *in vitro*, un grand nombre de *Rhizobium*.

Tableau 1. Nombre d'actinomycètes inhibiteurs de la croissance de la souche de *Rhizobium* Al₆ dans différents sols du Sénégal

	SOLS				
	Diouloulou	Djibélor	Bayottes	Dabo	Botou
Nombre d'actinomycètes/g sol sec	13.10 ⁵	7,4.10 ⁵	17.10 ⁵	6,6.10 ⁵	8,4.10 ⁵
Nombre d'actinomycètes inhibiteurs/g sol sec	0,6.10 ⁵	1,3.10 ⁵	10 ⁵	0,7.10 ⁵	0,7.10 ⁵
% d'actinomycètes inhibiteur/g sol sec*	4,6	17,5	6	10,6	8,3

*par rapport à la population totale d'actinomycètes

Tableau 2. Influence des actinomycètes du sol de Djibélor sur la croissance de trois souches de *Rhizobium*

Longueur d'inhibition: + < 5 mm; 5 mm; < ++ < 10 mm; +++ > 10 mm
 - sans inhibition; 0 souches de *Rhizobium* n'ayant pas poussé

		Souches d'actinomycètes																			
		2	8	13	14	15	17	19	22	23	25	28	29	31	35	36	37	39	45	46	51
Souches de <i>Rhizobium</i>	Al 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
	Pa 7	-	-	-	-	-	+	-	-	-	++	-	-	-	++	-	-	+	-	++	-
	ORS 911	+	+	++	++	++	-	++	++	+++	++	+	+	++	+++	++	+	+	++	+++	+
		Souches d'actinomycètes suite																			
		53	54	55	57	60	66	74	75	78											
Souches de <i>Rhizobium</i>	Al 6	-	+	+	-	-	+	-	-	+											
	Pa 7	-	-	-	-	-	0	+	0	0											
	ORS 911	+	+	+	++	+	0	+	++	+											

Méthode d'isolement direct d'actinomycètes antagonistes des Rhizobium

Pour estimer la population d'actinomycètes antagonistes du sol de Djibélor, les résultats obtenus à la dilution 10^{-3} qui a semblé la plus appropriée ont été retenus. La population totale d'actinomycètes de ce sol calculée au cours de l'expérience précédente est égale à $7,4 \cdot 10^5$. En ramenant le nombre d'antagonistes à cette population totale, nous avons trouvé un pourcentage d'actinomycètes antagonistes égal à 17, 5%. Cette estimation a été obtenue en comptant les zones d'inhibition de la croissance de la souche de *Rhizobium* utilisée (Al_6) par les actinomycètes du sol. Cette souche très résistante (voir fig. 1) a été retenue pour dénombrer seulement les actinomycètes fortement inhibiteurs.

Figure 1. Classement des souches de *Rhizobium* selon leur résistance à l'action inhibitrice des actinomycètes isolés des sols du Sénégal

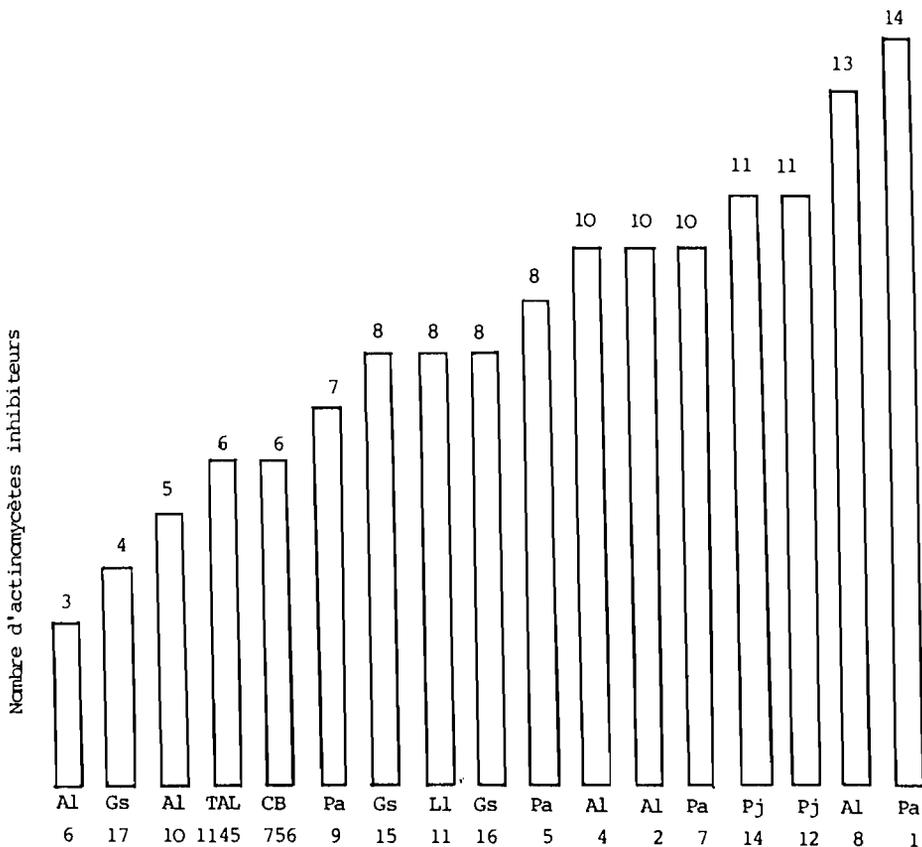
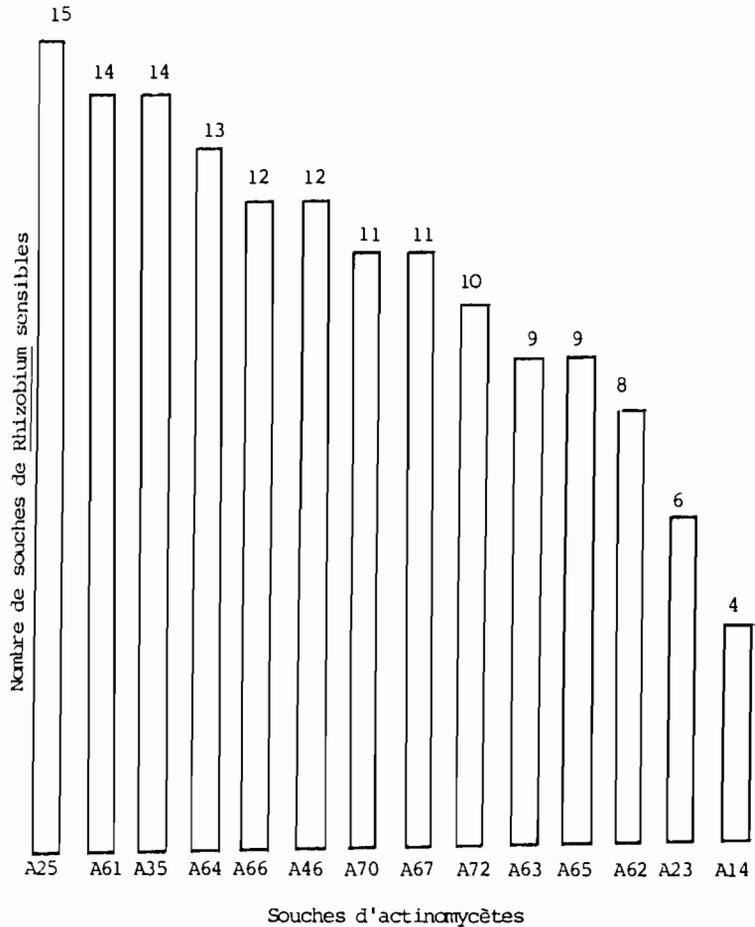


Figure 2. Classement des actinomycètes selon leur pouvoir inhibiteur de la croissance des *Rhizobium*



Cette méthode semble la plus exacte comparativement à la méthode avec des cultures pures pour deux raisons principales: l'étalement de la suspension de sol sur la boîte de Pétri fait intervenir le maximum de souches d'actinomycètes en interaction avec la souche de *Rhizobium* utilisée; la présence d'auréoles transparentes autour des actinomycètes, traduit plus une inhibition qu'un simple défaut de croissance de *Rhizobium*. L'inconvénient majeur de cette technique semble être la difficulté d'individualiser les auréoles d'inhibition afin de mieux les compter. Néanmoins, les deux méthodes se valent puisqu'elles donnent des valeurs qui se rapprochent: 10^5 colonies d'actinomycètes antagonistes par gramme de sol sec pour la méthode avec des cultures pures et $1,3 \cdot 10^5$ pour la méthode d'isolement direct soit des pourcentages de 13,3 et 17,5 respectivement. La population d'actinomycètes antagonistes des quatre sols du sud du Sénégal utilisés dans les isollements de *Rhizobium* a été estimée dans les mêmes conditions que pour le sol de Djibélor. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 1. Ce tableau montre que le sol de Djibélor contient moins d'actinomycètes que certains autres sols (Diouloulou et Bayottes). Cependant, sa population d'antagonistes est 1,5 à 3 fois supérieure à celle des autres sols.

Tableau 3. Actinomycètes antagonistes des *Rhizobium*

* sur un total de 13 actinomycètes

Souches de <i>Rhizobium</i>	Plante d'isolement	Croissance	Nombre d'actinomycètes antagonistes (Total = 14)
Pa 1	<i>P. africana</i>	r	14
Pa 5	"	l	9
Pa 7	"	l	10
Pa 9	"	l	7
Al 2	<i>A. lebbeck</i>	r	10
Al 4	"	r	10
Al 6	"	l	3
Al 8	"	l	13
Al 10	"	r	5
Pj 12	<i>P. juliflora</i>	r	11
Pj 14	"	r	11
Ll	<i>L. leucocephala</i>	r	8
TAL 1 145	"	r	6
Gs 15	<i>G. sepium</i>	r	8
Gs 16	"	r	8*
Gs 17	"	r	4
CB 756	<i>M. africanum</i>	l	6*

DISCUSSION

Les sols de Diouloulou et des Bayottes renferment un nombre d'actinomycètes plus élevé que les autres sols étudiés (Tableau 1). Des analyses antérieures ont montré que leur pH était plus acide (4,4 à 4,9 contre 5,1 à 5,9 pour les autres sols). La population d'actinomycètes des cinq sols utilisés est supérieure à celle trouvée par Davies et Williams (1970) pour un sol prélevé à la même profondeur mais dont le pH se situait entre 7 et 8. Certains auteurs ont trouvé à partir de sols aussi acides que ceux décrits plus haut, une population d'actinomycètes 10 fois supérieure à celle trouvée dans la présente étude (Patel 1974, Ayanaba et Omayuli 1975). Ces résultats et ceux trouvés dans la littérature semblent ainsi indiquer que les actinomycètes sont plus nombreux dans les sols acides (Patel 1974, Ayanaba et Omayuli 1975) que dans les sols alcalins (Davies et Williams 1970).

La corrélation entre la population d'actinomycètes et les facteurs édaphiques a déjà été établie dans plusieurs travaux. Ainsi Vrugink (1976) a montré dans les champs agricoles que le nombre d'actinomycètes est influencé à la fois par le type de sol et la pratique culturale. Pugashetti *et al.* (1982) ont également montré que le nombre d'actinomycètes antagonistes pouvait atteindre 70% de la population d'actinomycètes totale dans les champs de soja et 90% dans les champs cultivés successivement en maïs, soja et blé. Davies et Williams (1970) ont

lié la distribution des actinomycètes à un ensemble de facteurs écologiques qui règnent dans le sol (pH, humidité, température, compétition biologique...).

La résistance des *Rhizobium* à l'action inhibitrice des actinomycètes semble indépendante de leur plante d'isolement et de leur vitesse de croissance. Par exemple certaines souches de *Rhizobium* isolées d'*Albizia lebbek* (Al₆ et Al₁₀) font partie des souches les plus résistantes à l'action des actinomycètes alors que d'autres souches (Al₈ et Al₂) isolées de la même plante sont très sensibles à cette action. De même il existe parmi les deux souches de *Rhizobium* les plus résistantes aux actinomycètes, une souche à croissance rapide (Gs 17) et une souche à croissance lente (Al₆). Parmi les souches les plus sensibles, il existe aussi une souche à croissance rapide (Pa₁) et une souche à croissance lente (Al₆) (Tableau 3). Cette observation est en accord avec les résultats obtenus par van Schreven (1964) qui ne trouve aucune corrélation entre le temps de génération des souches de *Rhizobium* et leur résistance aux actinomycètes antagonistes.

Les résultats de dénombrement des actinomycètes du sol de Djibélor ont été comparés à ceux obtenus par Pugashetti *et al.* (1982). Ces derniers travaillant sur des champs cultivés, ont trouvé que la population d'actinomycètes de ces derniers était en général égale à $5 \cdot 10^5$ /g de sol sec et que la population d'actinomycètes antagonistes au *Rhizobium* variait entre $1,3 \cdot 10^3$ et $4,5 \cdot 10^5$ /g de sol sec. Dans la plupart des cas, cette population antagoniste représentait 10% de la population totale d'actinomycètes. Dans le sol de Djibélor, la population d'actinomycètes est à peu près égale à celle trouvée par ces auteurs ($7,4 \cdot 10^5$ /g de sol sec) et le nombre d'actinomycètes de ce sol est compris dans la gamme qu'ils ont trouvé ($1,3 \cdot 10^5$).

La population d'actinomycètes antagonistes du sol de Djibélor s'est révélée plus importante que celles des autres sols prélevés au sud du Sénégal. C'est pourquoi il est pensable de lier la déficience de nodulation des arbres fixateurs d'azote dans ce sol à l'importance des actinomycètes antagonistes.

REFERENCES

- Ayanaba A. and Omayuli A.P.O. (1975). Microbial ecology of acid tropical soils. A preliminary report. *Plant and soil* 43: 519-522.
- Chatel D.L. and Parker C.A. (1972). Inhibition of *Rhizobia* by toxic soil-water extracts. *Soil Biol. Biochem.* 4: 289-294.
- Chhonkar P.K. and Subba-Rao N.S. (1966). Fungi associated with legume root nodules and their effect on *Rhizobia*. *Can J. Microbiol.* 12: 1253-1261.
- Davies F.L. and Williams S.T. (1970). Studies on the ecology of actinomycetes in soil. I. The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 2: 227-238.
- El-Nakeeb, M.A. and Lechevalier H.A. (1963). Selective isolation of aerobic actinomycètes. *Appl. Microbiol.* 11: 75-77.
- Holland A.A. and Parker C.A. (1966). Studies on microbial antagonism in the establishment of clover pasture. II. The effect of saprophytic soil fungi upon *Rhizobium trifolii* and the growth of subterranean clover. *Plant and Soil* 25: 329-334.
- Johnson L.F. (1954). Antibiosis in relation to *Pythium* root rot of sugar cane and corn. *Phytopathology* 44: 69-73.
- Panthier J.J., Diem H.G. and Dommergues Y. (1979). Rapid method to enumerate and isolate soil actinomycetes antagonistic towards *Rhizobia*. *Soil Biol. Biochem.* 11: 443-445.

- Patel J.J. (1969). Microorganisms in the rhizosphere of plants inoculated with *Azotobacter chroococcum*. *Plant and Soil*. XXXI (2): 202-223.
- Patel J.J. (1974). Antagonism of actinomycetes against *Rhizobia*. *Plant and Soil* 41: 395-402.
- Pugashetti B.K., Angle J.S. and Wagner G.H. (1982). Soil microorganisms antagonistic towards *Rhizobium japonicum*. *Soil Biol. Biochem.* 14: 45-49.
- Smith R.S. and Miller R.H. (1974). Interactions between *Rhizobium japonicum* and soybean rhizosphere bacteria. *Agronomy journal* 66: 564-567.
- van Schreven D.A. (1964). The effect of some actinomycetes on rhizobia and *Agrobacterium radiobacter*. *Plant and Soil* 21: 283-302.
- Vincent J.M. (1970). *A manual for the practical study of root nodules bacteria*. I.B.P. Handbook no. 15. Blackwell Sci. Publications, Oxford and Edinburgh.
- Vincent J.M. (1977). *Rhizobium: General microbiology*. In: *A treatise on dinitrogen fixation*. Section III: Biology. R.W.F. Hardy and W.Z. Silver, Editors. Wily - Inter - Science publication. pp. 277-366.
- Visona L. et Tardieux P. (1964). Antagonistes des *Rhizobium* dans la rhizosphère du trèfle et de la luzerne. Extrait des annales de l'Institut Pasteur. Suppl. au no. 3, sept 1964. Tome 107: 297-302.
- Vojinovic Z. (1970). A method for establishing the population density of antagonists to *O. graminis* in soil. *Plant Protection* no. 110-111. pp. 365-372.
- Vruggink H. (1976). Influence of agricultural crops on the actinomycetes flora in soil. *Plant and Soil* 44: 639-654.

EVALUATION DE LA PRODUCTION DES SIDÉROPHORES PAR LES SOUCHES DE *RHIZOBIUM CICERI* ISOLEES DE DIFFERENTS SOLS DU MAROC

El Bekkay BERRAHO
Laboratoire de Microbiologie Faculté des Sciences
Université Mohammed V
B.P. 1014 Rabat, Maroc

Résumé: Dans des conditions de stress ferrique, certains microorganismes rhizosphériques sécrètent des chélateurs biologiques de fer appelés sidérophores. Ces derniers sont susceptibles d'améliorer la nutrition ferrique des plantes cultivées dans des sols déficients en fer, notamment les sols calcaires et alcalins.

Les *Rhizobium ciceri*, spécifiques du pois chiche, cultivés sur le milieu YEM traité au 8-hydroxyquinoléine et additionné de différentes concentrations de fer, atteignent leur croissance optimale à une concentration de 2 μM de FeCl_3 .

L'étude de l'effet des chélateurs chimiques de fer, l'EDDHA (Ethylènediamine di[O-hydroxy]-phényl-acétique acide) et le 2-2-dipyridyl sur la croissance des souches de *Rhizobium ciceri*, a permis de révéler que les deux souches, PCH 34-G3 et ILC-G3, ont un grand pouvoir d'extraction du fer complexé par ces chélateurs.

La recherche des sidérophores chez les *Rhizobium ciceri* est effectuée par trois techniques. Celle de Csaky a montré que ces bactéries ne produisent pas les sidérophores de type hydroxamates; par contre la technique d'Arnow a permis de montrer que toutes les souches sont capables de produire des sidérophores de type phénolates (salicylates et dihydroxybenzoates) avec une grande variabilité de production (de 3,5 à 16,5 mg/L de culture) selon les souches. L'application du test CAS (Chrome Azurol S), à utilisation universelle pour la détection des sidérophores, indépendamment de leur structure, a confirmé les résultats obtenus par la technique d'Arnow. Les deux souches, PCH 34-G3 et ILC-G3, qui ont un grand pouvoir compétitif avec l'EDDHA et le 2-2-dipyridyl vis à vis du fer, produisent des quantités importantes de sidérophores détectables au niveau des surnageants des cultures. Cette production est fortement influencée par la composition du milieu de culture et la concentration de certains éléments chimiques notamment le phosphore.

Abstract: When subjected to ferric stress, certain microorganisms in the rhizosphere secrete biological (iron) chelates (called siderophores) which can improve the ferric uptake of plants grown on iron-deficient soils, especially on calcareous and alkaline soils.

Rhizobium ciceri, which are specific to chick pea, when cultivated on a YEM medium, treated with 8-hydroxyquinoleine and added to various concentrations of iron, reach their optimal growth conditions at a concentration of 2 μM of FeCl_3 .

Studying the effect of chemical (iron) chelates (EDDHA and 2-2-dipyridyl) on the growth of *Rhizobium ciceri* strains has shown that two strains (PCH 34-G3 and ILC-G3) have a good capacity to extract iron compounds via these chelates.

There are three techniques to characterize siderophores in *Rhizobium ciceri*. Using the Casky technique, we have shown that these bacteria do not produce hydroxamatic type siderophores.

On the other hand, the Arnow technique shows that all the strains are capable of producing phenolic type siderophores (salicylates and dihydroxybenzoates) with great variation in yield (between 3.5 and 16.5 mg/l of culture), depending on the strain. Applying the CAS (Chrome Azurol S) test, which is used universally to detect siderophores, regardless of their structure, has confirmed the results obtained using the Arnow technique. There are two strains (PCH 34-G3 and UKCOG3) that have proven to be very competitive with EDDHA and 2-2-dipyridyl with regard to iron; they also produce considerable quantities of siderophores that can be detected in the supernatants. Production is greatly affected by the composition of the culture medium and the concentration of certain chemical elements, particularly phosphorus.

**LA CERCOSPORIOSE DES AGRUMES *PHAEORAMULARIA ANGOLENSIS*
(DE CARVALHO ET O. MENDES) P.M. KIRK: EVOLUTION DE LA MALADIE
SUR FRUITS EN ZONE FORESTIERE HUMIDE**

J. KUATE*, B. MANGA*, E. FOURE*,

J.Y. REY*** et F. DAMESSE*

*IRA Nkolbisson BP 2067 Yaoundé, Cameroun

**IRA/IRFA BP 13 Nyombé, Cameroun

***IRFA Korogho Côte d'Ivoire

Résumé: *La cercosporiose des agrumes provoquée par Phaeoramularia angolensis (de Carvalho and O. Mendes) P.M. Kirk occasionne de sérieux dégâts sur feuilles et fruits au Cameroun. Depuis deux ans, un projet soutenu en partie par la FIS a permis d'initier des recherches sur cette maladie dans la région de Yaoundé. L'observation de plusieurs séries de fruits à différentes saisons a permis de constater que:*

- *les chutes de fruits malades sont précoces et nombreuses en seconde campagne (floraison de septembre à décembre) mais plus tardives et peu nombreuses sur variétés peu sensibles en première campagne (floraison de mars-juin);*
- *les proportions de fruits tachés sont élevées même sur variétés réputées peu sensibles à la cercosporiose pendant toutes les campagnes;*
- *les fruits demeurent sensibles durant tout leur développement. C'est ce que traduit l'augmentation continue du nombre moyen de lésions par fruit ainsi que des proportions de fruits tachés;*
- *l'accroissement du diamètre moyen des fruits est faible en seconde campagne (septembre - décembre) suite aux attaques précoces et intenses;*
- *une fructification déclenchée par des arrosages en saison sèche (février 90) n'a été attaquée que tardivement après le retour des pluies.*

Les résultats sont présentés pour trois séries de fruits sur sept (une de première campagne, une de seconde campagne et celle correspondant à la floraison décalée par arrosage).

Abstract: *Cercosporiosis in citrus fruits is caused by Phaeoramularia angolensis (de Carvalho and O. Mendes) P.M. Kirk, a fungus that is difficult to cultivate artificially. This parasite does serious damage in Cameroon because it attacks both the leaves and the fruit.*

For the last two years, a project that is partially funded by IFS has been doing research on this disease in the Yaoundé region. The symptoms have been described by using the phenology of the organs attacked. There were no major difficulties in isolating and culturing the pathogen starting from the first appearance of the symptoms on the fruit.

Epidemiological observations carried out between October 1989 and December 1991 indicated that :

- *the fruit is vulnerable from the first stages of fruit formation through maturity regardless of the season, although the intensity of rainfall affects the rhythm of the attacks and the extent of damage;*
- *two to three months after budding, the leaves are no longer attacked. The May-June shoots are not seriously attacked unlike the October-November shoots;*
- *the earlier the fruit is attacked the greater the damage and losses;*
- *certain varieties of fruit seem to have leaves that are not very vulnerable, although the fruit is;*
- *fruit induced by irrigation during the dry season was attacked very late, in the next rainy season, even on very sensitive varieties.*

Certain avenues of research, such as on the long-term control of this disease, are discussed.

LA DYNAMIQUE DE LA CERCOSPORIOSE NOIRE (*MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* MORELET) DES BANANIERS (AAA) DANS LES CONDITIONS DE NJOMBE (MAI 90-AOUT 91): INFLUENCE DE LA DATE DE PLANTATION ET DU STADE PHYSIOLOGIQUE DE LA PLANTE

A. MOULIOM PEFOURA
IRA/CRBP BP 13 Njombé Cameroun

Résumé: La cercosporiose noire (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) des bananiers et des plantains est une maladie fongique qui se manifeste par une destruction plus ou moins importante du système foliaire de la plante. La baisse de rendement peut, dans certains cas, atteindre cent pour cent. Le contrôle de la maladie en culture villageoise demeure pour l'instant difficile. Dans les plantations industrielles, on fait appel à une lutte raisonnée sur avertissement biologique. Les travaux réalisés visent à améliorer ce contrôle, et cherchent en particulier à apprécier s'il existe une date de plantation pouvant permettre à la plante d'être moins affectée par la maladie d'une part et d'autre part à évaluer l'impact du stade physiologique de la plante sur sa sensibilité à la maladie. Huit dates de plantation ont été réalisées de manière échelonnée tous les 45 jours avec la grande naine, une variété très sensible utilisée dans les plantations industrielles. Sur la base des paramètres analysés (Etat d'Evolution de la maladie EE et durée du cycle infectieux), les plantations de mars, mai et dans une certaine mesure celles de juin et de février sont les plus affectées. Leur cycle végétatif se déroule dans une période très favorable à la maladie. Les traitements d'août à décembre sont moins affectés. Mais dans tous les cas, aucune date de plantation n'a permis d'obtenir des régimes récoltables. Des indications sont données dans le texte sur l'influence du stade physiologique de la plante sur sa sensibilité à la maladie.

Abstract: Black leaf streak (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) in banana and plantain trees is a fungal disease that destroys the plant's foliar system and, in some cases, the whole yield. It is difficult to control this disease when it occurs in villages. Industrial plantations utilize supervised control methods when they receive a "biological warning". In our work, we seek to improve disease control, particularly by studying planting dates and evaluating the relationship between the plant's physiological stage and its susceptibility to the disease. Eight planting dates, each 45 days apart, were tested on the Giant Cavendish variety, a highly sensitive variety that is usually grown in industrial plantations. Using stage of disease and length of infectious cycle as parameters to be analyzed, we found maximum sensitivity when planting was done in March and May, as well as in June and February to a certain extent. Banana trees planted between August and December were the least affected. However, none of the planting dates resulted in the production of harvestable bunches. The paper reports on the effects of the physiological stage of the plant on its susceptibility to the disease.

La cercosporiose noire (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) a atteint la zone bananière du moungo en 1983. Son pouvoir pathogène élevé lui a permis de se substituer en deux à trois ans à la cercosporiose jaune (*Mycosphaerella musicola* Leach). Les premiers travaux réalisés au Cameroun sur cette grave maladie (Mouliom Pefoura 1984) avaient pour but d'évaluer son incidence potentielle dans les plantations industrielles de bananes dessert (AAA-cavendish) du Mounjo. Il se dégageait de ces travaux la nécessité de mettre au point un système d'avertissement biologique pour contrôler ce parasite. En effet, la méthode d'avertissement jusque-là utilisée avec succès pour le contrôle de *M. musicola* (Tezenas 1976) ne lui était pas

transposable, de même que celle mise au point au Gabon sur plantain (Fouré 1983) n'était pas utilisable en l'état.

Le système d'avertissement mis au point l'année qui suivait son apparition (Mouliom Pefoura et Lassoudière 1984) permet de suivre l'évolution de la maladie. Ce système est dérivé de la méthode de l'Etat d'Evolution (EE) mise au point en Guadeloupe pour le contrôle de la cercosporiose jaune (Ganry et Meyer 1972a). L'aspect quantitatif des symptômes est actuellement pris en compte (Fouré 1988).

Les observations réalisées sur des plants en phase végétative permettent de déclencher les traitements chimiques à bon escient. Le contrôle de la maladie dans les plantations industrielles est bien maîtrisé grâce à une lutte raisonnée sur avertissement biologique. Il n'en va pas de même pour les plantations villageoises où la lutte par voie chimique est possible (Mouliom Pefoura et Fouré 1988), mais reste onéreuse compte tenu des systèmes culturaux qui y sont pratiqués (cultures associées en touffes).

Quelle technique culturale permettrait de réduire l'effet de la maladie sur la plante en l'absence de tout traitement chimique?

Ces motivations ont conduit à développer entre autres des études visant à mieux comprendre les potentialités d'infestation naturelles des plantations en vue d'améliorer le contrôle de la cercosporiose noire. Nous avons déterminé l'incidence des facteurs climatiques sur l'évolution de la maladie (Fouré *et al.* 1991). Le but des travaux présentés dans ce document est d'évaluer l'influence de la date de plantation et du stade physiologique de la plante sur la dynamique de la maladie.

MATERIELS ET METHODES

Matériel végétale

Des plantations échelonnées sont réalisées tous les 45 jours avec le cultivar Grande Naine, sous groupe cavendish (AAA) très sensible à *M. fijiensis*. Le principe consiste à mettre en place un bloc de trois parcelles élémentaires lorsque le précédent devient observable. Ceci permet de disposer à toutes les périodes climatiques de l'année de plants observables à différents stades physiologiques. Huit dates de plantations ont été retenus de la manière suivante: T1 le 30/03, T2 le 15/05, T3 le 30/06, T4 le 15/08, T5 le 30/09, T6 le 15/11, T7 le 30/12 et T8 le 15/02.

METHODES GENERALES D'ETUDES

Observation: Sur chaque bloc de trois parcelles élémentaires, 30 plants (10 par parcelle) sont observés chaque semaine pour la détermination de l'état d'évolution de la maladie (EE), de la PJFT (plus jeune feuille avec tirets de stade 1 ou 2) et de la PJFN (plus jeune feuille nécrosée). La méthode a été décrite par ailleurs (Mouliom Pefoura et Lassoudière 1984). Parallèlement des marquages de cigare sont réalisés toutes les trois semaines au stade 2 de son

évolution. C'est à ce stade cigare que la première contamination est susceptible de se produire. Les observations effectuées deux fois par semaine permettent ainsi de déterminer avec précision les durées d'incubation maximale et d'évolution des symptômes à différentes périodes de l'année.

Analyse des résultats: La comparaison des différentes dates de plantation a été effectuée par une analyse de variance (test t de Student) portant sur les paramètres EE et durées d'incubation et l'évolution des symptômes. Les données analysées sont collectées entre le stade 4-5 feuilles et la floraison. Concernant l'évaluation de l'incidence du stade physiologique de la plante sur sa sensibilité à la maladie, l'analyse de variance a porté uniquement sur le paramètre EE. Les traitements sont comparés en plusieurs groupes en utilisant les observations réalisées au cours d'une même période climatique.

RESULTATS

Les traitements analysés concernent les parcelles plantées entre mars 90 et février 91, et sur lesquelles les observations ont été effectuées entre mai 90 et août 91.

Comparaison de la dynamique de la maladie sur les différentes dates de plantation

Etude de l'Etat d'Evolution EE: Les résultats détaillés sont présentés sur les figures 1 et 2. De manière générale, on remarque qu'à la première observation l'EE se situe entre 20 (T7) et 600 (T6). Le développement de la maladie se fait de manière progressive sur les jeunes plants. Cependant dans des cas rares (conditions très favorables), l'EE lors de la première observation peut déjà se situer autour de la valeur maximale (généralement atteinte vers le début de la floraison lorsque celle-ci se produit en périodes favorables). C'est le cas de T3 avec un EE de 1260 lors de la première observation (27/8).

L'analyse statistique de ce paramètre (Tableau 1) montre que les traitements T1 à T4 les plus affectés avec des EE moyens variant entre 750 et 1000. Le cycle végétatif de ces traitements se déroule totalement (T1, T2) ou pour une grande part (T3, T4) dans des conditions très favorables au développement de la maladie. Les traitements T5 à T8 sont par contre moins affectés avec des EE moyens compris entre 500 et 700. Ceci s'explique par le fait que leur cycle végétatif se déroule totalement ou partiellement en périodes sèches (mi-novembre à mi-mars) peu favorables à l'évolution de la maladie. La figure 3 présente les relevés mensuels des pluies au cours de la période d'étude.

Etude de la durée du cycle infectieux (DCI): Les résultats détaillés de l'étude des durées d'incubation et d'évolution des symptômes sont présentés sur le tableau 2. L'analyse statistique permet de distinguer 4 classes de traitements identiques (voir tableau 1). Les traitements T1, T2 et T8 ont les DCI les plus courtes. Ce sont les plus affectés. T5 avec la plus longue DCI semble le moins affecté. Une fois de plus, les traitements dont les marquages de cigare et l'évolution des symptômes se sont réalisés en périodes très favorables à la maladie (périodes humides) sont les plus affectés.

Tableau 1. Epidémiologie du cercospora noir des bananiers et plantain. Influence de la date de plantation sur la dynamique de la maladie (comparaison par le test t de Student [5%]). (Les traitements identiques sont reliés par un même trait).

1. Etat d'évolution moyen au cours du cycle végétatif

<u>T7</u>	T6	<u>T8</u>	<u>T5</u>	T4	<u>T1</u>	<u>T2</u>	T3
-----		-----					
585	610	639	702	750	810	888	936

2. Durée moyenne du cycle infectieux (jours) au cours du cycle végétatif

<u>T8</u>	<u>T2</u>	<u>T1</u>	T7	<u>T4</u>	<u>T6</u>	<u>T3</u>	T5
28,2	28,9	29,2	34,2	38,3	39,4	40,3	44,2

ETUDE DE L'INFLUENCE DU STADE PHYSIOLOGIQUE DE LA PLANTE SUR SA SENSIBILITE A LA MALADIE

L'ensemble des observations de chaque cycle végétatif sont scindées en 3 groupes pour T1, T2, et T8, et en 4 pour T3 à T7. Le nombre de groupes est d'autant plus important que la partie du cycle végétatif qui s'est déroulée en période sèche est longue. (La croissance est lente, le nombre total de feuilles émises semble plus élevé et la floraison qui marque la fin des observations arrive tardivement). Le tableau 3 présente en détail les 11 groupes (A, B..., J, K) qui ont pu être définis. L'analyse de ce tableau a permis de distinguer les deux principales périodes qui caractérisent généralement l'évolution de la maladie dans les conditions de cette étude. La première, de début octobre à mi-avril, est dominée par la sécheresse et constitue la période peu favorable à l'évolution de la maladie.

Au cours de cette période, la différence de degré de sévérité de la maladie est nette entre les différents stades physiologiques. Pour chaque groupe d'observations, l'infection est d'autant plus importante que le stade physiologique concerné est moins jeune. L'EE le plus faible est à chaque fois obtenu sur le plus jeune stade (4-5 à 10-12 feuilles). En revanche, on note qu'au cours de la deuxième période, très favorable à l'évolution de la maladie (mi-avril à septembre), certains stades physiologiques ne présentent pas de différence significative de sensibilité à la maladie. C'est le cas de T2 et T3 dans le groupe C, I,J. Il importe de relever que l'évolution de la maladie est quasi identique sur T7 et T8 entre mi-avril et août lorsque les deux traitements fleurissent.

DISCUSSION - CONCLUSION

Ce travail a permis d'évaluer l'incidence de la date de plantation et du stade physiologique de la plante sur la dynamique de la maladie. Les traitements ont été comparés en utilisant les

paramètres Etat d'évolution de la maladie (EE) et Durée du cycle infectieux (DCI). Pour les deux paramètres analysés, on peut dire de manière globale que les traitements T1 et T2, et dans une certaine mesure T3 et T8 sont les plus affectés par la maladie. Ces quatre traitements correspondent aux mises en place de la période de février à juillet. Le cas de T3 est assez paradoxal car ayant à la fois un EE élevé et la plus longue DCI. Les plantations réalisées au cours de la période d'août à janvier (T4 à T7) sont relativement moins affectées par la maladie. Ces deux grandes périodes confirment celles définies lors de l'étude de l'influence des facteurs climatiques sur l'évolution de la maladie (Fouré *et al.* 1991). Cette étude a montré que la dynamique de la maladie est principalement tributaire des conditions hydriques de l'environnement. Mais, dans tous les cas, on constate que l'installation de la maladie se fait de manière progressive indépendamment de la date de plantation (Figures 1 et 2).

Tableau 2. Epidémiologie du cercospora noir à Njombé: Evolution des durées d'incubation (I) et d'évolution des symptômes (E) en fonction de la date de marquage (DMC) sur les différents traitements (dates de plantation)

T1(30/03/90)	DMC durée(jours)			T2(15/05/90)	DMC durée(jours)			T3(30/06/90)	DMC durée(jours)			T4(15/08/90)	DMC durée(jours)		
	I	E	I+E		I	E	I+E		I	E	I+E		I	E	I+E
	3/5/90	15	13,9		28,9	6/7/90	12,8		9,6	22,4	22/8/90		18,8	12,1	30,9
30/5/90	15,2	10,8	26	26/7/90	13	13,5	26,5	25/9/90	16,1	11,2	27,3	31/10/90	17,3	9,4	26,7
19/6/90	15,8	16,2	32	20/8/90	16,3	14,2	30,5	5/11/90	14,8	15,6	30,4	19/11/90	15,6	12,3	27,9
10/7/90	13,3	12,4	25,8	14/9/90	18,2	11,2	29,4	5/12/90	19,6	16,5	36,1	10/12/90	13	18,1	31,1
5/8/90	16,2	17,3	33,5	8/10/90	16,8	11,8	28,6	26/12/90	23,1	40,7	63,8	24/12/90	15	41,2	56,2
X	15,1	14,1	29,2	31/10/90	18,7	17	35,7	12/1/91	28,3	24,3	52,6	12/1/90	27,2	31,5	58,7
X				X	16	12,9	28,9	X	20,2	20,1	40,3	X	17,1	21,2	38,3

T5(30/09/90)	DMC durée(jours)			T6(15/11/90)	DMC durée (jours)			T7(30/12/90)	DMC durée(jours)			T8(15/02/91)	DMC durée(jours)		
	I	E	I+E		I	E	I+E		I	E	I+E		I	E	I+E
	26/11/90	17	11,5		28,5	12/1/91	23		28	51	5/3/91		23	21,8	44,8
28/12/90	17,3	33,6	50,9	7/2/91	26,6	27	53,6	23/3/91	19,3	22,2	41,5	8/5/91	14	11,5	25,5
14/1/91	21,3	27	48,8	2/3/91	21,8	19,3	41,1	18/4/91	19	18,2	37,2	24/5/91	14,7	10,3	25
5/2/91	26,8	28,9	55,7	23/3/91	20,5	21,3	41,8	8/5/91	14	12,1	26,1	20/6/91	15,9	14,8	30,7
1/3/91	26,8	19,9	46,7	18/4/91	16	20	36	24/5/91	15,4	13,2	28,6	16/7/91	12,9	11,1	24
17/3/91	21,7	19,4	41,1	8/5/91	14,1	9	23,1	14/6/91	16	10,9	26,9				
9/4/91	17,6	19,7	37,3	27/5/91	16,3	12,7	29								
X	21,2	22,9	44,1	X	19,8	19,6	39,4	X	16,8	16,4	33,2	X	15,2	13	28,2

Dans le cadre des plantations industrielles à haute technicité utilisant la lutte raisonnée sur avertissement, on peut estimer que les parcelles mises en place entre août et janvier nécessiteraient moins d'intrants chimiques pour assurer un bon contrôle de la maladie. Ceci est en accord avec le type de contrôle réalisé dans ces plantations. On utilise notamment entre novembre et mars des fongicides peu coûteux (benzimidazoles, morpholines) qui permettent

INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

quand même de maintenir la maladie à un niveau comparable à celui des triazoles beaucoup plus chers et efficaces utilisés entre avril et octobre.

Tableau 3. Epidémiologie du cercospora noir des bananiers et plantains. Influence du stade physiologique de la plante sur sa sensibilité à la maladie (comparaison par le test t de Student [5%])

Périodes d'observ.	Comparaison des traitements et valeur EE moyen	Stades physiologiques (nombre feuilles émises)	N° d'ordre du groupe
4/5-25/6	T1	5,5 - 13,6	A
4/7-20/8	T1: 868 T2: 674	15,6 - 21,5 5,6 - 13,2	B
27/8-8/10	T1: 1110 T2a: 998* T3a: 964*	22,6-25,0(fleur) 13,9-19,4 5,3-10,9	C
1/10-26/11	T2: 1010 T3: 813 T4: 618	18,5-25,5(fleur) 9,8-17,9 5,0-14,2	D
26/11-31/12	T3: 1042 T4: 973 T5: 827	17,9-21,5 14,2-18,7 5,8-11,0	E
7/1-18/2	T3: 894 T4: 745 T5: 650 T6: 403	21,8-25,3(fleur) 19,4-23,4 11,7-16,7 5,1-11,0	F
18/2-8/4	T4: 723 T5: 597 T6: 481 T7: 323	23,4-27,2(fleur) 16,7-21,5 11,0-16,5 4,3-10,2	G
15/4-20/5	T5a: 690* T6a: 749* T7b: 377* T8b: 282*	22,6-27,1(fleur) 17,9-23,1 11,9-18,3 5,5-12,1	H
27/5-17/6	T6a: 1041* T7b: 752* T8b: 689*	24,3-26,6(fleur) 19,3-22,6 13,1-16,6	I
24/6-5/8	T7a: 1071* T8a: 1020*	24,6-27,8(fleur) 18,7-21,8	J
5/8	T8: 1213	21,8-22,2(fleur)	K

* Les traitements d'un groupe portant la même lettre sont statistiquement identiques.

Figure 1. Epidémiologie du cercospora noir à Njombé: variation état d'évolution EE sur les traitements T1, T2, T3 et T4

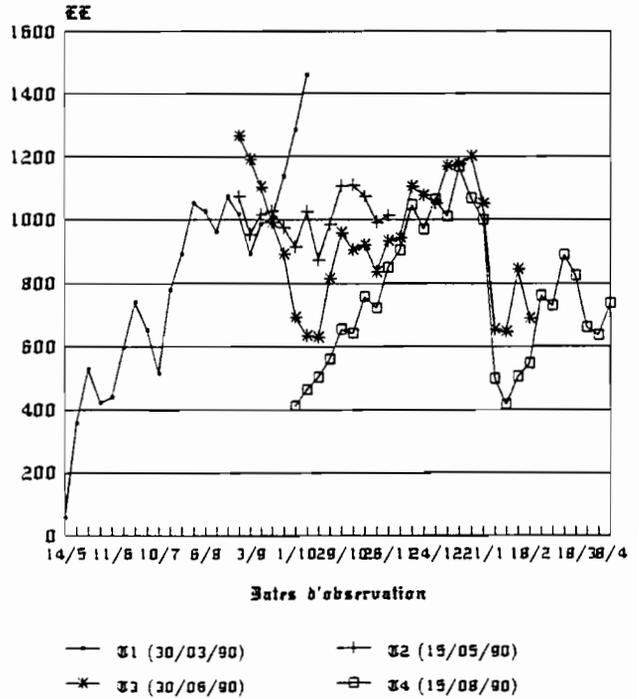


Figure 2. Epidémiologie du cercospora noir à Njombé: variation état d'évolution EE sur les traitements T5, T6, T7 et T8

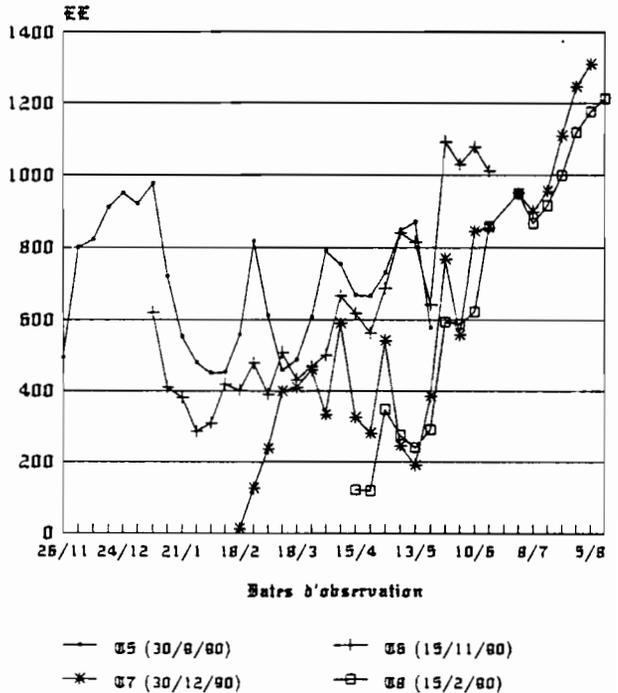
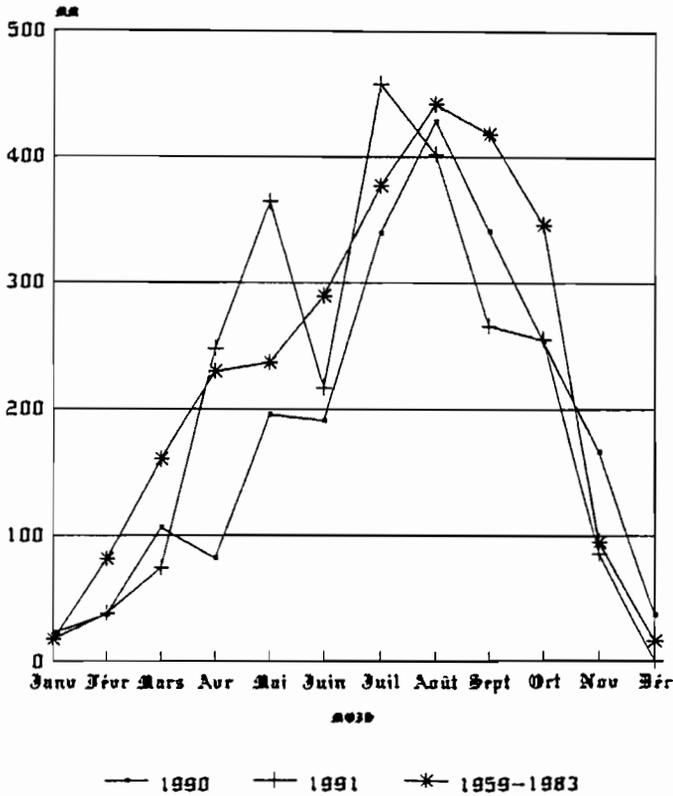


Figure 3. Moyennes mensuelles de pluies de 1990, 1991 et de 1959 à 1983



Les périodes d'août à janvier pourraient également être les plus indiquées dans le cadre des plantations villageoises n'utilisant aucun contrôle chimique de la maladie. Mais pour l'instant, nous ne sommes pas en mesure de conseiller une période de plantation plus favorable pour ce type de production. Aucune de nos dates de plantations n'a permis d'avoir de régimes récoltables. En effet la pression d'inoculum a été très forte et aucun régime n'a pu atteindre la maturité physiologique. Le rendement aurait été le paramètre le plus indicatif par rapport aux deux paramètres que nous avons analysés (EE, DCI). Nous avons initié parallèlement à cet essai qui se poursuit, un travail similaire avec le plantain (AAB) moins sensible à la maladie et susceptible d'avoir sans traitement chimique des régimes récoltables. Ceci nous permettra d'avoir outre EE et DCI, le rendement pour comparer les différents traitements.

Concernant l'influence du stade physiologique de la plante sur sa sensibilité à la maladie, seul le paramètre EE a été utilisé pour comparer les traitements. Cette influence ne semble s'exprimer que dans des cas où les conditions d'évolution de la maladie sont stables et ne subissent pas des variations importantes. Ces conditions correspondent généralement pour une grande part à la période sèche peu favorable au développement de la maladie. Au cours de cette période, l'inoculum doit probablement être stable ou varier très peu. L'installation de

la maladie au cours de ce laps de temps doit se faire très progressivement pendant que l'inoculum s'accumule sur la parcelle. Ceci est favorisé par l'augmentation de la quantité de feuilles sur lesquelles se déposent les germes infectieux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Foure E. (1983). Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Sélection de molécules fongicides nouvelles. Activités comparées de différentes molécules fongicides sur *M. fijiensis* Morelet, agent de la maladie des raies noires des bananiers et plantains au Gabon (I). *Fruits* 38 (1): 21-34.
- Foure E. (1988). Stratégies de lutte contre la cercosporiose noire des bananiers et des plantains provoquée par *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. L'avertissement biologique au Cameroun. Evaluation des possibilités d'amélioration. *Fruits* 43 (5): 269-273.
- Foure E., Moreau A. et Mouliom Pefoura A. (1991). Influence des facteurs climatiques sur le développement de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agent de la cercosporiose noire des bananiers (AAA) dans la zone bananière du Mounjo (1987-1989). 24 pages + figures et tableaux. En cours de publications dans *Fruits*.
- Ganry et Meyer J.P. (1972a). La lutte contrôlée contre le cercospora aux Antilles. Bases climatiques de l'avertissement. *Fruits* 27 (10) 665-676 (11) 745-764.
- Ganry et Meyer J.P. (1972b). Cercospora du bananier. Application de techniques d'observation et de numérotation de la maladie. Bilan de trois années de traitements à cycle long. *Fruits* 27 (11) 767-676.
- Mouliom Pefoura A. (1984). Distribution et incidence potentielle de la cercosporiose noire causée par *Mycosphaerella fijiensis* MORELET sur banane dessert et plantain dans le département du Mounjo (Cameroun); situation en mai 1984. *Rev. Sci. et Tech. Ser. Agro.* 1 (1), 9-13.
- Mouliom Pefoura A. et Foure E. (1988). Efficacités comparées de différentes formulations de triadiménol appliquées au sol sur *Mycosphaerella fijiensis*, agent de la maladie des raies noires des plantains au Cameroun. Evaluation des possibilités de lutte en milieu paysan. *Fruits* 43 (4).
- Mouliom Pefoura A. et Lassoudière A. (1984). Mise au point d'un système d'avertissement biologique pour la lutte contre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agent de la cercosporiose noire dans les bananeraies camerounaises. Comm. WARCORP, Libreville, Déc. 1984, 24 pp.
- Tezenas du Montcel H. (1976). Observation sur la cercosporiose du bananier au Cameroun en 1974. Evaluation des possibilités d'avertissement. *Fruits* 31 (7-8) pp. 437-458.

**RESPONSE OF GROUNDNUT (*ARACHIS HYPOGEA*), *GLIRICIDIA SEPIUM*,
AND *LEUCAENA LEUCOCEPHALA* (K-8) TO INOCULATION WITH
PEAT-BASED *RHIZOBIUM* INOCULANTS ON AN ACID SANDY CLAY LOAM SOIL**

Denis S. AMARA .

Department of Soil Science Njala University College
P.M.B. Freetown, Sierra Leone

Abstract: An experiment was conducted on the Njala upland soil series (Typic haplustox) in Sierra Leone to test whether groundnut (*Arachis hypogea*), *Gliricidia sepium*, and *Leucaena leucocephala* would respond to inoculation with peat-based *Rhizobium* inoculants. Inoculation did not significantly increase the yield and yield components of groundnut over the uninoculated control. Nitrogen fertilizer application did not affect the yield and nodulation of this crop. This is suggestive of the compatibility of groundnut in intercropping systems where nitrogen fertilizers may be required. *Gliricidia sepium* responded to inoculation but *Leucaena leucocephala* did not. It is probable that the lack of response of groundnut and *Leucaena* to inoculation is due to the inability of the inoculant *Rhizobium* strains to compete with an already established indigenous population. The conclusion, based on the results reported here, is that seed inoculation of groundnut and *Leucaena* is not needed, whereas the seeds of *Gliricidia* need to be inoculated before planting on the Njala upland soil series in Sierra Leone.

Résumé: Une expérience a été faite sur les sols des hauts plateaux Njala (Typic haplustox) de Sierra Leone afin de déterminer si *Arachis hypogea*, *Gliricidia sepium* et *Leucaena leucocephala* réagiraient à des inoculants de *Rhizobium* à base de tourbe. Ni le rendement ni les facteurs du rendement de l'arachide inoculée ne subissent d'augmentation significative par rapport aux plantes non inoculées. L'application d'engrais azotés n'a pas non plus eu d'effet sur le rendement et la nodulation de l'arachide, ce qui indique une bonne compatibilité avec des systèmes d'association de cultures pour lesquels un amendement à base d'azote s'avérerait nécessaire. On constate une réaction à l'inoculation pour *Gliricidia sepium* mais aucune pour *Leucaena leucocephala*. L'absence de réaction à l'inoculation dans le cas de l'arachide et du *Leucaena* et sans doute due à l'incapacité des souches de *Rhizobium* inoculant d'entrer en concurrence avec une population locale déjà établie. Sur la base des résultats rapportés ici, il est permis de conclure qu'une inoculation des semences n'est pas nécessaire dans le cas de l'arachide et du *Leucaena* mais qu'elle est indispensable pour *Gliricidia* avant semis sur les sols des hauts plateaux Njala de Sierra Leone.

The Njala upland soil series occupies about 70% of the arable land area in the small university town of Njala (population 7500) in the southern part of Sierra Leone. This is therefore the major soil type used by the university for agronomic experiments, and by the farming community to produce rice, the staple food, in mixed cropping with groundnut, maize, cassava, broad beans, pigeon peas and other crops.

Although the native fertility of this soil is low, less than 3% of the farmers use chemical nitrogen, phosphorus, and potassium fertilizers to replenish soil fertility due to the unavailability and/or high cost of this input. In the case of legume production, this problem

makes the use of biofertilizers, e.g. peat-based *Rhizobium* inoculants which supply the nitrogen requirements of the crop through symbiotic nitrogen fixation, even more imperative.

In the face of the escalating price of nitrogen fertilizers, legume seed inoculation with peat-based *Rhizobium* inoculants before planting has become an important agricultural practice in some countries such as America, Kenya, Malawi, Rwanda and Senegal. Legume seed inoculation is still a novel idea in Sierra Leone, despite its importance and potential low cost, because no research has been done to ascertain the need for inoculation of the important legumes grown in the country.

The objective of this research is therefore to determine the need for inoculation of groundnut (*Arachis hypogea*), *Gliricidia sepium* and *Leucaena leucocephala*. Groundnut is an important protein food and cash crop, while *Gliricidia* and *Leucaena* have been selected (Amara 1987) for agroforestry in Sierra Leone.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted on the Njala upland soil series (Typic haplustox, sandy clay loam soil), a major agricultural soil in the area. Some chemical properties of surface soil samples (0-15 cm) collected from the experimental site include: 5.1 ppm available P, 0.45 %N, 1 meq/100 g soil exchangeable Al and pH 3.7 in KCl.

Detailed characterization of this soil has been provided by Odell *et al.* (1974). Each legume species received three treatments: uninoculated seeds, inoculated seeds with peat-based *Rhizobium* inoculants and uninoculated seeds plus nitrogen fertilizer, applied as urea at the rate of 90 kgN/ha to groundnut and 20 kgN/ha to *Gliricidia* and *Leucaena*.

The inoculants were received from Nitragin, Wisconsin, USA, NifTAL Project, Hawaii, USA and the Soil Productivity Research Laboratory, Zimbabwe. They were applied to the seeds using gum arabic as the sticking agent. Most Probable Number (MPN) counts of rhizobia in the inoculants, carried out according to methods described by Vincent (1970), showed that the inoculants contained an average of 1×10^9 rhizobia/g; the indigenous *Rhizobium* population was 1×10^6 /g soil for groundnut, and 1×10^2 /g soil for both *Leucaena* and *Gliricidia*.

A basal dose of 26.4 kgP/ha and 8.3 kgK/ha was applied to the *Gliricidia* and *Leucaena* plots. The groundnut plots received a basal dose of 13.4 kgP/ha and 24.9 kgK/ha. The experimental design was a randomized complete block (RCB) replicated four times. Groundnut was harvested at physiological maturity 120 days after planting (DAP); dry matter yield and nodulation of *Leucaena* and *Gliricidia* were assessed one month after planting (MAP) and height of the trees was measured at 6 MAP. Statistical analysis was done by analysis of variance (ANOVA) and statistical comparisons were based on least significant differences (LSDs).

RESULTS***Response of groundnut to inoculation***

Results for the yield and yield components of groundnut to inoculation are given in Table 1. Grain yield ranged from 70.7-118.8 kg/ha, with the highest yield obtained in the nitrogen fertilizer treatment. Inoculation did not significantly increase yield over the uninoculated control. A similar pattern is exhibited for dry matter yield (range: 25.8-37.6 kg/ha) with the highest value obtained in the uninoculated treatment. Nodulation was either the same or better in the uninoculated than the inoculated treatments. Nitrogen had a negative effect on nodulation.

Table 1. Yield and yield components of groundnut (*Arachis hypogea*) with and without inoculation with peat-based *Rhizobium* inoculants

Treatments	Grain yield (kg/ha)	Dry matter yield (kg/ha)	Nod wt. (kg/ha)	Nod no. per plt
Uninoculated	71.4a	37.6a	2.0a	78a
Inoculated (1)*	70.7a	32.1ab	2.0a	60ab
Inoculated (2)	93.1a	25.8b	1.5bc	55b
Inoculated (3)	73.5a	32.8ab	1.6ab	64ab
Urea (90 kgN/ha)	118.8a	35.5ab	1.2c	48b
LSD(0.05)	ns	9.7	0.4	23

*1 = inoculant from NifTAL, Hawaii, USA; 2 = inoculant from Nitragin Company, USA; 3 = inoculant from Zimbabwe (B/1149)

Table 2. Growth and yield of *Gliricidia sepium* with and without inoculation with peat-based *Rhizobium* inoculants

Treatments	Height (cm)	Dry matter yield (kg/ha)	Nod. wt (kg/ha)	Nod no. per plot
Uninoculated	43.6c	11.4ab	1.0ab	14
Inoculated(1)*	100.3a	15.5a	2.3a	26
Inoculated(2)	77.0b	10.5ab	0.9ab	5
Urea (20 kgN/ha)	40.4c	8.5b	0.0b	0
LSD(0.05)	21.5	6.9	6.9	

*1 = inoculant from NifTAL, Hawaii, USA; 2 = inoculant from Zimbabwe (B/1149)

Response of tree legumes to inoculation

Gliricidia sepium: There were significant differences between treatments for all the parameters evaluated (Table 2). Tree growth and dry matter production were highest in the inoculated treatments. The best results were obtained from the NifTAL inoculant with tree height of 100.3 cm and dry matter yield of 15.5 kg/ha. Trees inoculated with this inoculant also gave the best nodulation, with nodulation completely inhibited in the fertilizer treatment.

Leucaena leucocephala: The results on tree growth, dry matter yield, and nodulation are shown in Table 3. Tree height and dry matter yield range from 32.2-49.4 cm and 1.8-3.4 kg/ha, respectively. For both parameters, differences between treatments were not statistically significant, thereby indicating no effect of inoculation; nodulation was very poor in all treatments, with no nodules formed in the presence of nitrogen fertilizer.

Table 3. Growth and yield of *Leucaena leucocephala* (K-28) with and without inoculation with peat-based *Rhizobium* inoculants

Treatments	Height (cm)	Dry matter yield (kg/ha)	Nod. wt (kg/ha)	Nod no. per plt
Uninoculated	38.4a	1.9a	0.2a	1
Inoculated(1)*	41.6a	3.4a	0.4a	2
Inoculated(2)	49.4a	3.2a	0.3ab	2
Inoculated(3)	37.3a	1.8a	0.3ab	2
Inoculated(4)	44.4a	3.0a	0.3ab	2
Urea (20 kgN/ha)	32.2a	2.5a	0.0b	0

*1 = inoculant from NifTAL, Hawaii, USA; 2 = inoculant from Nitragin Company, USA; 3 = inoculant from Zimbabwe (S/1437); 4 = inoculant from Zimbabwe (S/1439)

DISCUSSION

Some primary characteristics of indigenous *Rhizobium* populations that affect inoculation responses are population density, effectiveness, and competitive ability. In greenhouse studies, Singleton and Tavares (1986) demonstrated that statistically significant inoculation responses can be eliminated where there are as few as 20 indigenous rhizobia/g soil as long as the population contains some effective strains. Thies *et al.* (1991a, 1991b) showed that yield enhancement with inoculation decreases dramatically with increasing numbers of indigenous rhizobia.

The inoculation responses reported here conform with the aforementioned literature. The population density of the indigenous *Rhizobium* population in the Njala soil range from 1×10^2 /g soil for *Leucaena* and *Gliricidia* to 1×10^6 /g soil for groundnut. This is a high enough population to mask the effect of inoculation in *Leucaena* and groundnut. In *Gliricidia*, where

the population of the indigenous rhizobia is higher than the inoculant rhizobia, the response to inoculation demonstrated is probably due to the higher efficiency and competitive ability of the introduced strains.

Strains within populations of rhizobia differ significantly in their symbiotic effectiveness. These differences were exhibited between inoculants containing similar strains from various sources, e.g., the superior performance of the inoculant from NifTAL over the one from Zimbabwe on *Gliricidia*.

The nodulation of *Gliricidia* and *Leucaena* was poor and largely variable; within the same replicate, nodules frequently developed on one plant but not the others. Reddell *et al.* (1986) made similar observations in nine *Allocasuarina* species grown in a field in Australia. These authors suggested that perhaps some species of *Allocasuarina* are sensitive to small variations in site conditions which govern their predisposition to infection by their microsymbiont *Frankia*. This is probably a plausible explanation for the observation found for *Gliricidia* and *Leucaena* in the Njala soil. There was a negative effect of nitrogen fertilizer on nodulation, an observation that conforms with the well-known fact of the inhibitory effect of nitrogen fertilizers on the nitrogenase enzyme responsible for symbiotic nitrogen fixation.

The conclusion, based on the results reported here, is that seed inoculation of groundnut and *Leucaena* is not needed, whereas the seeds of *Gliricidia* need to be inoculated before planting on the Njala upland soil series in Sierra Leone. Future studies should focus on strain selection to improve nodulation of *Leucaena* and *Gliricidia*, inoculation studies to cover a wider spectrum of other important legumes in the country, competition for nodule occupancy by inoculant and indigenous *Rhizobium* strains and production and use of inoculants using local carrier materials. Results obtained from such studies would enhance the future use of *Rhizobium* as a low-cost biofertilizer for legume production in Sierra Leone.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to gratefully acknowledge the following: UNESCO for providing funds under the project RAF/88/001 "African Network of Microbiological Resource Centres-Biofertilizer Production and Use", The International Foundation for Science for funds provided under research grant No. D/0726-2, The International Atomic Energy Agency for the use of their computer facilities and Mr David Suale for carrying out the field work and data collection.

REFERENCES

- Amara D.S. (1987). Evaluation of *Gliricidia sepium* for agroforestry in Sierra Leone. In: *NFTA 1987 Gliricidia sepium (Jack) Walp: Management and Improvement*. Proceedings of a workshop held at CATIE, Turrialba, Costa Rica, June 1987. Nitrogen Fixing Tree Association Special Publication 67-01.
- Odel R.T., Dijkerman J.C., Van Vuure W., Melsted S.W., Beavers A.H., Sutton P.M., Kurtz L.T. and Miedema R. (1974). *Characterization and management of soils in selected regions in Sierra Leone*. Bulletin No. 4, Njala University College.

- Reddell P., Rosbrook P.A., Bowen G.D. and Gwaze D. (1988). Growth responses in *Casuarina cunninghamiana* plantings to inoculation with *Frankia*. *Plant and Soil* 108: 79-86.
- Singleton P.W. and Tavares J.W. (1986). Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous *Rhizobium* populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1013-1018.
- Thies J.E., Singleton P.W. and Bohlool B.B. (1991a). Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia in field grown legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 19-28.
- Thies J.E., Singleton P.W. and Bohlool B.B. (1991b). Modeling symbiotic performance of introduced rhizobia in the field by use of indices of indigenous population size and nitrogen status of the soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 29-37.
- Vincent J.M. (1970). *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

EFFECT OF INOCULANT APPLICATION RATE ON NODULATION AND GROWTH OF *GLYCINE MAX* AND *PHASEOLUS VULGARIS* IN A TROPICAL SOIL

Francis B. MWAURA
Botany Department, University of Nairobi
P.O. Box 30197 Nairobi, Kenya

Abstract: *Seeds of soya beans (G. max var. Bosia) and the common bean (P. vulgaris var. Rose.coco) were inoculated with Bradyrhizobium japonicum (NUM 508) et Rhizobium phaseoli (NUM 446) respectively. Three inoculation rates were selected: 100 g inoculant 50 kg seed⁻¹, 100 g inoculant 15 kg seed⁻¹ and 100 g inoculant 5 kg seed⁻¹. Inoculating the soya bean seeds resulted in root nodulation and improved vegetative growth of the plants. The highest nodulation (0.20 g nodule d.w. plant⁻¹) and plant dry matter yield (5.4 g d.w. plant⁻¹) were recorded at the highest inoculation rate; while the lowest nodulation (0.11 g nodule d.w. plant⁻¹) and plant dry matter yield (4.0 g d.w. plant⁻¹) were recorded at the lowest inoculation rate among the inoculated treatments. Uninoculated soya bean plants had no nodules and had the lowest plant dry matter yield (2.6 g. d.w. plant⁻¹). No significant increases in nodulation and plant growth were recorded among the inoculated common bean plants compared to the control plants.*

Résumé: *Bradyrhizobium japonicum (NUM 508) et Rhizobium phaseoli (NUM 446) ont été inoculés respectivement à des semences de soja (Glycine max) variété Bosia et au haricot commun (P. vulgaris) variété Rose coco. Trois taux d'inoculation ont été appliqués: 100 g d'inoculant pour 50 kg de semences⁻¹, 100 g d'inoculant pour 15 g de semences⁻¹ et 100 g d'inoculant pour 5 kg de semences⁻¹. L'inoculation des semences de soja a provoqué une nodulation racinaire et une meilleure croissance végétative des plantes. Les plus fortes nodulations (0,20 g de nodule, m.s. plante⁻¹) et production de matière sèche (5,4 g m.s. plante⁻¹) ont été observés au taux d'inoculation le plus élevé, et les plus faibles, soit 11 nodules m.s. plante⁻¹, et 4,0 g m.s. par plante⁻¹ au taux le plus bas. Aucune nodulation n'est apparue sur le soja non inoculé dont le rendement en matière sèche était également le plus faible (2,6 g m.s. plante⁻¹). Quant aux haricots communs, on n'a pas constaté d'augmentation significative de sa nodulation et de croissance végétale des plantes inoculées par rapport aux non inoculées. Toutes ces constatations et leurs conséquences sont décrites dans la communication.*

In many developing countries, grain legumes constitute an important source of dietary protein. In East Africa the common bean (*P. vulgaris*) is an important crop and is extensively cultivated. For the smallholder farmer, the common bean is often intercropped with cereals, particularly maize, and possibly plays an important role in the maintenance of soil fertility as a rotation crop. The use of low-cost substitutes like *Rhizobium* inoculants has been accepted eagerly by most farmers due to the rising cost of chemical nitrogen fertilizers. It was previously estimated that nodulated beans may fix up to 55 kg N ha⁻¹ in 120 days in a Kenyan soil (Keya 1977). However, erratic responses to inoculation by common beans (Keya 1977, Kibunia 1991) have prompted the need to investigate nodulation problems of the crop in some of the more important bean-growing areas of the country. In these areas, *Rhizobium* bacteria in the inoculant may face stiff competition from indigenous rhizobia strains in the soil whose numbers may be high due to continuous cultivation of the bean crop. In this study, the effect

of the inoculation rate on nodulation and growth of an exotic legume, soya beans and a popular variety of the common bean were investigated in a local soil. The soil had a history of cultivation of the common bean but no soya beans had previously been sown in it.

MATERIALS AND METHODS

Soil and seed preparation

Soil was collected from a farmer's field in which common beans had previously failed to respond to inoculation. Soil samples from up to a depth of 15 cm were collected from various sites on the field. The samples were pooled, mixed thoroughly and placed in 4.5 l pots with drainage holes at the bottom. Four 50 g seed lots of soya beans and common bean were weighed separately. Three inoculation rates were selected: 0.1 g inoculant 50 g seed⁻¹; 0.33 g inoculant 50 g seed⁻¹ and 1.0 g inoculant 50 g seed⁻¹ which corresponded to 100 g inoculant 50 kg seed⁻¹; 100 g inoculant 15 kg seed⁻¹ and 100 g inoculant 5 kg seed⁻¹ respectively. The inoculants were weighed and the seed lots inoculated by the two-step method (Somasegaran and Hoben 1985) using distilled water as the sticker. Soya bean seeds variety Bosia were inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* (NUM 508 was originally TAL 379) while the common bean seeds variety Rose coco were inoculated with *Rhizobium leguminosarium* bv. *phaseoli* (NUM 446). The inoculated seeds were allowed to dry on clean sheets of paper in the shade.

Rhizobium counts on inoculated seeds

Ten seeds were aseptically taken from each inoculated seed lot using forceps and transferred into universal culture bottles containing 10 ml blanks of sterile distilled water. The bottles were agitated on a shaker to remove the inoculum and serial dilutions were made up to 10⁻⁴. Aliquots (0.2 ml) were aseptically pipetted and spread on yeast extract mannitol agar medium plates containing congo red (Vincent 1970). The plates were incubated for six days at 28°C after which the colonies were counted. The number of rhizobia per seed was then calculated.

Plant growth

Eight seeds were sown in each pot containing watered soil. Each treatment was replicated four times. Uninoculated seeds were similarly sown in pots taking care not to contaminate them with the *Rhizobium* cultures. The pots were transferred to an open area where they were arranged randomly. The plants were thinned to four per pot and grown for eight weeks. They were rarely watered due to the heavy rains that prevailed at that time. At the end of this period, the plant heights were measured and the plants were removed from the pots. The root systems were carefully washed to remove soil and then examined for nodulation. The plant and nodule dry weights were determined after drying the materials to constant weight in an oven at 80°C.

RESULTS

The number of rhizobia cells on the legume seeds after inoculation are shown in Table 1. For both soya beans and common beans, seeds inoculated at the rate of 100 g inoculant 50 kg seed⁻¹ had the lowest rhizobia numbers while seeds inoculated at the rate of 100 g inoculant 5 kg seed⁻¹ had the highest numbers of rhizobia.

Table 1. Rhizobia numbers on soya bean and common bean seeds after inoculation at various rates

Inoculation rate (g inoculant 50 g seed ⁻¹)	Rhizobia numbers seed ⁻¹ (CFU)	
	soya beans	common beans
uninoculated	ND	ND
0.1	7.0 x 10 ²	1.8 x 10 ³
0.33*	1.3 x 10 ³	3.2 x 10 ³
1.0	4.2 x 10 ³	11.6 x 10 ³

ND = not determined

* rate currently recommended locally

0.1 g inoculant	50 g seed ⁻¹ = 100 g inoculant	50 kg seed ⁻¹
0.33 g inoculant	50 g seed ⁻¹ = 100 g inoculant	15 kg seed ⁻¹
1.0 g inoculant	50 g seed ⁻¹ = 100 g inoculant	5 kg seed ⁻¹

Inoculated soya bean plants showed higher growth vigour at all inoculation rates compared to the uninoculated plants.

Among the inoculated soya bean treatments, plants inoculated at the rate of 100 g inoculant 5 kg seed⁻¹ had the largest nodule mass (0.20 g d.wt. plant⁻¹) and the highest dry matter yield increase (107%) compared to the uninoculated control plants (Figure 1). Plants grown from seeds inoculated at the rate normally recommended to the farmers locally (100 g inoculant 15 kg seed⁻¹) had a smaller nodule mass (0.17 g d.wt. plant⁻¹) and a comparatively lower dry matter yield increase (84.6%).

No nodules were present on the roots of uninoculated plants. These plants appeared greenish yellow which contrasted with the deep green colour of the nodulated plants. No noticeable differences in nodulation and plant growth were evident among the common bean inoculated treatments and the uninoculated controls (Fig. 1). The plants appeared stunted and yellowish in colour and had small poorly developed root systems with tiny white nodules. Further examination of the bases of the plant stems indicated that the plant tissue was blackening and dying.

DISCUSSION

The large effective nodules formed on the roots of inoculated soya bean plants may have provided the nitrogen necessary for plant growth in the absence of a good supply of inorganic nitrogen in the soil. The absence of nodules in the uninoculated soya bean plants was consistent with previous findings that there are few or no soya bean nodulating bacteria in soils where the crop has not been previously grown (Dakora 1985). The absence of these bacteria has been seen to represent a unique opportunity to introduce highly effective *Rhizobium* strains without competition from less effective indigenous strains.

The higher nodule weight and plant dry matter yield for soya bean plants inoculated with about three times the recommended rate (100 g inoculant 5 kg seed⁻¹) suggests the necessity by the farmer to use a heavier inoculum load than the one currently recommended (100 g inoculant 15 kg seed⁻¹). It may be necessary to adopt this practice considering that inoculants purchased by the farmer may be stored unrefrigerated for a month or more in the tropics. Rhizobia numbers in the inoculant may drop significantly during this period (Danso and Alexander 1974, Kibunja 1991) resulting in a poorly nodulated crop and a low grain yield.

Responses to inoculation by the common bean in Kenyan soils are known to be erratic. This may be partly due to the presence of high numbers of indigenous *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* in most arable soils with a long history of bean cropping. In certain cases, the majority of these bacteria are ineffective but compete with inoculant bacteria for the nodulation sites. This has been shown previously for other *Rhizobium* species (Obaton 1977). However, in other cases the indigenous bacteria are both competitive and effective and therefore inoculation with similarly effective and competitive bacteria has no significant impact on the growth and yield of the plant. Nevertheless, in this study, small white ineffective nodules were observed on both inoculated and uninoculated plants, which may have been due to the infection by the suspected fungal pathogen at the base of the plant stem.

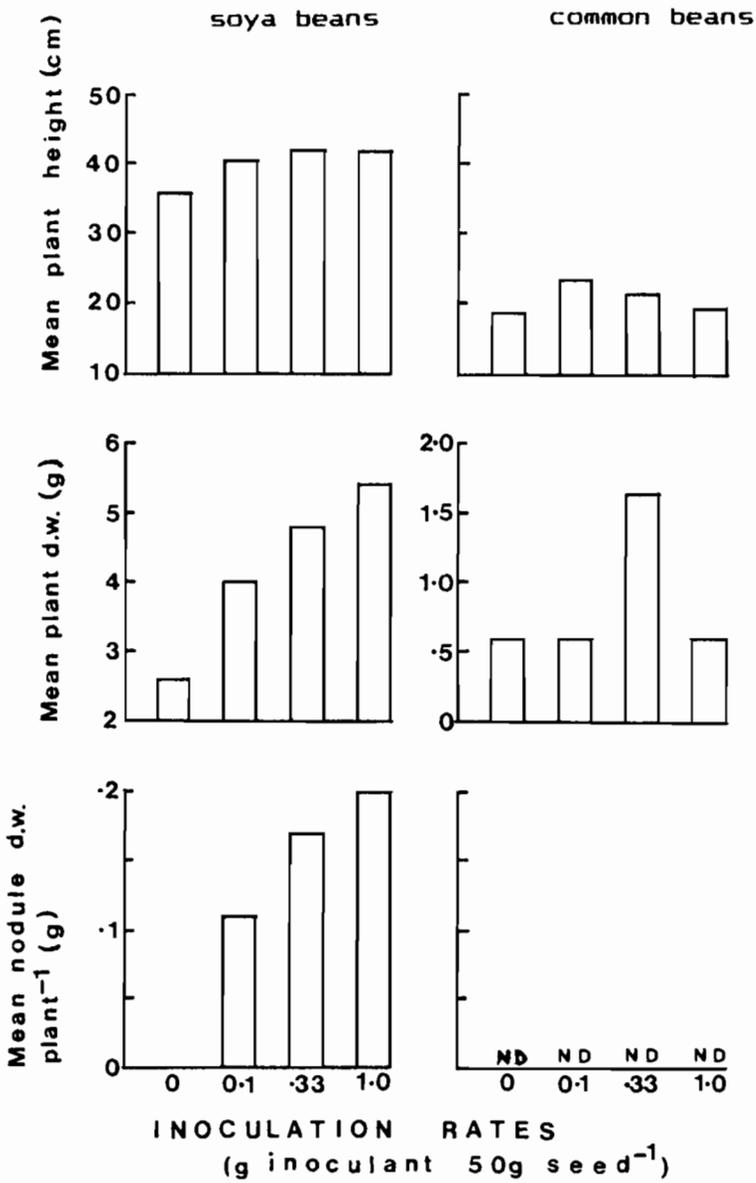
The pathogen apparently ramified and destroyed the plant's conductive tissues which resulted in poorly developed roots and impaired plant function. This subsequently resulted in poor nodule formation and stunted plant growth. The leaves of these plants turned yellow, indicating a lack of adequate mineral supply, particularly nitrogen. This could account for the reported poor grain yield of the common bean in farmers' fields despite inoculation with an effective strain of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*.

The aforementioned results indicate that failure to apply suitable measures to control plant pathogens and other management problems may be partly responsible for the erratic responses of *P. vulgaris* to inoculation in Kenyan soils.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial assistance from the International Foundation for Science is gratefully acknowledged.

Figure 1. Effect of inoculation rate on nodulation and growth of soya beans and common beans in a potted soil. ND = not determined.



REFERENCES

- Dakora F.D. (1985). Biological nitrogen fixation in Ghana. *In: Biological nitrogen fixation in Africa. Proc. of First Conference of AABNF, Nairobi, Kenya.* H. Ssali and S.O. Keya, Eds. The Nairobi *Rhizobium* MIRCEN: Nairobi. pp. 59-71.
- Danso S.K.A. and Alexander M. (1974). The survival of two strains of *Rhizobium* in soil. *Proc. Soil Sci. Soc. Am.* (38): 86-89.
- Keya S.O. (1977). Nodulation and nitrogen fixation in legumes in East Africa. *In: Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics.* A. Ayanaba and P.J. Dart, Eds. John Wiley, New York. pp. 233-243.
- Kibunja M. (1977). A local carrier for *Rhizobium* inoculants in Kenya. MSc Thesis, University of Nairobi.
- Obaton M. (1977). Effectiveness, saprophytic and competitive ability: Three properties of *Rhizobium* essential for increasing the yield of inoculated legumes. *In: Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics.* A. Ayanaba and P.J. Dart, Eds. John Wiley, New York. pp. 127-133.
- Somasegaran P. and Hoben H.J. (1985). Methods in Legume - *Rhizobium* technology. University of Hawaii NifTal Project.
- Vincent J.M. (1970). *A manual for the practical study of root nodule bacteria.* Blackwell Scientific Publications: Oxford.

**INFECTION ET DEVELOPPEMENT DES NODULES DE RACINES
DE LA LEGUMINEUSE SESBANIA ROSTRATA
PAR LA SOUCHE ORS 571 D'AZORHIZOBIUM**

I. NDOYE*, B. DREYFUS** et G. TRUCHET***

*Direction des Affaires Scientifiques Techniques BP 4025 Dakar Sénégal

**Laboratoire de Microbiologie des Sols, ORSTOM BP 1386 Dakar Sénégal

***Laboratoire de Biologie Moléculaire des Relations-Microorganismes
CNRS-INRA BP 27, 31326 Castanet Tolosan Cedex France

Résumé: *La légumineuse tropicale Sesbania rostrata est caractérisée par la présence de nodules fixateurs d'azote non seulement sur ses racines mais surtout sur ses tiges, ce qui lui confère un potentiel fixateur d'azote beaucoup plus élevé que les autres légumineuses connues. Sur le plan appliqué nous avons étudié l'utilisation agronomique de S. rostrata. Pendant plusieurs années, des expériences ont été conduites en milieu paysan, en Casamance en utilisant S. rostrata comme engrais vert en riziculture. Grâce à la mise au point de méthodes et techniques d'inoculation au champ, à la maîtrise des meilleures conditions de culture de cet engrais vert, nous avons fait passer en rizières paysannes, sur plusieurs années, le rendement du riz de 1,7 à 4 tonnes par hectare sans aucun apport d'engrais azoté. Nous avons montré que S. rostrata utilisée comme engrais vert pouvait pratiquement remplacer les engrais azotés dans la riziculture sénégalaise, d'où l'intérêt de développer à plus grande échelle le transfert de cette technologie au niveau du paysan. Sur le plan fondamental nous avons montré, par les techniques de cytologie et de microscopie photonique et électronique, les différentes phases de la formation d'un nodule d'une légumineuse tropicale. C'est ainsi que l'infection chez S. rostrata est caractérisée par un mode d'infection comportant une invasion intercellulaire par les bactéries suivie de la formation de poches d'infection intercellulaire et de cordons d'infection à partir de ces poches. De plus, nous avons observé 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 chez aucune autre légumineuse.*

Abstract: *Sesbania rostrata, a tropical legume, is characterized by nitrogen-fixing nodules on both the roots and stems, which gives it much greater nitrogen-fixing potential than other legumes. The use of S. rostrata in agriculture was studied. On-farm experiments were conducted for several years in Casamance, using S. rostrata for green manure in rice cultivation. By using finalized inoculation techniques in the field, and by optimally including this green manure in farming practices, rice production has risen over the years from 1.7 to 4 tons per hectare, without adding nitrogen-enriched fertilizers. We showed that when S. rostrata is used as green manure, it could practically replace nitrogen fertilizers in the Senegalese ricefields. It is important for farmers to be made aware of this information. Through basic research, and by using photonic and electronic microscopy and cytology, we were able to elucidate the various stages of nodule formation in tropical legumes. Sesbania rostrata infection, thus, is characterized by a mode of infection that includes intercellular invasion by the bacteria and then the formation of pockets of intercellular infection threads of infection that develop from these pockets. We also discovered an original mode of Azorhizobium release in the cytoplasm of the host cell and a type of nodular development that has never before been described for a legume.*

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 initiées 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 cette section, les données relatives à l'infection des légumineuses et au développement des nodules racinaires ou caulinaires sont brièvement présentées.

L'INFECTION

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

Infection par les poils absorbants

Chez les légumineuses tempérées et chez certaines légumineuses tropicales comme le soja (*Glycine max*) (Turgeon and 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. 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 and Truchet 1983, Dazzo *et al.* 1985, Diaz *et al.* 1989).

La déformation des poils adsorbants (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 and Vincent 1976, Bhuvaneshwari and 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, Debelle *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 and 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 d'après ce qui précède, 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 and Bauer 1985).

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 and Allen 1940, Chandler 1978), chez différentes espèces d'*Aeschynomene* (Arora 1954, Napoli *et al.* 1975, Alazard and Duhoux 1988), chez différentes espèces de *Stylosanthes* (Rango Rao 1977, Chandler *et al.* 1982) et chez *Mimosa scabrella* (Farie *et al.* 1988).

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 and 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.

DEVELOPPEMENT DU NODULE

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

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 Verma and Long 1983).

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 and 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 différenciation, 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 and 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.

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 plasmalemma 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 plasmalemma 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.

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'âge différents, les cellules les plus anciennes étant situées le plus près de la racine (Truchet *et al.* 1990, Verma and Long 1983).

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. 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 and 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 and 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.

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 and 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 and Yoshida 1979, Yatazawa *et al.* 1984, Vaughn et Elmore 1985, Alazard et Duhoux 1988a) et *A. afraspera* (Alazard et Duhoux 1988a, 1988b).

L'infection

Dans tous les cas étudiés, l'infection des légumineuses à nodules caulinaires 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 caulinaires décrits dans les paragraphes précédents. Cette pénétration intercellulaire conduit à la formation de poches d'infection intercellulaire où les *Rhizobium* se multiplient activement. 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* (Schaede 1940, Dreyfus *et al.* 1984). 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.

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.

Le nodule mature

Le méristème nodulaire s'accroît progressivement et donne une forme grossièrement sphérique au nodule. Arrivés à maturité, 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. Les nodules caulinaires de légumineuses tropicales sont de type déterminé. Dans la prochaine section, 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.

MATERIEL ET METHODES

Culture de Sesbania rostrata

La stérilisation, le milieu de culture de *S. rostrata*, le mode de culture en tube et l'inoculation ont déjà été décrits (voir Dreyfus et Dommergues 1981).

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:

La fixation: Les échantillons sont préfixés pendant 15' par la glutaraldéhyde (2,75% dans le tampon cacodylate de sodium 0,2 M; pH 7,2). Une fois disséqués, les échantillons sont fixés dans le même fixateur pendant 30' sous vide, puis pendant 1h30' 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, 3 x 1h) puis post-fixés pendant 1h dans une solution de tétroxyde d'osmium (O_5O_4) à 1% dans un tampon cacodylate 0,3M, pH 7,2.

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') précèdent l'imprégnation dans la résine d'inclusion.

Imprégnation dans la résine d'inclusion: La résine d'inclusion choisie est l'Epon 812. Les échantillons sont imprégnés progressivement dans des mélanges oxyde de propylène - résine.

Inclusion dans des gélules et polymérisation: Chaque échantillon déposé au fond d'une gélule est bien orienté. On complète ensuite avec de la résine d'inclusion. La polymérisation des gélules est achevée après 48 h dans une étuve à 60°C.

Microtomie et microscopie

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. 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.

Microscopie électronique: Des sections ultrafines de 70 à 80 nm environ, réalisées au couteau de diamant sont contrastés selon la méthode de Reynolds (1963) par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb. Une fois sèches, les coupes sont observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission HITACHI EM.

Méthode d'éclaircissement

Racines entières: Des racines entières de *Sesbania rostrata* éventuellement préfixées par la glutaraldéhyde 2,75% (15' sous vide puis 15' à la pression atmosphérique) sont éclaircies à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium pendant 15 à 30' 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'), débitées en segments de quelques mm de longueur, montées entre lame et lamelle et observées en microscopie photonique à fond clair.

Sections de nodules: Des sections de nodules de 100 à 300 μm réalisées à l'aide du microcut H1200, sont préfixés par la glutaraldéhyde pendant 15' puis éclaircies à l'aide d'hypochlorite de sodium. Après éclaircissement (15' 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' par le bleu de méthyle (0,01% dans l'eau distillée) avant d'être observés.

RESULTATS

Infection racinaire et développement des nodules

Sites de nodulation et mode d'infection: 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 sont exclusivement localisés à la base des racines secondaires et affectent plus particulièrement le segment de la radicelle enfoui dans le cortex de la racine principale. C'est donc dans la cavité naturelle due à l'émergence d'une radicelle que sont réalisées les conditions propices à l'infection et à la nodulation.

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 1, Fig. 2, 3 et 4).

Après coloration 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. Des coupes semi-fines d'ébauches méristématiques témoignent de ce type d'infection intercellulaire (PL 2, Fig. 5, 6 et 7). 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.

Développement du nodule: L'apparition de boursouflures à la base d'une radicelle est la première manifestation visible de la nodulation. 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 du forme arrondie situé en position interne et formé de cellules de petite taille. 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; ce site, en position centrale, est alors constitué de poches d'infection intercellulaires et de filaments d'infection (PL 3, Fig. 8 et 9). Au cours de ce stade, la

dédiérenciation 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. 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 3, Fig 11).

Le type de développement et l'organisation interne décrits ci-dessus, se confirment dans le temps (48 h à 72 h après l'inoculation). 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 3, Fig. 8 et 11).

C'est au 3^{ème} jour suivant l'inoculation que débute la synthèse de la léghémoglobine. La présence de l'hémo protéine est contemporaine du début de la fixation azotée, qui atteindra son maximum environ 10 jours après l'inoculation (Fig. 1).

L'étude histologique des nodules fixés entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour après l'inoculation, montre le tissu bactéroïdien qui conserve sa forme en corbeille, et le gradient de différenciation cellulaire décrit ci-dessus. Les mêmes caractères d'ensemble s'appliquent aux nodules matures fixés entre le 7^{ème} et 14^{ème} 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.

Différenciation ultrastructurale des cellules végétales et des bactéroïdes

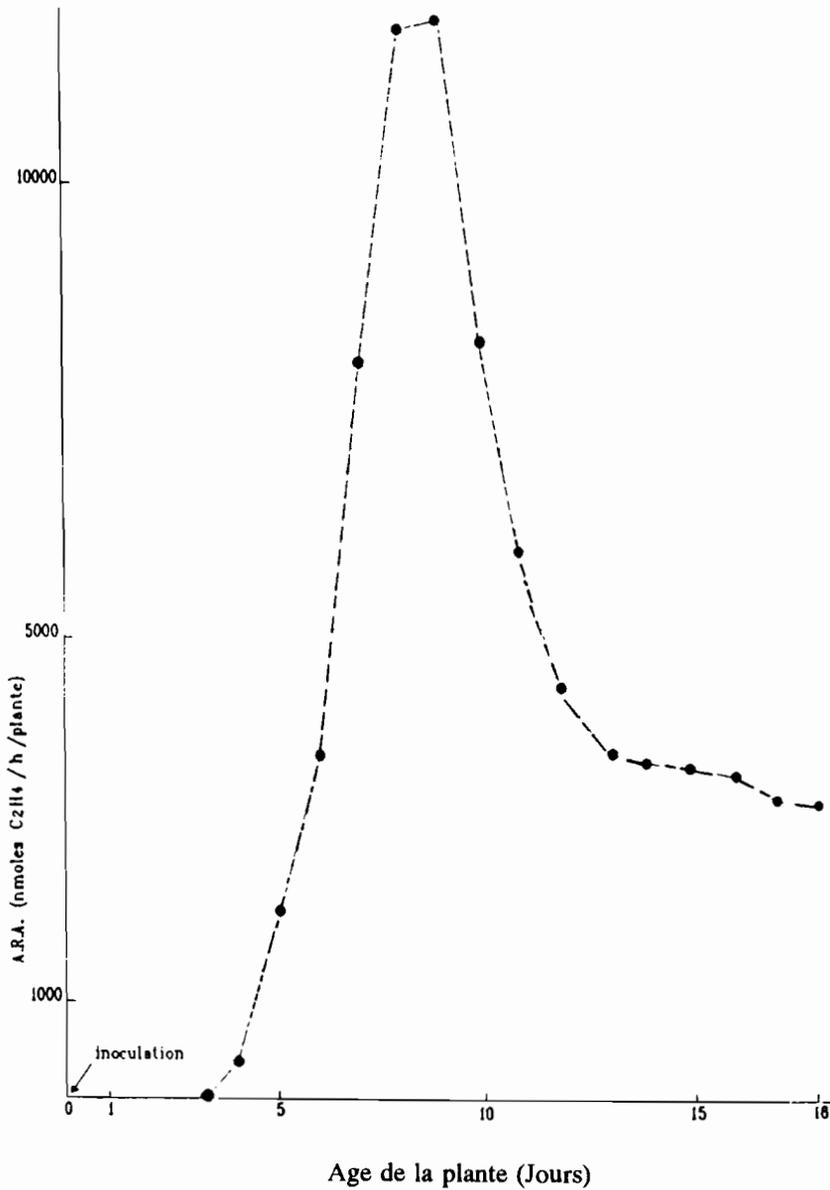
Poches d'infection intercellulaires: Dès les premières heures suivant l'inoculation, les bactéries pénètrent dans la plante hôte au niveau des espaces intercellulaires où elles se multiplient pour former des poches d'infection intercellulaires. Ces poches limitées par les parois des cellules adjacentes, sont essentiellement constituées d'un mucilage dans lequel se trouvent les bactéries. 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.

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 (PL 4, Fig. 12 et 13). Un filament d'infection est délimité par les assises celluloseuses de la paroi végétale qu'il emprunte.

Dans la lumière du filament, les bactéries sont le plus souvent en ligne noyées dans un mucilage dense aux électrons, 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 celluloseuse périphérique, et une réduction du matériel mucilagineux. A cette extrémité, les bactéries d'aspect hétérogène ne sont plus alors séparées du cytoplasme végétal que par le plasmalemme de la cellule hôte.

La libération se traduit donc par l'individualisation de gouttelettes à l'intérieur desquelles, on observe une à plusieurs bactéries qui ne sont plus séparées du cytoplasme végétal que par le plasmalemme (PL 4, Fig. 12 et 13).

Figure 1. Evolution de la fixation d'azote des nodules racinaires de *S. rostrata*



Différenciation du tissu fixateur:

(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. 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 5, Fig. 14 et 15). Notons, dès ce stade, la présence de cellules végétales envahies par les bactéries et d'autres exemptes de toute invasion (PL 5, Fig. 15).

(2) La maturation des cellules envahies conduit à trois modifications ultrastructurales d'importance. On observe une diminution progressive de la densité cytoplasmique en ribosomes, le début de différenciation des bactéroïdes d'aspect plus régulier et qui s'allongent et l'apparition dans le cytoplasme bactéroïdien de granules de polyphosphates très osmiophiles. 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. 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.

(3) La troisième étape de différenciation se caractérise également par plusieurs critères ultrastructuraux. Du point de vue végétal, la cellule hôte, très large et de forme généralement arrondie, est alors entièrement envahie par les bactéroïdes.

Du 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 et la concentration à nouveau de plusieurs bactéroïdes par sac pér bactéroïdien dont le profil en "rosace" est alors caractéristique. 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 accumulant de larges gouttelettes de PHB et des inclusions denses de polyphosphate (PL 6, Fig. 16 et 17).

DISCUSSION

L'organogénèse des nodules racinaires de *S. rostrata* induits par l'*Azorhizobium* ORS 571 se subdivise en trois phases principales: une phase d'infection intercellulaire des *Azorhizobium*, une phase d'induction méristématique, une phase de maturation. 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*.

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 *S. rostrata*, les sites de nodulation sont prédéterminés. Cela paraît être également le cas d'autres légumineuses tropicales comme *Aeschynomene afraspera* (Alazard and 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* (Schaefer 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 and Bauer 1985) où il coexiste toutefois avec la voie classique d'infection par filaments d'infection au niveau des poils absorbants (Turgeon and 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. 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", phénotype Hac.). (Le trèfle [Gourret 1975], le pois [Kijne 1975, Truchet 1976], la luzerne [Vasse and Truchet 1984]...) et de légumineuses tropicales à nodules caulinaires (*S. rostrata* [Tsien et al. 1983, Duhoux 1984], *Neptunia oleracea* [Schaefer 1940]) ou à nodules racinaires (*Glycine max* [Bauer 1981, Pueppke 1983], *Vigna unguiculata* [Pueppke 1983]). 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.

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. Des modes de libération différents ont toutefois été décrits chez d'autres légumineuses et essentiellement chez les légumineuses tropicales. Ainsi chez *Arachis hypogea* (Allen and Allen 1940, Chandler 1978), *Stylosanthes* (Chandler *et al.* 1982), *Aeschynomene* (Arora 1954, Napoli *et al.* 1975, Vaughn and 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 and 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 racinaires de *S. rostrata*, un mode intermédiaire semble exister. Comme chez *Vigna*, les gouttelettes d'infection ont été observées. Contrairement au mécanisme observé chez *Vigna*, le processus final de libération par endocytose n'a pas été observé, dans le cas des nodules racinaires 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 and Harkes 1973, Newcomb *et al.* 1979) et la luzerne (Truchet *et al.* 1980).

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).

PLANCHE 1

Fig. 2, 3 et 4: Infection de la racine de *Sesbania rostrata* par la souche d'*Azorhizobium caulinodans* ORS 571.

Fig. 2. Infection à la base d'un poil absorbant (astérisque) en contact avec un autre cellule hors du plan de mise au point (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. 2 et 4] ou après éclaircissement [fig. 3]).

(Grandissements: Fig. 2: x 370; Fig. 3 x 340; Fig. 4 x 160).

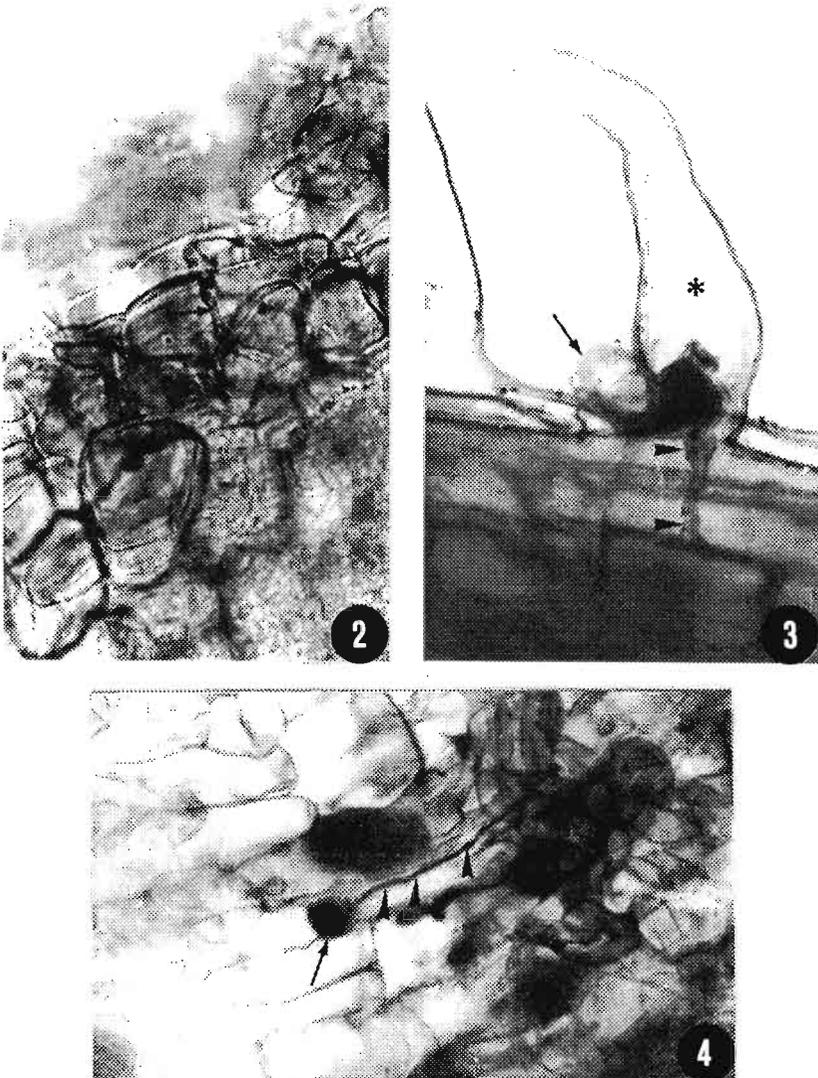


PLANCHE 2

Fig. 5, 6 et 7: Infection intercellulaire de *Sesbania rostrata* par *Azorhizobium caulinodans* 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).

(Grandissement: Fig. 5: x 450; Fig. 6 x 500; Fig. 7 x 500).

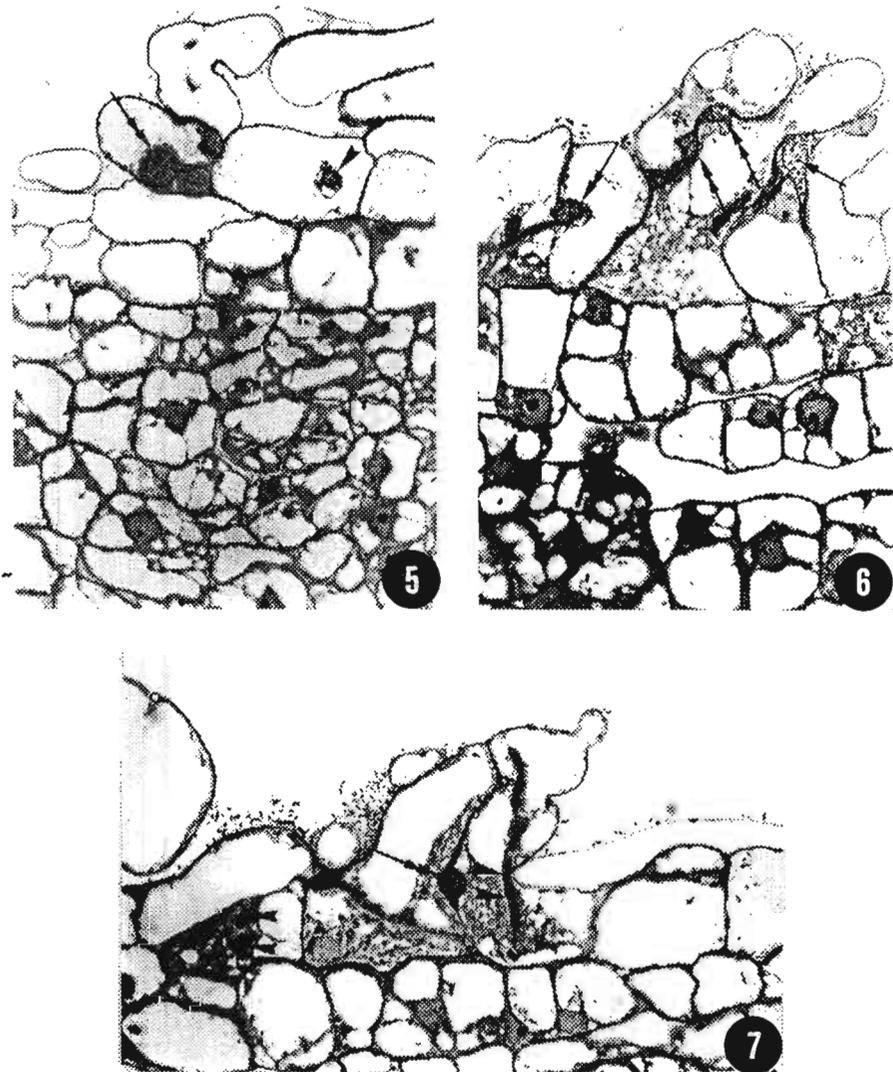


PLANCHE 3

Fig. 8, 9, 10, 11: Développement nodulaire (48 à 72 h après l'inoculation).

Fig. 8. Goulet central d'infection (large flèche) et tissu central envahi (astérisque).

Fig. 9. Agrandissement de la figure 8. Goulet central et filament d'infection dans le tissu central.

Fig. 10. Essaimage du réseau infectieux.

Fig. 11. Différenciation centrifuge. Les cellules méristématiques périphériques (flèches) et les traces vasculaires tout autour du nodule (têtes de flèches) sont visibles.

Fig. 8 et 10. Sections de 100 μm , éclaircies par l'hypochlorite de sodium et colorées par le bleu de méthylène).

(Grandissements: Fig. 8 x 60; Fig. 9 x 120; Fig. 10 x 300; Fig. 11: x 70).

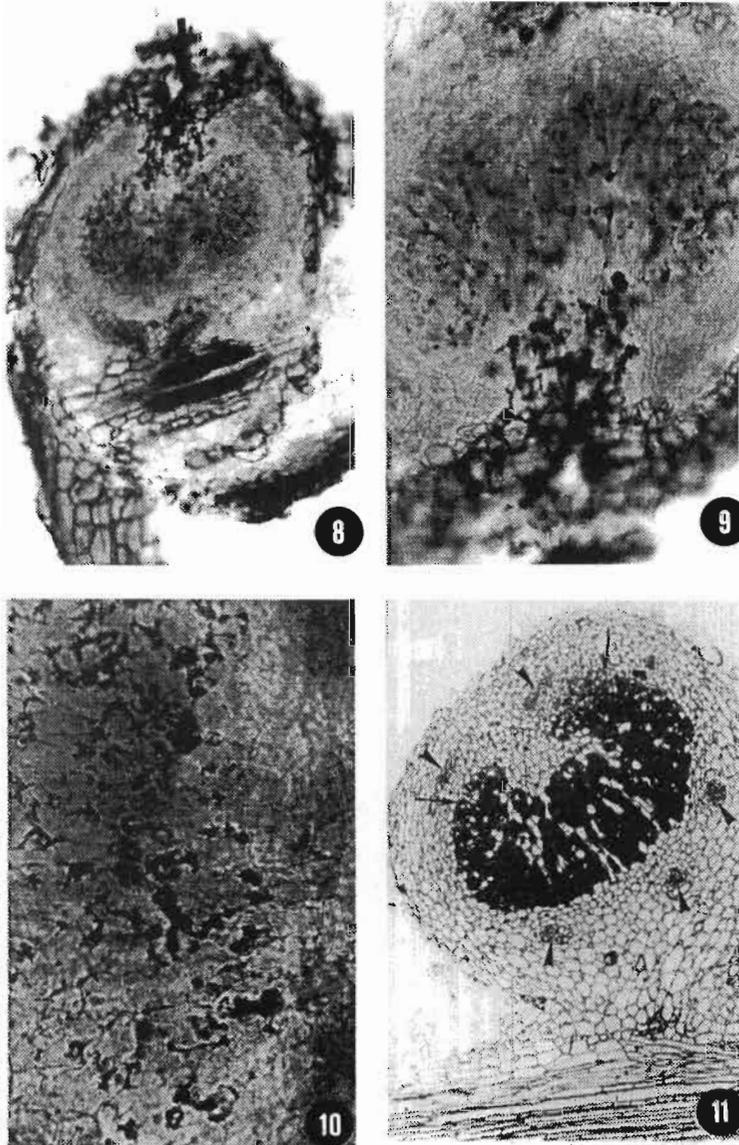


PLANCHE 4

Fig. 12 et 13: 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. 12 x 7000; Fig. 13: x 7000).

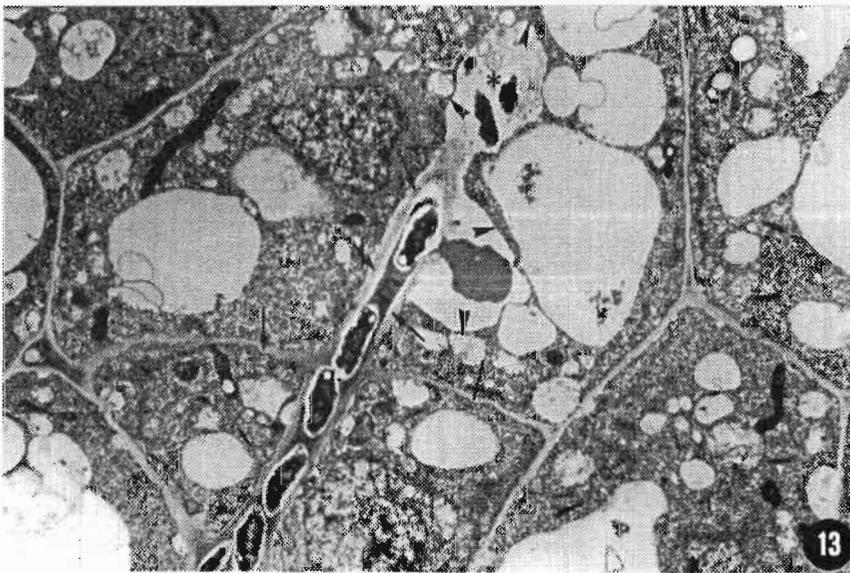
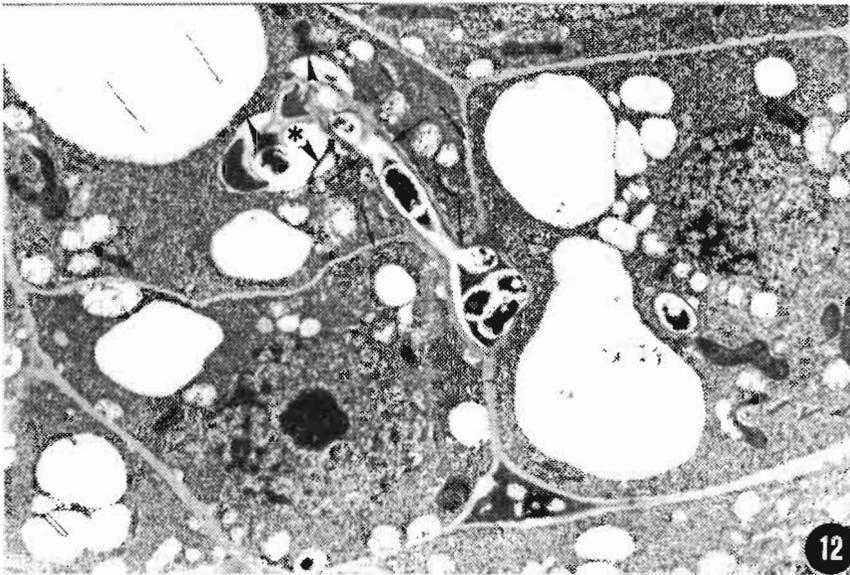


PLANCHE 5

Fig. 14 et 15: 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. 14) et la présence d'une cellule non envahie (astérisque) au milieu des cellules à bactéroïdes (Fig. 15).
(Grandissements: Fig. 35: x 5000; 36 x 7000).

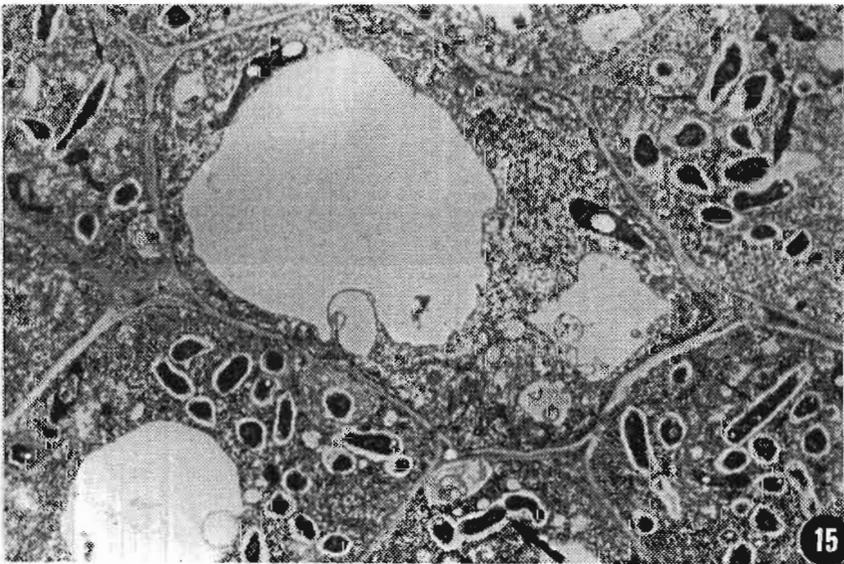
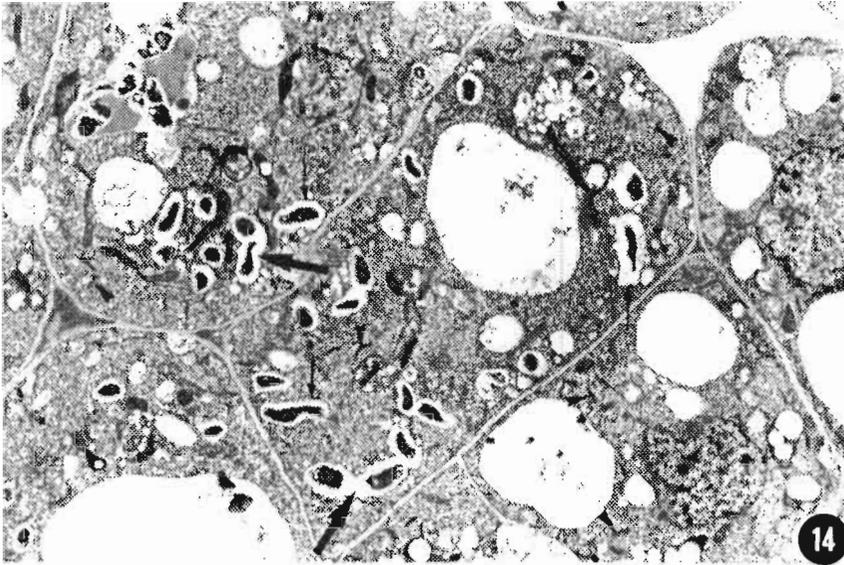
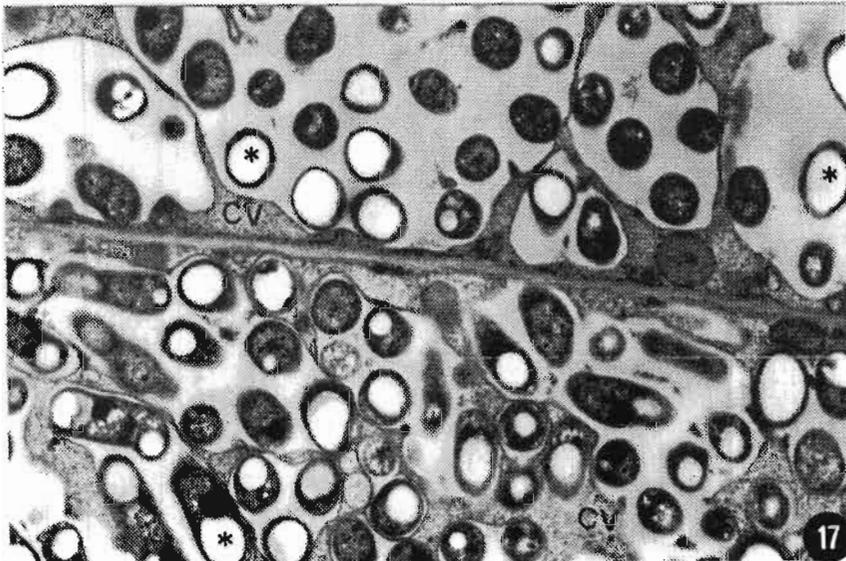
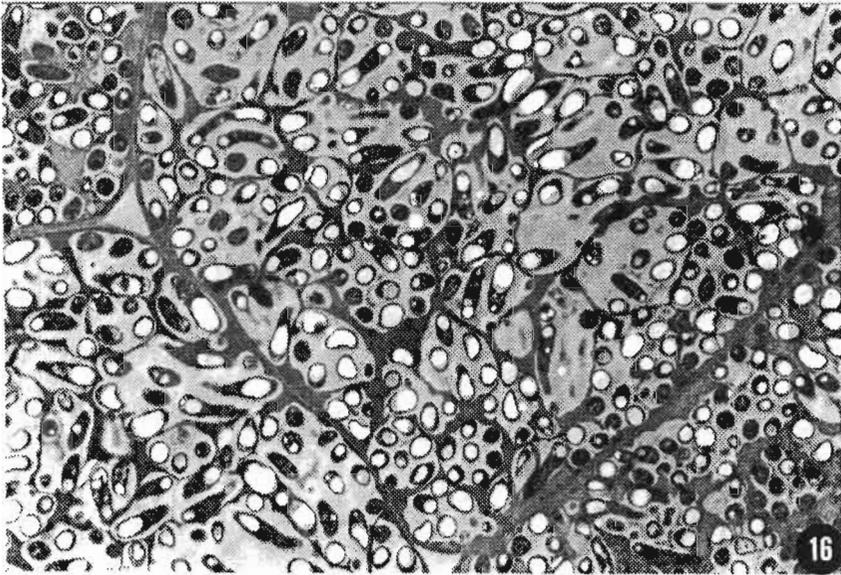


PLANCHE 6

Fig. 16-17: Différenciation du tissu fixateur (nodule mature de 14 jours). On remarque la présence de sacs pér bactéroides renfermant de très nombreux bactéroides, l'accumulation de poly- β -hydroxybutyrate (astérisque) et de polyphosphate (sous forme de gouttelettes électriquement denses) au niveau des bactéroides (fig. 17) et la réduction de la densité ribosomique du cytoplasme végétal (CV).

(Grandissements: Fig. 16: x 6000; Fig. 17: x 16 000).



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. Les nodules racinaires de *S. rostrata* présentent des caractéristiques de développement à la fois de nodule de type indéterminé et déterminé des types.

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 radicaires 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.

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 uréides.

CONCLUSION

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 les gouttelettes d'infection s'échappent 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 pourrait ainsi voir à quel stade ces mutations provoquent des arrêts dans le programme de développement des nodules racinaires de *S. rostrata*.

DEUXIEME PARTIE: BILAN DE 5 ANNEES D'EXPERIMENTATION SUR L'UTILISATION DE *SESBANIA ROSTRATA* COMME ENGRAIS VERT EN RIZICULTURE EN MILIEU PAYSAN CASAMANCAIS¹

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. Cependant, l'emploi des engrais azotés est souvent limité par leurs prix élevés liées au cours du baril de pétrole, 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 moins coûteuse. L'engrais vert veut dire la pratique de l'enfouissement dans le sol des parties susceptibles de substituer aux engrais minéraux.

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 purpurea*, *Medicago hispida*, *Medicago officinalis*, *Vicia officinalis*, *V. cracca*, *Sesbania*

¹ par Ibrahima NDOYE, MMET/DAST, Chercheur associé au laboratoire de Microbiologie ORSTOM

aculeata, *S. cannabina*, *S. sesban*, *S. paludosa* (Roger and Watanabe 1986, Brewbaker and Glover 1988).

Des progrès ont été enregistrés dans le domaine des engrais verts avec la découverte des légumineuses comme *Sesbania rostrata*, dont la présence de nodules à la fois sur ses tiges et sur ses racines conduit à une nodulation cinq à 10 fois plus importantes que chez la plupart des autres légumineuses qui comme on le sait possèdent seulement des nodules racinaires (Dreyfus and Dommergues 1981). Cela se traduit par une capacité de fixation d'azote très supérieure à celle par exemple, d'autres espèces de *Sesbania* citées plus haut (Ndoye and Dreyfus 1988, Ndoye 1990). *Sesbania rostrata* dont on connaît maintenant l'aptitude à pousser très rapidement dans des sols submergés et à fixer activement l'azote grâce à ses nodules de tige, pouvait donc être envisagée comme engrais vert en riziculture.

Les premiers essais conduits au Sénégal en microparcelles expérimentales de 1m² à 25 m² et dans différents pays d'Afrique, d'Asie et aux Philippines notamment, ont été réalisés dans les conditions très artificielles. Ils ont montré que *S. rostrata* utilisé comme engrais vert en riziculture pouvait doubler le rendement en riz par rapport à un témoin sans engrais et augmentait la teneur en protéines des grains de 37 à 50% par rapport aux teneurs habituelles (Rinaudo *et al.* 1983, Dreyfus *et al.* 1985, Rinaudo et Moudiongui 1985, Camara et Diara 1987, Ladha *et al.* 1988).

En outre, *S. rostrata* présente vis à vis du nématode parasite du riz *Hirsmanniella 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 (International Rice Research Institute) ont confirmé les résultats obtenus au Sénégal à savoir que *S. rostrata* est actuellement 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).

L'Université de Gand en Belgique, la DAST (Direction des Affaires Scientifiques et Techniques au Sénégal) l'ORSTOM (Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération) et l'ISRA (Institut Sénégalais de Recherche Agricole) ont entrepris conjointement des recherches sur cette légumineuse comme engrais vert dans les conditions naturelles de riziculture, en milieu paysan.

L'utilisation de *Sesbania rostrata* comme engrais vert est envisagée avec pour objectif la réduction de lourdes importations de riz par le Sénégal et l'amélioration des rendements de rizières permettant l'autonomie alimentaire du pays. Depuis 1985, un projet utilisation de *S. rostrata* comme engrais vert a donc été mené en Casamance (Sud du Sénégal, région de riziculture traditionnelle où les rizières présentent de graves pénuries en azote. Les expériences ont été réalisées dans un village, Fanghotte.

Les essais en milieu paysan ont eu pour but: de tester la validité de la démarche et de confirmer la valeur agronomique de *S. rostrata* en milieu naturel, de déterminer les techniques de culture qui valorisent le mieux cette légumineuse, d'identifier les contraintes liées à l'introduction de cette biotechnologie dans les habitudes et pratiques culturelles des agriculteurs et éventuellement de trouver des solutions aux problèmes liés à l'emploi des engrais verts.

Fig 1. Utilisation de *S. rostrata* comme engrais vert (Plan de l'expérimentation)

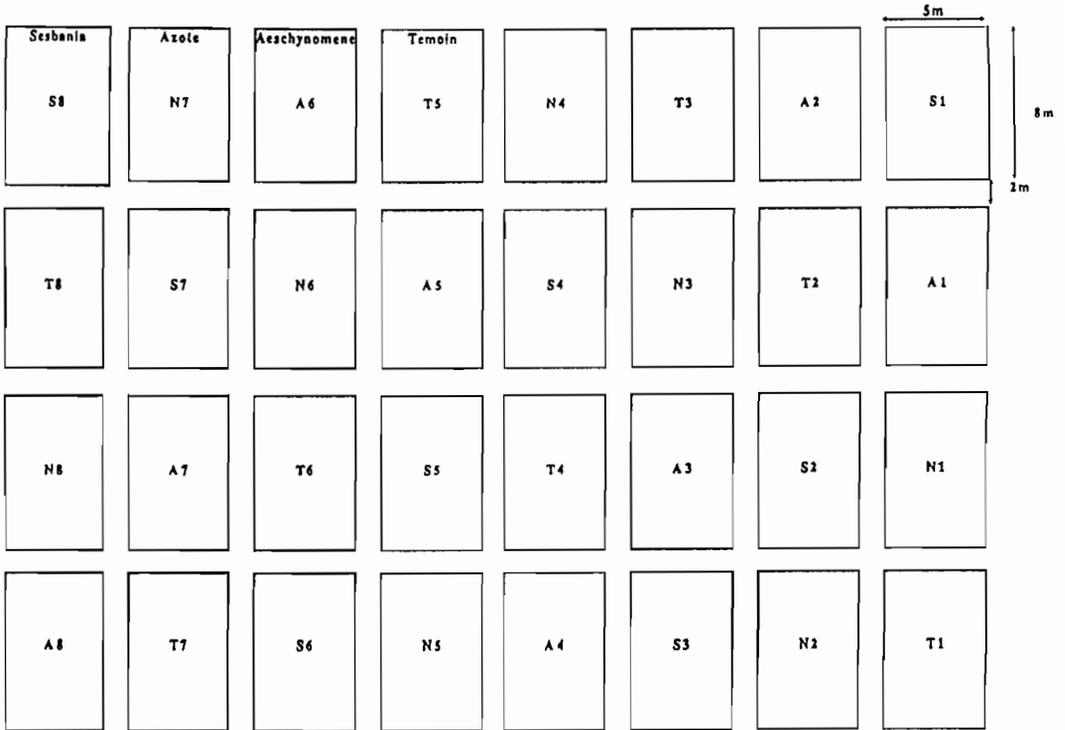


Tableau 1. Principales caractéristiques chimiques de sols de rizières de Fanhote (Casamance)

pH		Fertilité				Bases échangeables mé/160 g				
H ₂ O	KCl	C %°	N %°	C/N total %°	P ₂ O ₅ (Olsen) %°	P ₂ O ₅	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

MATERIEL ET METHODES

Essais en parcelles expérimentales

Dispositif expérimental (Fig. 1): C'est un dispositif en bloc à randomisation totale avec quatre traitements et huit répétitions sur un total de 32 parcelles élémentaires. La surface d'une parcelle est de 8 m x 5 m = 40 m².

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.

Analyse des sols (Tableau 1): 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.

Fumures minérales (Tableau 2): La fumure phosphopotassique est épandue 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 P₂O₅ et de 50 unités de K sous forme de K₂O. La fumure minérale azotée, sous la forme d'urée répandue 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 (1½ mois plus tard).

Tableau 2. 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 Signifie 32 unités de P₂O₅ en 2 apports

60/3 Signifie 60 unités de P₂O₅ en 3 apports

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

Essais en milieu paysan

Les dispositifs et les traitements se résument à: (1) parcelles témoins sans enfouissement de l'engrais vert *S. rostrata* et (2) parcelles témoins avec engrais vert *S. rostrata* inoculé et enfoui. Pour ces essais en milieu paysan, aucune fumure minérale n'est apportée.

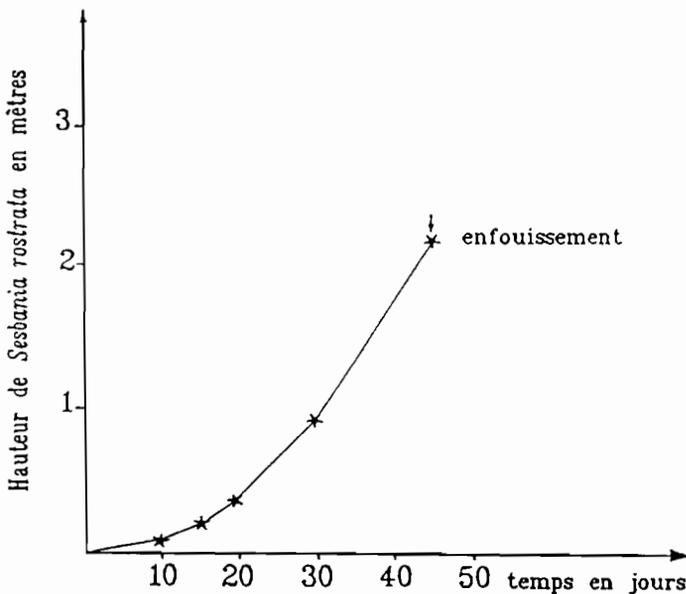
Culture des légumineuses

Préparation des graines: Afin d'obtenir une bonne germination, les graines sont préalablement scarifiées. Le traitement mécanique consiste à ajouter du sable silicieux 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.

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 15-20 jours après le semis, à l'aide d'un pulvérisateur à insecticide par pulvérisation de l'inoculum sur la tige des légumineuses (Fig. 2).

Figure 2. Croissance de *Sesbania rostrata* avant enfouissement



Culture du riz

Préparation d'une pépinière

Une pépinière de riz est mise en place environ 20 jours après le semis des graines de légumineuses. La variété de riz utilisée est: IRRI 1529.

Enfouissement des légumineuses

Après 35-45 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 10-20 cm 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.

Repiquage du riz

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

Désherbage

Les opérations de désherbage sont manuelles; elles intéressent l'ensemble des traitements et sont laissées à l'appréciation des paysans.

Récolte du riz

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.

Modalités d'insertion de *S. rostrata* en riziculture

Deux principales modalités d'insertion sont étudiées: culture séquentielle de *S. rostrata* et du riz comme indiqué ci-dessus (1985-1986-1987-1989-1990) et culture simultanée du riz et de *S. rostrata*, *S. rostrata* étant introduite en interligne et enfouie au bout de quatre semaines après le semis (1988).

Prélèvements et observations: Prélèvement de sol (échantillon moyen) en début d'essai, observation de la nodulation de tige et mesure de la croissance de *S. rostrata*, détermination

du nombre de plantes de *S. rostrata* à l'hectare (échantillonnage moyen), détermination des poids frais et secs des parties aériennes de plantes par mètre carré avant l'enfouissement de *S. rostrata*, prélèvement d'échantillons de plantes pour analyse de N, éventuellement prélèvement des tiges et feuilles de riz pour analyse de N, et prélèvement de sol en fin d'essai pour analyses agronomiques par traitement.

RESULTATS

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

Sesbania rostrata double les rendements du riz. En ce qui concerne les essais en parcelles expérimentales, les essais agronomiques réalisés pour la première année en 1985 ont donné d'excellents résultats. Nous avons obtenu une très bonne croissance des plantes de *S. rostrata* ainsi qu'une nodulation de tige importante.

Au bout de six semaines, *S. rostrata* peut ainsi atteindre une hauteur de deux mètres et produire une biomasse de 37 t/ha et la croissance de *S. rostrata*, illustrée sur la figure 2 peut, dans la meilleure période, c'est à dire après trois semaines de croissance, atteindre 10 cm par jour. L'apport d'azote au sol sous forme d'engrais vert est équivalent à environ 150 kg/ha (Tableau 3).

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 (nodulation défectueuse: problème d'inoculation...).

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 utilisé comme engrais vert (Tableau 3). 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.

Dans les essais en milieu paysan, les dispositifs les plus simples avaient pour but de comparer des parcelles avec l'engrais vert *S. rostrata* et des parcelles témoins sans engrais vert. Ces expériences se sont étendues sur quatre années 1986, 1987, 1988 et 1989 et ont continué en 1990 et 1991. Les *Sesbania* ont été enfouies cinq semaines après le semis en 1986 et 1987 et seulement après quatre semaines de croissance 1988. En 1986, les essais ont été effectués sur une surface de 3000 m².

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 4). La biomasse produite et enfouie est d'environ 25 t/ha et correspond à plus de 100 kg N/ha.

**Tableau 3. Influence de *S. 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	19,83 b	4,9 b
<i>Aeschynomone afraspera</i> (engrais vert)	27	-	9,51 a	2,4 a
Fumure azotée (60 kg/N/ha)			11,55 a	2,9 a
Témoin (sans engrais vert)			8,21 a	2,0 a

Les chiffres (moyennes de huit répétitions) affectés des mêmes lettres ne sont pas significativement différents au seuil de 5% (Test de Newman et Keuls)

En 1987, à Fanghote, les essais ont été effectués sur une surface beaucoup plus grande de 10.000 m² (1 hectare). Au cours de cette année, une nodulation spontanée des tiges de *S. rostrata* limitée à la base de la tige, étant observée, l'inoculation de la souche ORS 571 a été réalisée afin que les plantes puissent exprimer totalement leurs capacités de nodulation et de fixation d'azote.

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*. 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 4). En 1989, les essais ont été effectués sur une surface de 3000 m².

Aucune inoculation n'a été réalisée, la nodulation des tiges ayant été satisfaisante en 1988. Le rendement de 1,8 t/ha dans la parcelle témoin, à 4 t/ha dans la parcelle avec engrais vert, a montré un gain de 122% (Tableau 4).

Tableau 4. Influence de *S. rostrata* comme engrais vert sur le rendement du riz: Essais en milieu paysan

Traitements	Rendement T/ha Fanghote			
	1986*	1987	1988**	1989
<i>Sesbania rostrata</i> (engrais vert)	3,2	4,3	3,4	4
Témoin (sans engrais vert)	1,7	2,2	2,1	1,8

* La biomasse de l'engrais est de 25 t/ha et l'équivalent en azote enfoui de 110 kg/ha.

** *S. rostrata* enfoui quatre semaines après le semis.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats de plusieurs années d'expériences au champ, en Casamance sur l'utilisation de *Sesbania rostrata* comme engrais vert en riziculture pluviale ont montré que *S. rostrata* constitue un engrais vert tout à fait exceptionnel dans les sols inondés et en particulier dans les rizières et qu'il était possible de faire passer les rendements en riz de 1,7 t à 4 t/ha dans les conditions de riziculture en milieu paysan.

Dans les périmètres irrigués de la vallée du fleuve Sénégal, les recherches menées en collaboration avec l'ADRAO ont montré que l'enfouissement de *S. rostrata* sans apport complémentaire d'azote minéral engendre un accroissement du rendement en riz de 100% par rapport à des rizières n'ayant pas reçu l'engrais vert. Toutefois, l'obtention d'un rendement optimum nécessite l'apport additionnel modéré d'azote minéral soit 30 kg N/ha après enfouissement de *S. rostrata*, 20 jours après le repiquage du riz. Le rendement en grains est ainsi équivalent à celui obtenu avec la dose de 120 kg/ha préconisée dans la région (Camara et Diara 1987).

Dans tous les cas, l'apport d'engrais vert a été supérieur à 100 kg d'azote à l'hectare. 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 de nos paysans.

Il est probable que l'effet bénéfique de *Sesbania rostrata* qui se traduit par un doublement du rendement des récoltes par rapport aux témoins, ne résulte pas seulement de l'apport de l'azote mais aussi pourrait être lié à l'amélioration des propriétés physiques et techniques des sols, elles-mêmes génératrices d'arrière-effets favorables.

Les résultats présentés ici confirment le potentiel fixateur d'azote élevé de la légumineuse *S. rostrata* et suggèrent que l'engrais vert *S. rostrata* peut être recommandé pour la fertilisation des sols pauvres de nos rizières. De plus, ils illustrent bien l'intérêt des recherches sur l'utilisation de *S. rostrata* comme substitut ou complément à la fumure azotée minérale.

Sesbania rostrata dont l'effet engrais vert est désormais reconnu peut-il passer dans les pratiques culturales paysannes et être utilisée à grande échelle dans la riziculture sénégalaise? 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. Le système rencontre un certain nombre de limites qui restent à améliorer. L'introduction de *S. rostrata* demande donc un effort multidirectionnel, allant de la modification des pratiques culturales à la prise en compte des aspects socio-économiques et socio-culturels.

En Casamance, les premières pluies débutant vers les 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 *S. rostrata* en rizière sans perturber le calendrier traditionnel de la riziculture.

Nos dernières études ont montré que l'enfouissement de *S. rostrata* jusque là préconisé après 45 jours de culture peut être réalisé après 35 jours, ce qui raccourcit le temps d'occupation du sol par *S. rostrata* et facilite le calendrier cultural pour le repiquage du riz. Ce délai supplémentaire donne à l'utilisation de *S. rostrata* davantage de souplesse. La coupe et l'enfouissement de l'engrais vert représentent la partie nécessitant le travail le plus intense.

En Casamance, les paysans ayant l'habitude d'enfourir de grandes quantités d'herbes dans leur rizière avant le repiquage du riz. Une différence de travail minimale entre l'enfouissement des mauvaises herbes ou l'enfouissement de l'engrais serait nécessaire. Cet effort est fait par les paysans qui utilisent, à ce titre leur outillage traditionnel efficace pour traiter de petites surfaces.

L'enfouissement qui est réalisée facilement manuellement sur les parcelles de taille modeste, devient lourd lorsqu'il s'agit de champs plus importants et demande en revanche la mise en place de moyens de mécanisation tractée ou attelée adaptée à la coupe et à l'enfouissement rapide de l'engrais vert dans les rizières.

Les résultats présentés dans ce rapport montrent par ailleurs que les *Azorhizobium* une fois introduites sont capables de coloniser les sols de rizières même dans les cas de sols acides comme ceux de Fanhotte. Cette propriété observée également aux Philippines et en Inde (Ladha *et al.* 1989), 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 fourniture de semences; en effet, les paysans sont actuellement tributaires de l'extérieur pour la fourniture

INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

de graines de *S. rostrata* qui leur parviennent parfois tard, ce qui retarde fâcheusement le calendrier cultural. Les paysans devront garder un certain nombre de plantes jusqu'à leur maturité pour récolter des graines.

Notons, avec l'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. Ils souhaitent continuer la pratique de l'engrais vert à condition qu'ils aient des graines. Il est évident que tous les problèmes que posent le transfert des technologies proposées en milieu paysan sont loin d'être résolus, mais les résultats obtenus soulignent la nécessité de persévérer dans la voie tracée.

A l'avenir, l'utilisation à grande échelle de *S. rostrata* au Sénégal dépendra d'une part, d'une collaboration accrue entre les différents instituts de recherche (ISRA, ORSTOM, ADRAO), les organismes socio-éducatifs et de développement, les groupements villageois 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.

En effet, les excellents résultats des recherches menées au Sénégal sur l'utilisation de cette plante, tant au plan fondamental qu'appliqué, ont été exploités à grande échelle par l'IRRI aux Philippines, en Inde et à Madagascar, où des essais prometteurs sont en cours. Par contre au Sénégal, où la plante a été découverte, le potentiel de cet engrais vert ne nous paraît pas avoir été assez exploité. Un développement à grande échelle, au Sénégal, nous apparaît maintenant indispensable et s'inscrit dans les objectifs du gouvernement.

Pour terminer nous souhaitons répondre à deux questions que peuvent poser l'application de cette nouvelle technologie. La première concerne l'impact des inoculations sur l'environnement. Les souches dont nous préconisons l'utilisation sont des souches sauvages; elles existaient au préalable dans la nature, non seulement à l'état symbiotique, mais aussi à l'état saprophytique. Elles ne sont jamais apparues comme envahissantes et ne semblent pas avoir eu d'impact défavorable sur les composantes des écosystèmes, bien au contraire. En ce qui concerne l'aspect économique des techniques proposées, il n'est pas encore connu de façon définitive.

Tout ce que l'on peut affirmer c'est que le transfert en milieu paysan sera plus facile dans certains milieux que dans d'autres, pour des raisons socio-culturelles et climatiques. Les dépenses correspondant aux inoculations seront relativement faibles car il est probable qu'il ne sera pas nécessaire de répéter souvent ces opérations en raison du fait que les microorganismes concernés survivent assez longtemps dans la plupart des sols.

PERSPECTIVES

En dépit de ses qualités qui ont été clairement identifiées, *Sesbania rostrata* doit faire l'objet d'investigations plus poussées à la fois sur le plan fondamental et sur le plan appliqué.

Les recherches fondamentales devraient concerner les domaines suivants:

- Amélioration des hôtes en ce qui concerne plus particulièrement leur tolérance photopériodique et leur résistance aux pathogènes (notamment nématodes). En effet *S. rostrata* exige des jours relativement longs (13-14 h). Il pousse mal et fleurit précocement lorsque la durée du jour est trop courte. Cette exigence photopériodique constitue une limitation importante à son emploi dans les régions équatoriales, où jours et nuits ont la même longueur.

Une percée majeure serait d'obtenir des lignées non photopériodiques, cet objectif pouvant être atteint: en réunissant une large collection de germoplasme et en effectuant le criblage des espèces les moins sensibles à la durée du jour; en induisant des mutations par irradiation ou application de composées mutagènes pour obtenir des plantes non photodépendantes.

L'utilisation de *S. rostrata* est souvent limitée aux sols submergés en raison de la très grande sensibilité de cette plante aux nématodes appartenant plus particulièrement au genre *Méloïdogyne*. Il serait nécessaire de rechercher des cultivars résistant à ce parasite.

- Transfert de l'aptitude à la nodulation de tige à des légumineuses dépourvues de nodules de tige. Etant donné que *Sesbania rostrata* possède, par rapport à de nombreuses légumineuses, la double supériorité de fixer l'azote activement et de tolérer les doses élevées d'azote combiné dans le sol, on peut être tenté de transférer le caractère de nodulation de tige à des légumineuses n'ayant pas de nodules de tige.

L'obtention récente de mutants de *S. rostrata* sans sites de nodulation devrait dans une première étape faciliter l'étude des gènes spécifiques codant pour cette structure particulière. Dans une seconde étape, il y aurait lieu d'essayer de transférer ces gènes à d'autres espèces du même genre mieux adaptés aux conditions sahéliennes utilisables soit en agriculture soit en foresterie.

- Génétique des souches de *Rhizobium* et *Azorhizobium* associées à *S. rostrata*. Il est également indispensable d'identifier les gènes de *Rhizobium* et d'*Azorhizobium* codant pour l'aptitude à la nodulation de tige non seulement pour améliorer la fixation d'azote de *S. rostrata* mais pour assurer la nodulation et la fixation d'azote de nouveaux systèmes qui pourrait être construits.

Parmi les recherches appliquées que l'on pourrait envisager, il y aurait lieu d'accorder la priorité aux thèmes suivants: comparaison de la fixation d'azote et du potentiel "engrais vert" des différentes espèces ou accessions de légumineuses à nodules de tiges (*Neptunia oleracea*, *Aeschynomene afraaspera* et *Aeschynomene nilotica*), calendrier de l'insertion de ces légumineuses dans les systèmes culturaux en riziculture, techniques d'incorporation au sol des engrais verts et application des engrais phospho-potassiques et même azotés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alazard D. (1985). Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (3): 732-734.

- Alazard D. and Duhoux E. (1987). Nitrogen-fixing stem nodules on *Aeschynomene afraspera*. *Biol. Fert. Soils*, 4: 61-66.
- Alazard D. and Duhoux E. (1988a). Diversity of stem nodulation sites in *Aeschynomene* spp. *Plant Physiol.* 132, pp. 123-125.
- Alazard D. and Duhoux E. (1988b). Stem nodule development on *Aeschynomene afraspera*. *J. Exp. Bot.* (sous presse).
- 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.
- Arora N. (1954). Morphological development of the root and stem nodules of *Aeschynomene indica* L. *Phytomorphology* 4: 211-216.
- Bauer W.D. (1981). Infection of legumes by *Rhizobium*. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 407-409.
- Bergman K., Gulash-Hofee M., Hovestadt R.E., Larosiliere R.C., Ronco P.G. and Su L. (1988). Physiology of behavioural mutants of *Rhizobium meliloti*: evidence for a dual chemotaxis pathway. *J. Bacteriol.* 170: 3249-3254.
- Bhuvaneswari T.V. and Solheim B. (1985). Root hair deformation in the white clover *Rhizobium trifolii* symbiosis. *Physiol. Plant* 63: 25-34.
- Bieberdorf F.W. (1938). The cytology and histology of root nodules of some leguminosae. *J. Am. Soc. Agron.* 30: 375-389.
- 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*. IRRI, Los Banos. pp. 29-44.
- 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.
- Camara I. et Diara H. (1987). Evaluation de la valeur agronomique de *Sesbania rostrata* comme source d'azote en riziculture dans la vallée du fleuve Sénégal. In: *Les arbres fixateurs d'azote. L'amélioration biologique de la fertilité des sols*. ORSTOM (ed.)
- Chandler M.R. (1978). Some observations on the infection of *Arachis hypogaea* L. by *Rhizobium*. *J. Exp. Bot.* 29: 749-755.
- 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.
- Dart P. (1977). Infection and development of leguminous nodules. In: *A treatise on dinitrogen fixation*. Vol. III. R.W.F. Hardy and W.S. Silver, Eds. John Wiley & Sons. New York. 367-372.
- 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.
- 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.
- Dazzo F.B., Hollingsworth R.L., Sherwood J.E., Abe M., Hrabak E.M. et al. (1985). Recognition and infection of clover root hairs by *Rhizobium trifolii*. In: *Nitrogen Fixing Research Progress*. H.J. Evans, P.J. Bottomley, W.E. Newton, Eds. Nijhoff, Amsterdam. pp. 239-245.
- Debellé F., Rosenberg C., Vasse J., Maillat F. Martinez E., Dénarié J. and Truchet G. (1986). Assignment of symbiotic development phenotypes to common and specific nodulation (*nod*) genetic loci of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 168: 1075-1086.
- 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). pp. 343-355.
- 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.
- 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. Let.*, 10: 313-317.

- Dreyfus B.L., Alazard D. and Dommergues Y.R. (1984). Stem-nodulating rhizobia. In: *Current perspectives of Microbiol Ecology*. M.J. Klug and C.A. Reddy, Eds. American Society of Microbiology, Washington D.C. pp. 161-169.
- Dreyfus B.L., Rinaudo G. and Dommergues Y.R. (1985). Observation on the use of *Sesbania rostrata* as green manure on paddy fields. *Mircen Journal* 1: 111-112.
- 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.
- Duhoux E. (1984). Ontogénèse des nodules caulinaires de *Sesbania rostrata* (légumineuse). *Can J. Bot.* 62: 982-994.
- 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.
- Faria S.M., Hay G.T. and Sprent J.L. (1988). Entry of rhizobia into roots of *Mimosa scabrella* Benth occurs between epidermal cells. *J. Gen Microbiol.* 134: 2291-2296.
- 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.
- 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.
- Huber J.D., Parker F. and Odland G.F. (1968). A basic fushin and alkanalised methylene blue rapid stain for epoxy embedded tissue. *Stain. Technol.* 43: 83-87.
- Kato G., Maruyama Y. and Nakamura M. (1981). Involvement of lectins in *Rhizobium* pea symbiosis. *Plant Cell. Physiol.* 22: 759-771.
- 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.
- Kijne J.W., Smit G., Diaz C.L. and Lugtenberg B.J.J. (1986). Attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. In: *Recognition in microbe-plant symbiotic and pathogenic interactions*. B. Lugtenberg, Ed. Springer Verlag Heidelberg and Berlin. pp. 101-112.
- 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*. IRRI, Los Banos. pp. 165-183.
- Ladha J.K., Garcia M., Miyans S., Padre A.T. and Watanabe L. (1989). Survival of *Azorhizobium caulinodans* in the soil *Rhizobium* of wetland rice. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 454-460.
- Lancelle S.A. and Torey J.G. (1984). Early development of *Rhizobium* induced root nodules of *Parasponia rigida*. I. Infection and early nodule initiation.
- 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.
- 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.
- Long S.R. (1989). *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56: 203-214.
- Napoli C.A., Dazzo F.B. and Hubbel D.H. (1975). Ultrastructure of infection and "Common antigen" relationships in *Aeschynomene* (Abstract). *Appl. Microbiol.* 30: 123-131.
- Ndoye I. and Dreyfus B.L. (1988). N² fixation by *Sesbania rostrata* and *Sesbania sesban* estimated using ¹⁵N and total N difference methods. *Soil Biol. Biochem.* 20: 209-213.
- Ndoye I. (1990). Contribution à l'étude de la symbiose entre *Azorhizobium*, *Rhizobium* et *Sesbania rostrata*. Thèse de Doctorat d'Université. Université de Lille, France.
- 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.
- Newcomb W. (1981). Nodule morphogenesis and differentiation. In: *Biology of the Rhizobiaceae*. K.L. Giles and A.G. Atherley Eds. Academic Press, New York. pp. 247-298.
- Newcomb W. and McIntyre L. (1981). Development of root nodules of mungbean (*Vigna radiata*): A reinvestigation of endocytosis. *Can J. Bot.* 59: 2478-2499.

- 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.
- Pariselle A. et Rinaudo G. (1987). Comportement du nématode *Hirschmanniella oryzae* (Van Breda de Haan) dans les racines de la légumineuse *Sesbania rostrata* Brem. *Revue Nématol.* 10(3): 33-336.
- Pariselle A. et Rinaudo G. (1988). Etude des interactions entre *Sesbania rostrata*, *Hirschmanniella oryzae* et les rendements du riz. *Revue Nématol.* 11(1): 83-87.
- 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.
- Rango Rao V. (1977). Effect of root temperature on the infection process of *Lotus* and *Stylosanthes*. *J. Exp. Bot.* 28: 241-259.
- 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.
- Rinaudo G., Dreyfus B.L. and Dommergues Y.R. (1982). Influence of *Sesbania rostrata* as a green manure on the nitrogen content of rice crop and soil. *Soil. Biol. Biochem.* 15: 111-113.
- Rinaudo G., Dreyfus B.L. and Dommergues Y.R. (1983). *Sesbania rostrata* as a green manure rice in West Africa. In: *B.N.F. Technology for Tropical Agriculture*, P.H. Graham and S.C. Harris, Eds. pp. 441-445.
- Rinaudo G. et Moudiongui A. (1985). Fixation d'azote par *Sesbania rostrata*: son utilisation comme engrais vert. *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, 20: 833-849.
- Robertson J.G., Lyttleton P., Bullivant 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.
- 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
- Schaede R. (1940). Die Knollchen der adventiven wasserwurzeln von *Neptunia oleracea* und ihre Bakterien-symbiose. *Planta* 31: 1-21.
- Smit G., Kijne J.W. and Lugttenberg B.J.J. (1987). Involvement of both cellulose fibrils and a Ca²⁺ dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J. Bacteriol.* 169: 4294-4301.
- Trinick M.J. (1979). Structure of nitrogen fixing nodules formed by *Rhizobium* on roots of *Parasponia andersonii*. Planck. *Can. J. Microbiol.* 25: 565-578.
- Truchet G. (1976). Processus séquentiel du développement des nodules symbiotiques de légumineuses. Thèse de Doctorat d'Etat.
- Truchet G. (1978) Sur l'état diploïde des cellules du méristème des nodules racinaires de légumineuses. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* 19: 338.
- Truchet G., Michel M. and Denarié J. (1980). Sequential analysis of the organogenesis of lucerne (*Medicago sativa*) root nodules using symbiotically-defective mutants of *Rhizobium meliloti*. *Differentiation* 16: 163-172.
- Truchet G., Rosenberg C., Vasse J., Camut S. and Denarié J. (1984). Transfer of *Rhizobium meliloti* pSym genes into *Agrobacterium tumefaciens*. Host specific nodulation by atypical infection. *J. Bacteriol.* 157: 134-142.
- Truchet G., Debelle F., Vasse J., Terzaghi B., Garnerone A.M., Rosenberg C., Batut C., Maillet F. and 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Turgeon B. and Bauer W.D. (1985). Ultrastructure of infection thread development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Planta* 163: 328-349.

- 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.
- Vaughn C.K. and Elmore D.C. (1985). Ultrastructural characterization of nitrogen-fixing stem nodules on *Aeschynomene indica*. *Cytobios* 42: 49-62.
- Verma D.P.S. and Long S.R. (1983). The molecular biology of *Rhizobium* - legume symbiosis. In: *Intracellular symbiosis*. K. Jeon, Ed. Academic Press Inc. New York pp. 211-245.
- Vincent J.M. (1980). Factors controlling the legume - *Rhizobium* symbiosis. In: *Nitrogen Fixation*. W.E. Newton and W.H. Orme-Johnson, Eds. Univ. Park Press, Baltimore. pp. 103-129.
- Yao P.Y., Vincent J.M. (1976). Factors responsible for the curling and branching of clover root hairs by *Rhizobium*. *Plant and Soil* 45: 1016.
- Yatazawa M. and Yoshida S. (1979). Stem nodules in *Aeschynomene indica* and their capacity of nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 45: 293-295.
- 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.
- Zaat S.A.J., Van Brussel A.A.N., Tak T., Pees E. and 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: 3398-3391.

RESPONSE OF *GLIRICIDIA SEPIUM* TO RHIZOBIUM AND VA-MYCORRHIZAL FUNGI INOCULATION ON AN ACID SOIL

Akim O. OSUNDE

Department of Soil Science - Federal University of Technology

P.M.B. 65 Minna Nigeria

Abstract: *The effects of inoculation with Rhizobium and VA-Mycorrhizal fungi on plant height, dry matter yield, nodulation, and N and P uptake on Gliricidia sepium were evaluated in a pot experiment using an Ultisol from southeastern Nigeria. Treatments included uninoculated control, inoculation with either Rhizobium or VA-Mycorrhizal fungi, and a dual inoculation with both microorganisms. Results obtained after a 12-week growth period indicated a stronger effect of mycorrhizal symbiosis on plant height and total biomass production compared to that of plant-Rhizobium symbiosis. Dual inoculation with Rhizobium and VA-Mycorrhizal fungi resulted in fewer but larger nodules as well as greater biomass, and higher plant nitrogen and phosphorus content than in the other treatments. These results strongly show that VA-Mycorrhizal fungi can assist Gliricidia sepium to a large extent in the uptake of phosphorus and some inorganic nutrients, and enhance nodulation and growth of the plant under acid soil conditions.*

Résumé: *Les effets d'une inoculation de Rhizobium ou mycorhizes VA sur la taille des plantes, le rendement en matière sèche, la nodulation et l'absorption de phosphore et d'azote de Gliricidia sepium ont été évalués dans un essai en vase de végétation sur un Ultisol du sud-est du Nigéria. Les traitements incluaient: un témoin non inoculé, l'inoculation soit par Rhizobium soit par des champignons mycorrhiziens VA et une double inoculation pratiquée avec les deux microorganismes. Après 12 semaines de croissance, il est apparu que la symbiose mycorrhizienne donnait de meilleurs résultats sur la taille et la production totale de biomasse de la plante que l'association plante-Rhizobium. La double inoculation (Rhizobium + mycorhizes VA) entraînait une augmentation de la taille mais une diminution de la quantité de nodules et s'avérait être le traitement qui assurait à la plante sa plus forte production de biomasse et ses teneurs en phosphore et en azote les plus élevées. Les résultats montrent clairement que les champignons mycorrhiziens VA peuvent aider Gliricidia sepium à absorber du phosphore et quelques substances nutritives inorganiques et stimuler la nodulation et la croissance de la plante sur sol acide.*

An urgent challenge facing agricultural scientists in most developing countries in the tropics is the need to find viable, sustainable and environmentally sound production systems that can meet the requirement of farmers using traditional cultivation practices. In recent years, this need has led to the development of alley farming, an agroforestry technology that involves the cultivation of arable crops between hedgerows of planted leguminous tree species (Kang *et al.* 1981, 1989). The leguminous tree species are usually multipurpose, serving as sources of nitrogen, mulch, browse and fuelwood (Dommergues 1987, Huxley 1983, Wilson and Kang 1981).

Among the many potential leguminous tree species, *Gliricidia sepium* and *Leucaena leucocephala* are most commonly used and have performed excellently in alley farming systems in the tropics (Kang *et al.* 1989). The special features of these trees include fast growth, rapid regeneration, multiple uses, drought and salt tolerance, high nitrogen-fixing

ability and production of a large amount of biomass (Kang *et al.* 1984, NAS 1979). However, establishment, growth and nodulation of these trees as with most other legumes, on acid high P-fixing soils are known to be poor (Kang *et al.* 1989, Marschner 1986, Munns 1976). The inhibition of root growth and phosphorus deficiency in such soils appear to be among the major limitations to the growth of tree legumes, which have a high P requirement for establishment, optimum growth, nodule formation and nitrogen fixation (de Lucena Costa and Paulino 1990a, Wong and Davendra 1983). Acid soils prone to strong phosphate fixation often require extremely high phosphate fertilizer applications in order to alleviate the effects of fixation (Mengel and Kirkby 1987).

A dual symbiosis with vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi and acid-tolerant *Rhizobium* sp. represents an alternative to other methods for increasing vegetative growth and nodulation on acid infertile soils. While an acid-tolerant *Rhizobium* partner is essential for effective nodulation, the VAM fungi forms a bridge between roots and nutrient sites in the soil. Moreover, through hyphal connections, they facilitate the efficient uptake of immobile nutrients (notably P) by host plants, particularly those with restricted root systems.

Recent reports have confirmed the beneficial effects of a combined inoculation with both microorganisms on growth and nodulation of *Leucaena leucocephala* and other tree legumes (Aziz and Habte 1990, de Lucena Costa and Paulino 1990b), Gardezi and Ferrera-Cerrato 1989, Guzman-Plazola *et al.* 1990). However, there is a complete lack of information on the VAM fungi/*Rhizobium* symbiotic affinity of *G. sepium*. The objectives of this study were to assess the effect of VAM and *Rhizobium* inoculation on dry matter yield, nodulation and N and P uptake of *Gliricidia sepium* in an acid soil.

MATERIALS AND METHODS

The soil used for this experiment was an Ultisol collected from Onne, southeastern Nigeria. It is derived from coastal sediments and classified as a sandy clay loam, Typic Paleudult. Some properties of the soil are listed in Table 1. Before the experiment, the soil was air-dried, passed through a 2 mm sieve and sterilized by autoclaving at 100°C for one hour a day for three days. It was then transferred to plastic pots (2 kg soil per pot) and moistened daily with de-ionized water to approximately field capacity.

Seeds of *Gliricidia sepium* were scarified with concentrated H₂SO₄ for 10 minutes and germinated in sterile Petri dishes containing moistened filter paper, prior to planting. The VA-mycorrhizal inocula was made up of 10 g/plant of a crude inoculum which consisted of crushed roots and root fragments of maize plants which were confirmed to be heavily infected with VA/mycorrhizal fungi after they were assessed for mycorrhizal infection following the technique of Phillips and Hayman (1970).

A suspension of a composite mixture of USDA 3489 and USDA 3490 (Nitragin Co. USA) served as the *Rhizobium* inocula. The inocula were placed below the seedling holes at planting time to ensure that all growing roots passed through the inocula layer.

Table 1. Selected properties of a surface soil (0-15 cm) from Onne, Southeastern Nigeria

Sand (%)	71
Silt (%)	4
Clay (%)	22
Organic C (%)	1.4
Total N (%)	0.12
pH (H ₂ O) 1:2	4.84
Available P (ppm) Bray 1	10.1
Exchangeable Cations (meq/100g)	
K ⁺	0.12
Ca ²⁺	0.43
Mg ²⁺	0.18
Al ³⁺	0.9
CEC	2.80

Five uniform seedlings were transferred to each pot and later thinned to three seedlings per pot one week after planting (WAP). The experiment was conducted using a randomized complete block design with three replications. Treatments included Uninoculated control (C), Inoculated with *Rhizobium* (R), Inoculated with VA-mycorrhizal fungi (VAM) and Inoculated with both *Rhizobium* and VA-mycorrhizal fungi (VAM + R). All treatment pots received a starter nitrogen of 20 ppm N as NH₄NO₃. The soil was amended with N-free nutrient solution of the following composition: 3.35 mM Ca(H₂PO₄)₂, 10.75 mM K₂SO₄, 12.5 mM MgSO₄·7H₂O, 1.9 mM Fe (111) NaEDTA, 250 μM H₃BO₃, 45.5 μM MnCl₂·4H₂O, 20.2 μM ZnSO₄·5H₂O and 1.1 μM H₂ MoO₄·H₂O. Once a week, 40 ml of this nutrient solution was applied to all treatment plots throughout the growth period. Plants were harvested at 12 WAP. At harvest, plant shoot height was measured and the plants were cut to ground level. Nodules were detached from roots, cleaned, counted and weighed.

Plant samples were oven-dried at 70°C for 48 hours and the dry weight measurements were determined. The plant samples were analyzed for total nitrogen using the microKjeldahl procedure (Bremner 1965) and for phosphorus by the vanadomolybdate phosphoric-yellow colour method (Jackson 1967). Nitrogen and phosphorus uptakes were computed as the product of the percent nitrogen or phosphorus contents and shoot dry matter yield. The data was subjected to the analyses of variance (ANOVA) using a computer statistical package (Genstat 5) and the LSD 5% was calculated to determine the significance between treatments.

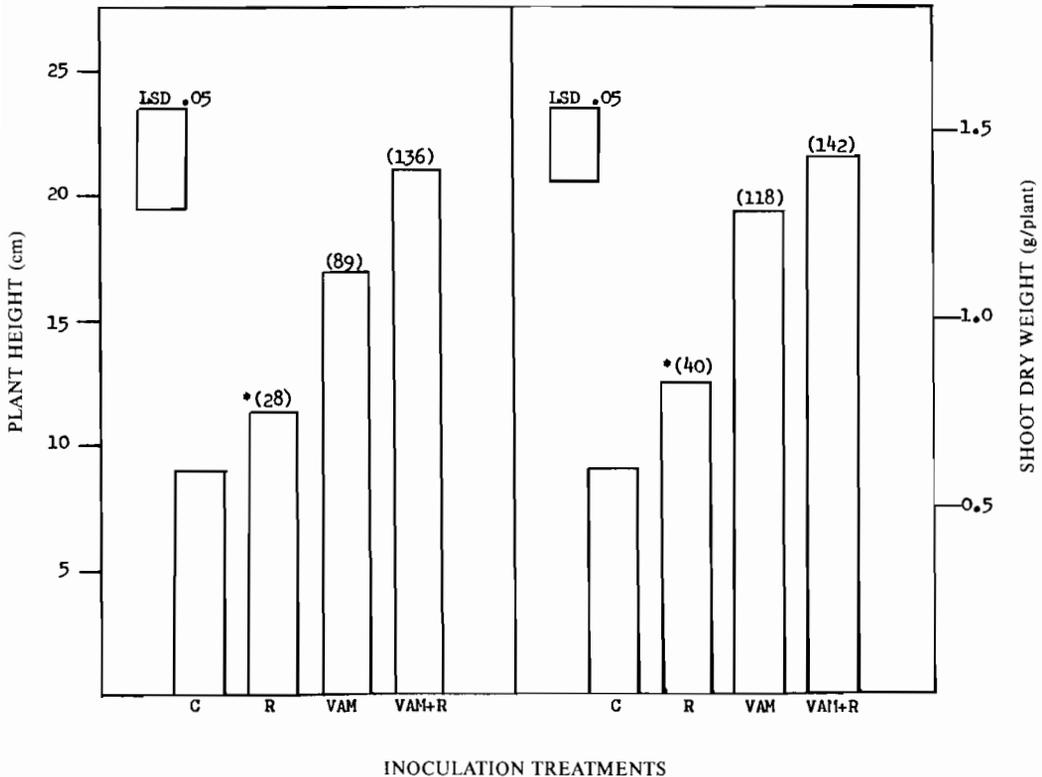
RESULTS

Results obtained from this study indicate a strong effect of mycorrhizal fungi symbiosis of *Gliricidia sepium* growth. While there was no significant difference in plant height between

the uninoculated control and the *Rhizobium* treatment, inoculation with mycorrhizal fungi alone and a combined inoculation with both microorganisms had profound effects on the height of *Gliricidia sepium* seedlings. Inoculation with mycorrhizal fungi and a combined inoculation with mycorrhizal fungi and *Rhizobium* significantly increased plant height by 89% and 136% respectively over the uninoculated control (Figure 1). Plant shoot dry matter yield was nevertheless significantly affected by all inoculation treatments. The lowest shoot dry matter production was observed in uninoculated seedlings. *Rhizobium* inoculation increased shoot dry matter yield by 40%, mycorrhizal fungi inoculation by 118% a dual inoculation with both microorganisms by 142% over the uninoculated control plants (Figure 1).

Figure 1. Mean plant height and dry matter yield of *Gliricidia sepium* seedlings inoculated with *Rhizobium* and/or VA mycorrhizal fungi on an acid soil at 12 WAP

* % increase relative to control



Contrary to results obtained for plant height and shoot dry matter production where the effect of a combined inoculation with mycorrhizal fungi and *Rhizobium* superseded that of sole *Rhizobium* inoculation, the data in Table 2 indicate that *Rhizobium* produced a significantly higher number of nodules per plant than the combined inoculation with both microorganisms. However, the combined inoculation with mycorrhizal fungi and *Rhizobium* increased the nodule weight by 19% over the *Rhizobium* treatment.

Table 2. Number of nodules per plant and nodules fresh weight of *Gliricidia sepium* seedlings inoculated with *Rhizobium* and/or VA-mycorrhizal fungi on an acid soil at 12 WAP

Treatment	Nodules/plant	Relative values (%)	Nodules fresh weight/plant (mg)	Relative values (%)
Control (C)	-	-	-	-
Rhizobium (R)	18.36a*	100	433 a	100
VA-Mycorrhiza (VAM)	-	-	-	-
VA-Mycorrhiza + Rhizobium (VAM + R)	12.6 b	69	498 a	115

* Means within a column followed by the same letter are not significantly different (P = 0.05).

The nitrogen and phosphorus uptake of *Gliricidia sepium* seedlings are shown in Figure 2. Nitrogen and phosphorus uptake were much lower in uninoculated seedlings and those inoculated with *Rhizobium* compared to those seedlings inoculated with either mycorrhizal fungi alone or with a combination of both mycorrhizal fungi and *Rhizobium*. *Rhizobium* inoculation increased nitrogen uptake by only 55 %, while inoculation with mycorrhizal fungi and a combined inoculation with both microorganisms increased it by 103 % and 160 % respectively.

The effect of microorganism inoculation on the phosphorus uptake of *Gliricidia sepium* was much more spectacular. *Rhizobium* inoculation increased phosphorus uptake by 224 %, mycorrhizal fungi inoculation by 861 %, and a combined inoculation with mycorrhizal fungi and *Rhizobium* by 816 % over the uninoculated control treatment.

DISCUSSION

In this study, inoculation of *Gliricidia sepium* seedlings with mycorrhizal fungi had a more pronounced effect on plant height and dry matter yield compared to that of *Rhizobium* inoculation. AV-mycorrhizal fungi inoculation of legume plants has been reported to substantially increase the absorption of phosphorus and other inorganic nutrients and thereby increasing fixation of atmospheric nitrogen, growth and survival of these plants (Bowen and Smith 1981, Daft and El-Giamhi 1975, Mosse 1981). Plant height and above-ground dry weight of *Acacia farnesiana* grown in phosphorus-deficient soils were reported to be

significantly improved by VA-mycorrhizal inoculation (Gardezi *et al.* 1990). Similar results were obtained with *Leucaena leucocephala* (de Lucena Costa and Paulino 1990b, Huang Ruey-Shyang *et al.* 1983) *Sesbania grandiflora* (Habte and Aziz 1985) and *Cajanus cajan* (de Lucena Costa *et al.* 1990).

The observed significant effect of a combined inoculation with mycorrhizal fungi and *Rhizobium* in this soil may be attributed to the synergistic interaction between these two microorganisms. Several other investigations have shown an apparent synergistic interaction between *Rhizobium* and VAM fungi (Chang Kun-Piao *et al.* 1986, de Lucena Costa and Paulino 1990b, Siababa and de la Cruz 1986, Sivaprasad *et al.* 1983). However, Gardezi *et al.* (1988) and Manguiat *et al.* (1990) observed that interaction between *Rhizobia* and VAM fungi on plant biomass production was either negative or non-existent in their respective studies with *Acacia cyanophylla* and *Gliricidia sepium*.

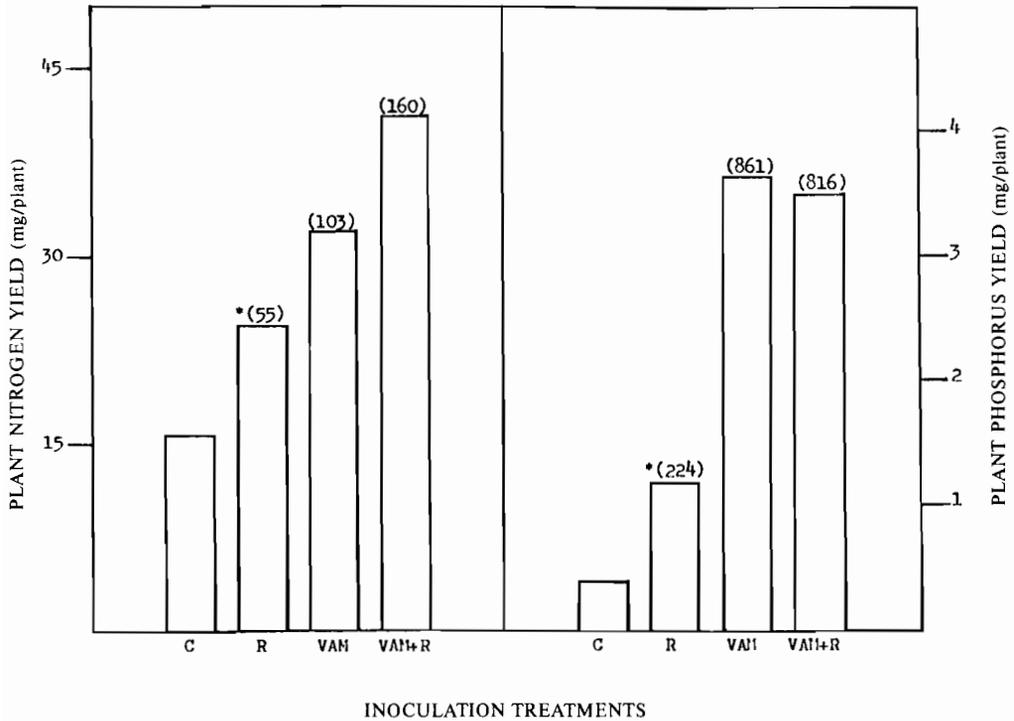
Observations in this study showed that plants inoculated with *Rhizobium* alone had a significantly higher number of nodules per plant than those inoculated with both mycorrhizal fungi and *Rhizobium*, contrary to results obtained by Chang Kun-Piao *et al.* (1986) with *Acacia auriculiformis*, de Lucena Costa and Paulino (1990b), Sivaprasad *et al.* (1983) with *Leucaena leucocephala* and de Lucena Costa *et al.* (1990) with *Cajanus cajan*, whereby combined inoculation with mycorrhizal fungi and *Rhizobium* significantly improved tree legume nodulation over single *Rhizobium* inoculation. However, unlike the *Rhizobium* treatment where quite a number of nodules were small and ineffective, most of the nodules on plants inoculated with the combined mycorrhiza and *Rhizobium* were large with a pinkish tint. These results clearly indicate that mycorrhizal fungi association probably plays a more significant role in the formation of effective nodules under acid soil conditions.

Nitrogen and phosphorus uptake values were markedly increased by each of the inoculation treatments (Figure 2). These results are indicative of the ability of *Rhizobium* to cause an increase in the plant nitrogen yield on one hand, and the ability of mycorrhizal fungi to increase the absorption of phosphorus and other inorganic nutrients, including nitrogen, on the other hand. A dual symbiosis by mycorrhizal fungi and *Rhizobium* was observed in this study, resulting in a higher nitrogen and phosphorus uptake compared to the single *Rhizobium* treatment. This high absorption of nitrogen and phosphorus had resulted in a significant increase in plant dry matter production (Figure 1) which implies that mycorrhiza association helps to complement the growth-promoting effect of *Rhizobium* inoculation, especially in acid-high phosphorus-fixing soil like this. Such positive responses result from the enhanced ability of mycorrhiza-infected roots to absorb and translocate inorganic nutrients, especially phosphate ions, from the soil solution to the root cells through an extensive network of external mycelium (Mosse 1981). *Rhizobium* requires large amounts of phosphorus, an integral part of the ATP molecule which provides the energy for nitrogen fixation.

Generally speaking, this study has shown that a combined inoculation with VA-mycorrhizal fungi and *Rhizobium* could significantly improve growth and nodulation of *Gliricidia sepium* under acid soil conditions. However, further studies are needed to assess these performances under non-sterile field conditions where introduced microorganisms might have to compete with numerous soil pathogens for survival.

Figure 2. Nitrogen and Phosphorus uptake of *Gliricidia sepium* seedlings inoculated with *Rhizobium* and/or VA mycorrhizal fungi on an acid soil at 12 WAP

* % increase relative to control



ACKNOWLEDGEMENTS

The author acknowledges with great appreciation the assistance of Mr Harry Otieno of the ICRAF Research Centre, Maseno, in the statistical analysis of the data, as well as the financial assistance of IFS to participate in this seminar.

REFERENCES

Aziz T. and Habte M. (1990). Growth of transplanted *Sesbania grandiflora* as affected by preinfection of roots with rhizobia and VAM fungus. *Nitrogen Fixing Tree Res. Reports* 8: 121-122.

Bowen G.D. and Smith S.E. (1981). The effects of mycorrhizas on nitrogen uptake by plants. *In: Terrestrial nitrogen cycles*. F.E. Clark and T. Rosewall Eds. *Ecol. Bull.* (Stockholm) 33. 237-247.

Bremner J.M. (1965). Total nitrogen. *In: Methods of Soil Analysis*. Part 2, Chemical and Microbiological Properties. C.A. Black et al. Eds. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. 1149 pp.

- Chang Kun-Piao, Hugh-Tau Hu and Pao-Chang Kao (1986). Effect of Endomycorrhizal Fungi and Rhizobium inoculation on growth of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. Ex. Benth. *Nitrogen Fixing Tree Res. Reports* 4: 40-41.
- Daft M.S. and El Giahmi A.A. (1975). Effect of *Glomus* infection on tree legumes. In: *Endomycorrhizae*. F.E. Sanders et al. Eds. Academic Press, New York. pp. 581-592.
- de Lucena Costa N. and Paulino V.T. 1990a. Response of *Leucaena* to Vesicular - Arbuscular Mycorrhizal Inoculation and Phosphorus Fertilization. *Leucaena Res. Reports* 11: 42-44.
- de Lucena Costa N. and Paulino V.T. 1990b. Response of *Leucaena* to single and combined inoculation with *Rhizobium* and Mycorrhiza. *Leucaena Res. Reports* 11: 45-46.
- de Lucena Costa N., Paulino V.T. and Rodriguez A.N.A. (1990). Growth of transplanted *Sesbania grandiflora* as affected by preinfection of roots with rhizobia and VAM fungus. *Nitrogen Fixing Tree Res. Reports* 8: 121-122.
- Dommergues Y.R. (1987). The role of biological nitrogen fixation in agroforestry. In: *Agroforestry: A Decade of Development*. H.A. Steppeler and P.K. Nair, Eds. pp. 245-271.
- Gardezi A.K. and Ferrera-Cerrato R. (1989). The effect of four levels of phosphorus on mycorrhizal colonization, dry root weight, and nitrogen and phosphorus content of *Acacia saligna* inoculated with *Rhizobium* sp and endomycorrhiza in a Mexican Andisol. *Nitrogen Fixing Tree Res. Reports* 7: 43-45.
- Gardezi A.K., Ferrera-Cerrato R. and Lara Fernandez V. (1988). Effect on the double inoculation of *Rhizobium* sp. and VA Endomycorrhiza on *Acacia cyanophylla* in an Andisol in Mexico. *Nitrogen Fixing Tree Res. Reports* 6: 31-33.
- Gardezi A.K., Jaen Contreras D., Guzman-Plazola R.A. and Ferrera-Cerrato R. (1990). Growth of *Acacia farnesiana* associated with mycorrhizal fungi in three types of Mexican soils. *Nitrogen Fixing Tree Res. Reports* 8: 99-102.
- Guzman-Plazola R.A. Ferrera-Cerrato R. and Etchevers Bara J.D. (1990). Effect of double inoculation with *Glomus* and *Rhizobium* on early adaptation of *Leucaena leucocephala* on acid soils. *Leucaena Res. Reports* 11: 81-83.
- Habte M. and Aziz T. (1985). The influence of soil irradiation and mycorrhizal inoculation on nodulation and growth of *Sesbania grandiflora* Var. N87. *Nitrogen Fixing Tree Res. Reports* 3: 57-59.
- Huang Ruey-Shyang, Yost R.S. and Smith W.K. (1983). Influence of VA-mycorrhiza on growth, nutrient absorption and water relations in *Leucaena leucocephala*. *Leucaena Res. Reports* 4: 86-87.
- Huxley P.A. (1983). The role of trees in Agroforestry: Some comments. In: *Plant Research and Agroforestry*. P.A. Huxley Ed. ICRAF, Nairobi, Kenya.
- Jackson M.L. (1967). *Soil Chemical Analysis*. Prentice Hall, New Delhi.
- Kang B.T., van der Kruijs A.C.B.M. and Couper D.C. (1989). *Alley cropping for food crop production in humid and subhumid tropics*. Proc. of an Alley Farming Workshop, March 1986, IITA Ibadan Nigeria. pp. 16-26.
- Kang B.T., Wilson G.F. and Sipkens L. (1981). Alley cropping maize and *Leucaena* in Southern Nigeria. *Plant and Soil* 63: 165-179.
- Kang B.T., Wilson G.F. and Lawson T.L. (1984). *Alley cropping: a stable alternative to shifting cultivation*. IITA Ibadan, Nigeria. 22 pp.
- Manguiat I.J., Padilla V.M., Mendoza D.M. and Perez A.M. (1990). Rhizobia -Mycorrhiza inoculation and N-P fertilization of *Gliricidia* in a degraded upland area. *Nitrogen Fixing Tree Res. Reports* 8: 140-142.
- Marschner H. (1986). *Mineral nutrition in higher plants*. Academic Press Inc. London Ltd.
- Mengel K. and Kirkby E.A. (1987). *Principles of plant nutrition*. International Potash Institute. Bern, Switzerland. 4th Edition.
- Mosse B. (1981). *Vesicular - arbuscular mycorrhiza research for tropical agriculture*. Hawaii Institute of Trop. Agric. and Human Resources. Univ. of Hawaii Res. Bull. No. 194. 82 pp.
- Munns D.N. (1976). Soil acidity and related factors. In: *Exploiting the legume-rhizobium symbiosis in tropical agriculture*. Proc. Univ. of Hawaii Nifal Project. USAID. Misc. Publ. 145: 211-236.
- National Academy of Sciences (NAS) (1979). *Tropical legumes: resources for the future*. Washington D.C. 332 pp.

INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

- Phillips J.M. and Hayman D.A. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and VA mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Siababa, N.S. and de la Cruz R.E. (1986). How do Mycorrhiza and Rhizobium inoculation affect the growth of Ipil-Ipil (*Leucaena leucocephala* [Lam.] de Wit) seedlings. *NSTA Technology Journal*, Oct.-Dec. pp. 12-17.
- Sivaprasad P., Hedge S.V. and Rai P.V. (1983). Effect of Rhizobium and Mycorrhiza inoculation on growth of *Leucaena*. *Leucaena Res. Reports.* 4: 42.
- Wilson G.F. and Kang B.T. (1981). Developing stable and productive cropping systems for the humid tropics. In: *Biological Husbandry - A scientific approach to organic farming*. B. Storehouse Ed. London, Butterworth publ. Ltd. U.K. pp. 193-203.
- Wong C.C. and Davendra C. (1983). Research on *Leucaena* forage production in Malaysia. In: *Leucaena Research in the Asia-Pacific Region*. Proc. of a Workshop held in Singapore, 23-26 Nov. 1982. IDRC. pp. 55-60.

ROLE DU COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA (CES) G.W. WILSON DANS LA PRODUCTION DES TANINS PAR LE SORGHO TEINTURIER

P. SANKARA*, T.S. KABORE*, J.D. ZONGO*,
K.B. KABORE** et A. SABA***

*IDR Université 03 BP 7021 Ouagadougou 03 Burkina Faso

**Laboratoire de Protection des Végétaux,

Ministère de l'Agriculture, Ouagadougou Burkina Faso

***INC Université 03 BP 7021 Ouagadougou 03 Burkina Faso

***Résumé:** Le sorgho est la quatrième céréale mondiale après le blé, le riz et le maïs. Au Burkina Faso, le sorgho est la première céréale la plus largement cultivée avec une production de 1 011 000 tonnes pour une superficie de 1 330 000 ha. Parmi les sorghos cultivés, il en existe un type appelé "sorgho teinturier" qui, grâce aux tannins qu'il contient fournit un colorant rouge utilisé dans le travail du cuir par les cordonniers. L'attaque du sorgho par le Colletotrichum graminicola (ces) G.W. Wilson entraîne la production de la pourriture rouge au niveau de la moelle des tiges. Les colorants rouges des moelles de tige du sorgho teinturier sans inoculation avec le C. graminicola et avec inoculation par le C. graminicola ont été extraits au DMF à 75% (Dmethylformamide à 75%). Il a été mis en évidence que le colorant produit après l'attaque pour le C. graminicola diffère qualitativement de celui produit naturellement par le sorgho teinturier. En effet, l'attaque entraîne l'apparition d'un produit supplémentaire qui a une référence frontale de 0,74. L'attaque par le C. graminicola entraîne également la modification de certaines molécules dans le sens de la polymérisation ou de l'apport d'un centre d'insaturation (noyau phénolique ou double liaison). La nature exacte du produit supplémentaire, la modification de structures moléculaires et l'effet quantitatif sur la production du colorant feront l'objet d'études ultérieures pour une meilleure connaissance des produits issus de l'interaction entre le C. graminicola et le sorgho teinturier.*

***Abstract:** Sorghum is the world's fourth major cereal crop after wheat, rice and maize. In Burkina Faso, it is the no. 1 cereal with an output of 1 011 000 tons grown on 1 330 000 ha. One type of sorghum, called "dye" sorghum (Sorgho teinturier) produces a red dye because of its tannins. This dye is used by shoemakers in their leather work. Attacks by Colletotrichum graminicola (Cesati) Wilson cause a red stalk rot. Red colouring was produced at the medulla of the stalk in this dye sorghum, with and without a C. graminicola inoculation, and was extracted by using a 75% DMF (Dmethylformamide). The dye produced after a C. graminicola attack had a quality that differed from that produced naturally by this "dye" sorghum. After the pathogen attacks, a supplementary product with a frontal reference of 0.74 appears. Colletotrichum graminicola attacks also cause changes in the molecules - occurrence of polymerization, or an unsaturated centre (phenolic core or double bond). Future studies will be devoted to describing the supplementary product, changes in the molecular structure, and the effect on the quantities of dye produced to increase knowledge on the products generated by the interaction of C. graminicola and "dye" sorghum.*

Le sorgho est la première céréale la plus largement cultivée au Burkina Faso, avec une superficie de 1 330 000 ha et une production de 1 011 000 t pour l'année 1987 (Annuaire statistique du Burkina, 1987). Le sorgho est diversement utilisé (Pâtes alimentaires, boissons fermentées etc...) mais sa production est entravée par plusieurs facteurs dont les aléas climatiques, les maladies et les ravageurs (ICRISAT, 1984). Au Burkina Faso, il existe un

type de sorgho appelé Sorgho teinturier, qui, grâce aux tannins qu'il contient fournit un colorant rouge pour le travail du cuir au niveau des cordonniers. En effet, selon Cassagnes (1985) les tanins ont la propriété de se combiner aux protéines et c'est ce qui explique leurs propriétés tannantes qui s'exercent sur le collagène de la peau des animaux lors de son utilisation comme cuir en tannerie. Le colorant est extrait à partir des gaines de feuilles à l'aide d'eau et de potasse mais la moelle des tiges est également colorée en rouge par les tanins.

L'attaque du *Colletotrichum graminicola* (ces) G.W. Wilson entraîne également la production d'un colorant rouge au niveau de la moelle. Nous avons voulu savoir si le colorant produit après attaque du *C. graminicola* était le même que celui naturellement produit par le sorgho teinturier. Si oui, le *C. graminicola* peut servir alors à augmenter la production du colorant.

MATERIEL ET METHODES

Neuf variétés (Teinturiers 1 à 5, un sorgho sucré, un hybride F2 issu du croisement teinturier 3 x M200, un sorgho témoin T1 sensible et un sorgho témoin T2 résistant à la maladie) ont été retenues pour les inoculations. La souche du *C. graminicola* (ces) G.W. Wilson a été isolée à partir des graines de la variété M200 et repiquée sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) en boîte de Pétri (B.P.) de 9 cm de diamètre. Nos manipulations au laboratoire ont nécessité divers matériels, dont un incubateur, un Four Pasteur et une autoclave pour les stérilisations, un phytotron pour provoquer la sporulation du champignon, des cure-dents comme support du champignon pour les inoculations. Le solvant d'extraction du colorant est le Dimethyl Formamide MERCH (DMF) à 75%.

Les plaques de chromatographie sont des plaques TLC MERCK avec un gel de cilice 60F254 d'une épaisseur de 0,2 mm. L'éluant se compose de la phase supérieure du mélange Butanol-1 (PROLABO) - Acide Acétique - Eau (4-1-5) et d'éther dans les proportions respectives de 20% et 80%. Cet éluant a été retenu après un test d'essai avec 12 autres éluants (Tableau 1). Le colorant extrait a été dilué au 1/20 avec le DMF à 75% et les spectres tracés à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible de type Perkin Elmer 550S combiné à unregistreur Perkin Elmer No. 561.

Le dispositif expérimental est un split-plot à quatre répétitions avec neuf parcelles principales ou variétés et deux parcelles secondaires: parcelle inoculée et parcelle non inoculée (Figures 1 et 2). Les deux paramètres étudiés (variété et inoculation) ont été affectés aux parcelles grâce à la table des nombres au hasard.

La méthode d'inoculation est celle utilisée par Neya et Kabore (1987). Les graines sont trempées dans l'éthanol à 70% pendant 20 secondes puis désinfectées à l'hypochlorite et sodium (eau de Javel) à 1% pendant 10 mn. Après plusieurs rinçages, à l'eau stérile, les graines sont rangées dans les boîtes de Pétri (10 graines par boîte) stériles tapissées de papier Wattman mouillée à l'eau distillée stérilisée.

Après 48 heures dans l'incubateur à 29°C, le champignon émerge à la surface de la graine sous forme d'acervules qui sont prélevées et repiquées sur milieu PDA sous la hotte stérile.

Des cure-dents en bois de 3 cm stérilisés au Four Pasteur à 250°C pendant 1h, ont été refroidis et placés en étoile dans une boîte de Pétri contenant du milieu PDA. Les bouts pointus des cure-dents sont orientés vers le centre de la boîte de Pétri où aura lieu le repiquage de la souche isolée.

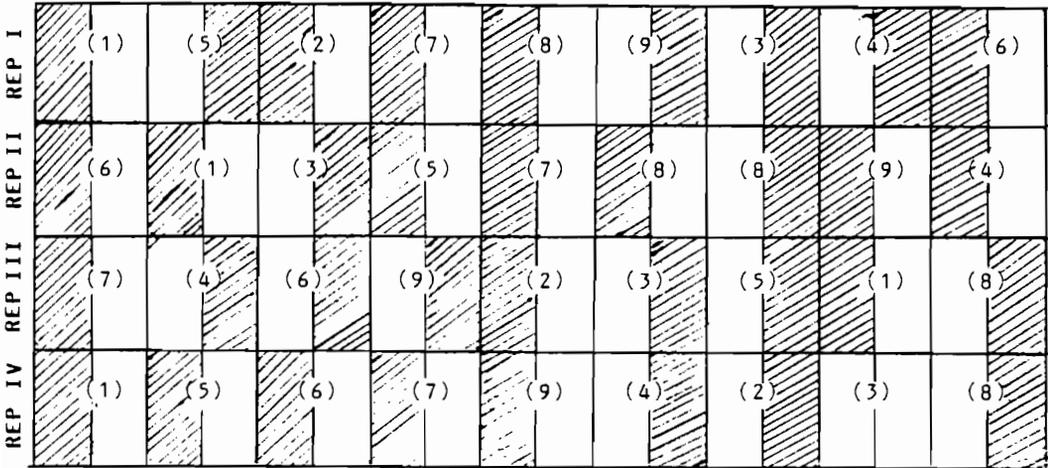
Figure 1. Dispositif expérimental de quatre répétitions en vue du test de l'effet du *Colletotrichum* sur la production de tanins

REP. I	1	5	2	7	8	9	3	4	6
REP. II	6	1	3	5	2	7	8	9	4
REP. III	7	4	6	9	2	3	5	1	8
REP. IV	1	5	6	7	9	4	2	3	8

- | | | |
|------------------|------------------|-------------------------|
| 1 = teinturier 1 | 4 = teinturier 4 | 7 = teinturier 3 x M200 |
| 2 = teinturier 2 | 5 = teinturier 5 | 8 = T1 = M200 |
| 3 = teinturier 3 | 6 = sucré | 9 = T2 = E35-1 |

Figure 2. Représentation du dispositif expérimental en split-plot à 4 répétitions

Parcelle principale = variété; Parcelle secondaire = inoculation



I = ligne inoculée



NI = Ligne Non Inoculée

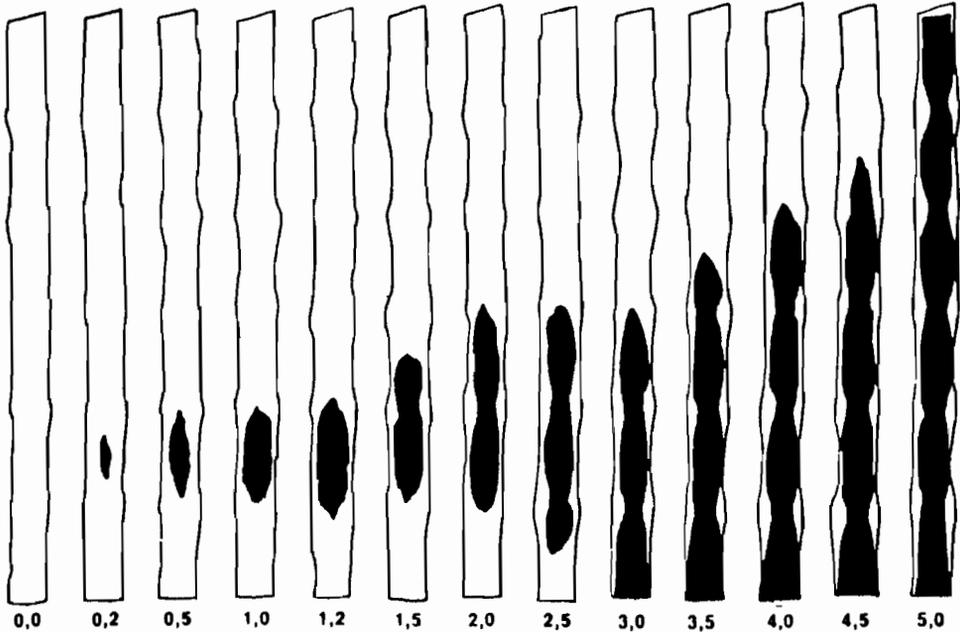
Tableau 1. Liste des 13 éluants testés

<i>Eluants</i>	<i>Support</i>	<i>Résultats</i>
01 Butanol-acide acétique-eau (4/1/5)	Papier Wattman	• Toute la tache est transportée sur le front de l'éluant.
02 Ether pur	Couche de silice.	• La tache décolle à peine.
03 Chloroforme pur	"	• Le produit ne bouge pas.
04 Diméthylformamide (DMF) pur	"	• Tout le produit est emporté.
05 Ether de pétrole	"	• Le produit ne bouge pas.
06 Ether-DMF (1/1)	"	• Le produit est emporté.
07 Ether-DMF (7,5/2,5)	"	• Le produit bouge à peine.
08 Ether-DMF (7/3)	"	• Trainée de produit jusqu'au front de l'éluant.
09 Acétate d'éthyl	"	• Il n'y a pas de séparation.
10 Hexane	"	• Il n'y a pas de séparation.
11 BAE	"	• Tout le produit est emporté.
12 BAE/Ether (3/7)	"	• Début de séparation.
13 BAE/Ether (2/8)	"	• 6 taches séparées sur le teinturier.

Après 24 heures d'incubation dans l'obscurité, les boîtes de Pétri ainsi préparées sont exposées à la lumière vive d'un phytotron pour provoquer une sporulation abondante du champignon (Kabore et Couture 1983). Dix jours après incubation, les cure-dents sont fortement colonisés par le champignon et on procède à l'inoculation des plantes au stade 2 à 3 noeuds. L'inoculation consiste à introduire perpendiculairement à la tige, au milieu du deuxième entre-noeud visible au dessus du sol, un seul cure-dent. Le *C. graminicola* va coloniser les tissus de la plante à partir de la tige et le cure-dent reste en contact avec la plante jusqu'à la récolte.

A la récolte les tiges sont disséquées longitudinalement et la pourriture rouge estimée suivant une échelle à 13 points (Neya et Kabore 1987, Figure 3). La moelle rouge est prélevée autour du point d'inoculation pour l'étude biochimique. La méthode d'extraction du colorant est une adaptation de celle de Kleiber et Alen (1985). La moelle est broyée en particules passant entièrement sous un tamis de 2 mm et 0,5 g de chaque broyat est introduit dans un sachet de thé lipton préalablement vidé de son contenu. L'ensemble est trempé dans 20 ml de Diméthyl formamide à 75% pendant 15 heures à température ambiante. Le colorant ainsi obtenu est utilisé pour la chromatographie sur couche mince et le tracé des spectres d'absorption.

Figure 3. Echelle de sévérité d'attaque de la pourriture rouge des tiges de sorgho causée par le *Colletotrichum graminicola*. 0,0 = Tige sans trace de décoloration; 0,2 - Petite décoloration limitée à la partie centrale de la moelle; 0,5 = Décoloration extensive évoluant vers les 2 noeuds de l'entre-noeud; 1,0 = Un entre-noeud presque ou totalement décoloré sans pénétration des régions nodales; 1,5 = Un entre-noeud presque ou totalement décoloré avec début d'invasion d'un 2e entre-noeud; 2,0 = Deux entre-noeuds presque ou totalement décolorés; 2,5 = Deux entre-noeuds presque ou totalement décolorés avec début d'invasion d'un 3e entre-noeud; 3,0 = Trois entre-noeuds presque ou totalement décolorés; 3,5 = Trois entre-noeuds presque ou totalement décolorés avec début d'invasion d'un 4e entre-noeud; 4,0 = Quatre entre-noeuds presque ou totalement décolorés; 4,5 = Quatre entre-noeuds presque ou totalement décolorés avec début d'invasion d'un 5e entre-noeud; 5,0 = Décoloration atteignant au moins cinq entre-noeuds.



RESULTATS ET DISCUSSION

Les indices moyens de la pourriture rouge sont regroupés sur le tableau 2. La notation de la pourriture a été effectuée à la récolte sur des tiges dissequées. Dans l'ensemble les indices moyens de pourriture rouge ont varié de 0 pour le sorgho sucré et la E 35-1 à 0,33 pour le sorgho teinturier 3 au niveau des lignes non inoculées et de 0,40 pour le sorgho sucré à 3,08 pour le sorgho teinturier 1 au niveau des lignes inoculées. Au niveau des lignes inoculées tous les teinturiers ont eu des indices de sévérité supérieurs au témoin sensible M200 (2,25). Le grand indice de sévérité de pourriture rouge a été enregistré par le teinturier 1 inoculé (3,08) tandis que les valeurs les plus faibles ont été obtenus par le sorgho sucré et la E 35-1 (témoin résistant à la maladie). Ces résultats ont été soumis à une analyse de variance et la comparaison des moyennes montre que tous les sorghos teinturiers ne diffèrent pas

INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

significativement de la variété sensible M200 (Tableau 3): ce sont des variétés sensibles. La F2 du croisement teinturier 3 x M200 est statistiquement aussi sensible à la pourriture rouge que ses deux parents. Elle est moins sensible que le teinturier 1. La variété "tan" sucré ne diffère pas significativement du témoin résistant E 35-1.

Tableau 2. Indices moyens de la pourriture rouge des neuf variétés et des deux niveaux d'inoculation I = Inoculé; NI = Non inoculé

Variétés	Inoculation	R E P E T I T I O N S				Moyennes
		I	II	III	IV	
Teinturier 1	I	2,9	3	3,13	3,3	3,08
	NI	0,21	0,29	0	0	0,13
Teinturier 2	I	3,25	2,5	2,5	3,17	2,86
	NI	0	0	0	0	0
Teinturier 3	I	2,17	2,50	2,87	2,25	2,45
	NI	0,5	0,33	0	0,5	0,33
Teinturier 4	I	2	1,58	3,09	2,44	2,28
	NI	0,12	0	0,06	0,07	0,06
Teinturier 5	I	3,06	1,93	2,43	2,56	2,50
	NI	0,42	0,33	0,18	0,3	0,31
Sucré	I	0,2	0,49	0,5	0,4	0,40
	NI	0	0	0	0	0
Teint 3 x M200	I	2,9	1,25	1,87	1,79	1,95
	NI	0,37	0,4	0	0,08	0,21
M200	I	2,32	2,17	2,5	2	2,25
	NI	0,67	0	0	0,42	0,27
E35-1	I	0,2	0,47	0,5	0,64	0,45
	NI	0	0	0	0	0

Tableau 3. Comparaison des indices moyens de la pourriture rouge des neuf variétés

No.	Variétés	Indices moyens	Groupes homogènes
1	Teinturier 1	1,60	A
2	Teinturier 2	1,43	A B
5	Teinturier 5	1,40	A B
3	Teinturier 3	1,39	A B
8	M200	1,26	A B
4	Teinturier 4	1,17	A B
7	Teint 3 x M200	1,08	B
9	E35-1	0,23	C
6	Sucré	0,20	C

Tableau 4. Comparaison des indices moyennes de pourriture rouge des deux niveaux d'inoculation I = Inoculé;, NI = Non Inoculé

Facteur 1 (Variétés)	Facteur 2 (Inoculation)	Indices moyens de pourriture	Groupes homogènes
Teinturier 1	I	3,08	A
	NI	0,13	B
Teinturier 2	I	0,86	A
	NI	0,00	B
Teinturier 3	I	2,15	A
	NI	0,33	B
Teinturier 4	I	2,28	A
	NI	0,06	B
Teinturier 5	I	2,49	A
	NI	0,31	B
Sucré	I	0,40	A
	NI	0,00	A
Teint 3 x M200	I	1,95	A
	NI	0,21	B
M200	I	2,25	A
	NI	0,27	B
E35-1	I	0,45	A
	NI	0,00	A

Pour toutes les variétés sauf le témoin résistant E35-1 et la variété "sucré" la comparaison des moyennes montre une différence significative entre les lignes inoculées et les lignes non inoculées (Tableau 4). Le teinturier 1 inoculé est plus sensible à la pourriture rouge que le témoin sensible M200 inoculé. Les lignes inoculées des teinturiers 2, 3, 4, 5 ne diffèrent pas significativement de la ligne inoculée du témoin sensible M200. La F2 du croisement teinturier 3 x M200 présente le même niveau de sensibilité que ses deux parents. La variété "sucré" est aussi résistante à la pourriture que le témoin résistant E35-1. Toutes les lignes non inoculées des différentes variétés ne diffèrent pas significativement.

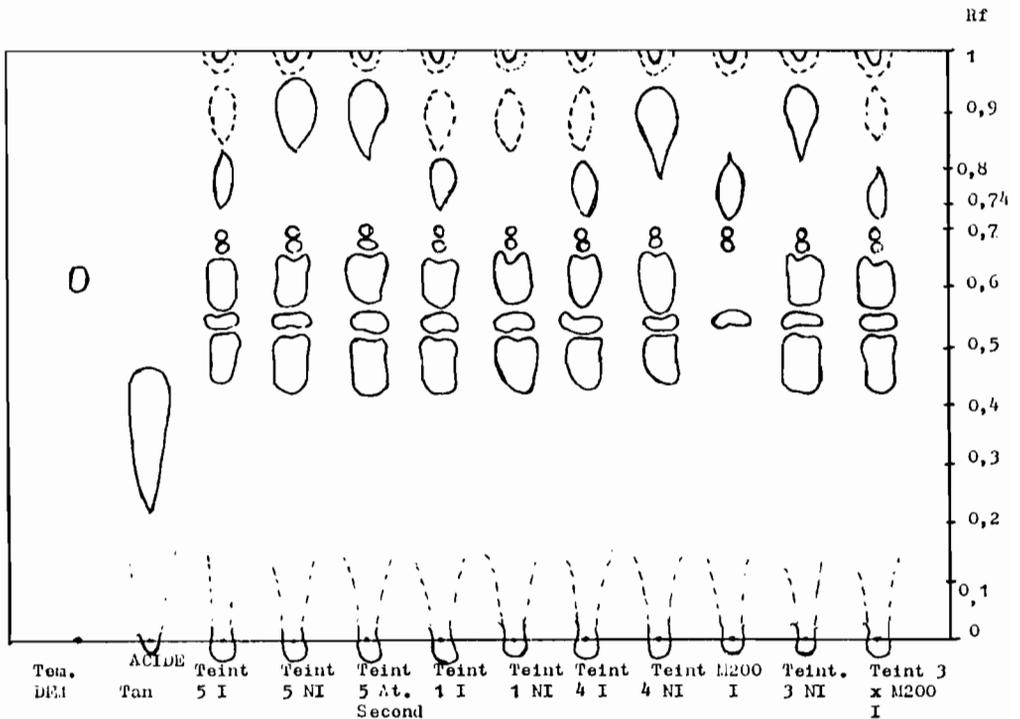
Nous remarquons encore une fois que les deux variétés sans tanins ni anthocyanes sont résistantes à la pourriture rouge alors que les teinturiers (riches en tanins) sont sensibles. L'importance de la pourriture rouge semble être influencée par l'attaque du champignon.

La figure 4 présente les chromatogrammes des colorants des lignes inoculées (I) et non inoculées (NI). Certaines moelles ont été éliminées car présentant des symptômes d'attaques de moisissures. Toutes les lignes non inoculées des teinturiers présentent chacune huit produits séparés. Les lignes inoculées des mêmes teinturiers donnent neuf produits séparés. Un produit supplémentaire d'une référence frontale de 0,74 apparaît sur toutes les lignes inoculées (y compris le M200 et la F2). Chez tous les teinturiers (1, 4 et 5) le deuxième pic

d'absorption observé sur les lignes non inoculées est remplacé par deux pics en présence du champignon.

Les chromatogrammes montrent des taches qui n'ont pratiquement pas décollé. Elles pourraient être dues à des tanins que notre technique ne nous a pas permis d'identifier. L'attaque du *C. graminicola* sur le sorgho teinturier entraîne l'apparition d'un produit supplémentaire dans les moelles inoculées. Lorsque les plaques chromatographiques sont exposées, en chambre noire à une lumière monochromatique de 365 nm, le produit présente une fluorescence. Le petit pic observé au niveau des spectres d'absorption serait dû à ce produit. Un 2ème nouveau pic à 376 nm serait simplement un décollage vers les grandes longueurs d'ondes de pic à 372 nm observé sur les lignes non inoculées. Le même décalage est observé chez les teinturiers 4 et 5. Ce décalage vers les grandes longueurs d'onde traduirait soit une polymérisation de la molécule concernée soit un apport d'un centre d'insaturation (noyau phénolique ou double liaison).

Figure 4. Chromatogrammes des colorants extraits des moelles des Teinturiers 1, 3, 4, 5 du M200 et de la F2 (teinturier 3 x M200) I = Inoculé; NI = Non Inoculé; RF = Référence frontale



CONCLUSION

L'inoculation des sorghos par le *C. graminicola* entraîne une augmentation de la pourriture rouge dans la moelle des tiges. L'interaction *C. graminicola* (ces) G.W. Wilson - Sorgho teinturier entraîne l'apparition d'un produit supplémentaire dans les moelles inoculées. La nature du produit reste à déterminer. Est-ce une toxine produite par le *C. graminicola* pour contourner l'action des tanins? Cette substance pourrait être également un produit élaboré par le sorgho teinturier pour se défendre contre *C. graminicola*. Dans les deux cas, des études doivent se poursuivre pour déterminer la nature et l'origine de cette substance.

L'action du *C. graminicola* se manifesterait aussi par une modification de la structure de certaines molécules dans le sens de la polymérisation ou d'un apport d'un centre d'insaturation. Des études ultérieures doivent être également menées pour préciser cette action du champignon.

Le sorgho teinturier est sensible à la pourriture rouge des tiges et le colorant produit après cette attaque est différente de celle naturellement produite. Les propriétés tannantes du colorant produites après attaque du *C. graminicola* doivent être étudiées afin de tirer une conclusion économique de l'action de ce champignon.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cassagnes P. (1985). Les tanins de sorgho, éléments de chimie. Méthodologie de leur étude. Opération sorgho. Colloque sur les tanins du sorgho. 28 février 1985. École Supérieure d'Agriculture de Purpan 271, Avenue de Grande Bretagne 31078 Toulouse Cedex pp. 3-12.
- ICRISAT (1984). Travaux de l'atelier régional organisé du 27 au 30 novembre 1984 à Ouagadougou. pp. 47-56. ICRISAT Patancheru, Andhra Pradesh 502324 India.
- I.N.S.D. (Institut National de la Statistique et de la Démographie) (1987). Annuaire statistique du Burkina Faso. pp. 85-88.
- Kabore K.B. et Couture L. (1983). Mycoflore des semences du sorgho cultivé en Haute-Volta. *Le Naturaliste canadien*. Vol. 110. pp. 453-457.
- Kleiber D., Gay M. et Cassagnes P. (1985). Méthodes d'analyse et de séparation des polyphénols du sorgho. Opération Sorgho - Colloque sur les tanins du sorgho. 28 février 1985. École Supérieure d'Agriculture de Purpan 271, Avenue de Grande Bretagne 31078 Toulouse. pp. 80-93.
- Meya A. et Kabore K.B. (1987). Mesure de l'incidence de l'antracnose et de la pourriture rouge des tiges causées par *C. graminicola* chez le sorgho. *Phytoprotection* 68: 121-126.

VARIABILITE DES PROTEINES FONGIQUES APPLICATION A LA MISE AU POINT D'UN DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE

Didier SPIRE

Station de Pathologie végétale I.N.R.A.
Route de Saint-Cyr 78026 Versailles cedex

Résumé: L'identité des champignons n'est guère reconnue que par des voies biologiques. Peu de travaux encore se servent des protéines fongiques pour identifier un champignon phytopathogène dans une plante et établir un diagnostic. Des recherches portant sur l'isolement, la purification et la détection de protéines fongiques ont été récemment entreprises, avec pour finalité l'application des méthodes immunologiques du champignon. Or les protéines fongiques sont nombreuses, et évoluent au cours de la croissance mycélienne. La complexité de la cellule fongique, la présence d'une paroi rigide, contenant des macromolécules protéiques et polysaccharidiques, la répartition non homogène du champignon dans son hôte rendent le diagnostic difficile. La variabilité intraspécifique du pathogène est aussi à prendre en compte. Chaque préparation contient un grand nombre de déterminants antigéniques. Tous ne sont pas spécifiques de l'espèce ou de la sous-espèce considérée. Aussi, des études comparant les divers champignons hôtes d'une même plante, analysant des fractions de matériel fongique, séparant divers groupes de protéines, concentrant celles qui sont les plus caractéristiques sont un préalable indispensable à la réalisation d'antisérum spécifiques. En ce sens, la bonne connaissance des protéines cytoplasmiques, des protéines pariétales, des enzymes ou des diverses protéines émises dans le milieu de culture du champignon (exoantigènes) permet la séparation antigène spécifique dont dépendra la qualité des réactifs immunologiques. Différentes techniques sont maintenant disponibles pour comparer, isoler et concentrer ces différentes fractions antigéniques. Un certain nombre d'antisérum ont déjà été produits et des exemples sont données dans le texte. L'application des méthodes immunoenzymatiques laisse présager l'utilisation de ces méthodes dans divers domaines appliqués: diagnostic au niveau de la semence, serotaxonomie, reconnaissance précoce des maladies fongiques, analyse de résistances variétales, immunocytochimie.

Abstract: Fungi are generally identified through biological definitions. Little has been done using fungal proteins to identify phytopathogenic fungi and to establish a diagnosis. Research on the isolation, purification and detection of fungus proteins has recently been started in the hope that immunological methods can be used to recognize fungi. However, there are numerous fungal proteins, and they change during mycelial growth. The complexity of the fungal cell, the presence of a rigid wall that contains proteic and polysaccharidic macromolecules, the irregular distribution of the fungus in the host plant complicate the diagnostic work. Attention must also be given to the intraspecific variability of the pathogen. Each preparation contains a large number of antigenic determinants. They are not all specific to the species or the sub-species being studied. Therefore, before making specific antisera, it is important to do a comparative study of the various fungi in a given host plant, analyze the fractions of the fungal material, and divide it into protein groups with emphasis on the most characteristic ones. With this in mind, a thorough understanding of the cytoplasmic proteins, the parietal proteins, the enzymes, and the various proteins coming from the medium in which the fungus is cultured (exoantigens) makes it possible to isolate the specific antigens which are essential to the quality of the immunological reagents. Various techniques can be used to compare, isolate and concentrate the various antigenic fractions. Some antisera have already been produced; examples are given in the text. The present use of immunoenzymatic

methods suggests that in the future these methods will be used in various fields of applied research, e.g. analyzing seed, serotaxonomy, early detection of fungal diseases, varietal resistance, and immunocytochemistry.

Le succès de la lutte contre les agents pathogènes de plantes dépend pour beaucoup de la qualité des techniques de diagnostic. Que cette lutte soit fondée sur l'application de fongicides ou sur des méthodes de prophylaxie (sélection sanitaire, éradication du matériel infecté), la nécessité d'un diagnostic sûr, d'un résultat *précoce, rapidement exécuté et spécifique* de la maladie, devient de plus en plus évidente, en particulier sur le plan économique. Cela est vrai aussi bien pour la mycologie que pour la bactériologie et la virologie. En mycologie, un diagnostic en l'absence de symptômes visibles peut être utilisé à double fin: soit dans le cadre d'une sélection de semences, plants, à boutures, pour une réduction de l'inoculum primaire, soit pour une lutte mieux raisonnée, un test précoce et sensible permettant d'appliquer judicieusement les traitements chimiques nécessaires:

- durant les 15 dernières années, le test ELISA (Enzyme linked immunosorbant assay) a été très largement et universellement utilisé pour l'immunodétection des pathogènes de type bactériens et surtout viraux. La réaction antigène - (le pathogène) - anticorps spécifiques est rendue visible par l'utilisation d'une enzyme associée à un substrat générant un produit coloré. Cette technique ELISA, sur plaque, est automatisable et utilisé principalement comme marqueur de la phosphatase alcaline.

De nombreuses variantes ont été proposées dans le but d'améliorer la fixation de l'antigène et l'amplification du signal pour répondre au problème de la détection de faible niveau de contamination dans les extraits végétaux (Fig. 1). On peut maintenant détecter des concentrations de l'ordre du ng/lml sans difficultés (Tableau 1). L'évolution des méthodes de détection sérologique (Tableau 2) illustre parfaitement le degré de précision qui peut être actuellement atteint. Les techniques sont maintenant un million de fois plus sensibles qu'il y a une vingtaine d'années. Cependant, dans le domaine mycologique, le développement de ces nouvelles techniques immunologiques, et simultanément la connaissance des protéines de champignon, pour une détection fongique dans des graines ou plantes malades, accuse un certain retard.

Ces progrès lents contrastent fortement avec le développement rapide et la réussite des méthodes sérologiques (production d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux) en virologie, qui ont débuté en 1977 (Clark, Adams), et même en bactériologie. Différentes raisons peuvent être données de cette lente évolution. En premier lieu, il faut bien admettre que les méthodes traditionnelles d'isolement, de croissance et d'observation sont très faciles à employer, qu'elles ne sont pas chères et donc à la portée de nombreux laboratoires. D'où une moindre urgence à développer des méthodes ne se basant pas sur un diagnostic visuel. Cependant la diagnose fongique traditionnelle a ses limites:

- *pour une détection précoce*: faire un diagnostic d'après les symptômes n'est pas toujours une solution adéquate, en particulier si la maladie est déjà bien développée quand les premiers symptômes apparaissent. Souvent une détermination directe nécessite la présence des fructifications du champignon qui n'apparaissent qu'à la phase ultime du processus

pathologique. Aucune détection n'est notamment possible pendant la phase de latence en l'absence de symptômes.

- *pour une détection rapide*: l'isolement et la culture sur milieu artificiel lorsqu'ils sont possibles (parasites non obligatoires) ne donnent jamais une réponse immédiate, un délai d'au moins une huitaine de jours est pratiquement inévitable.
- *pour une détection spécifique*: les difficultés liées soit à l'absence d'éléments morphologiques caractéristiques sur l'hôte ou sur milieu (fructifications et spores), soit au caractère peu précis et fluctuant de ces éléments empêchent ou rendent difficile la détermination au niveau de l'espèce de genres importants en pathologie, *Phytophthora*, *Pythium*, *Phoma*, *Phomopsis*, de nombreux lignivores... De plus, au sein d'une espèce, les races, souches ou types liés au pouvoir pathogène, présentent en général une identité morphologique totale et l'étude des caractères biochimiques constitue une voie importante pour le diagnostic de la pathogénie.

Tableau 1. Comparaison de la sensibilité des variantes DAS-ELISA et DIB ELISA pour les principaux pathogènes du *Pelargonium*

Detected organisms	DAS-ELISA (100µl)		DIB-ELISA (3µl)	
	Detected concentration	Detected amount	Detected concentration	Detected amount
<i>Xanthomonas</i>	2,5.10 ³ cfu/ml	250 cfu	2,5.10 ³ /ml	7,5cfu
<i>Verticillium</i>	1 ng/ml	0,1 ng	0,5 ng/ml	1,5 pg
PFBV	1 ng/ml	0,1 ng	1 ng/ml	3 pg
Tom RSV	5 ng/ml	0,5 ng	1 ng/ml	3 pg

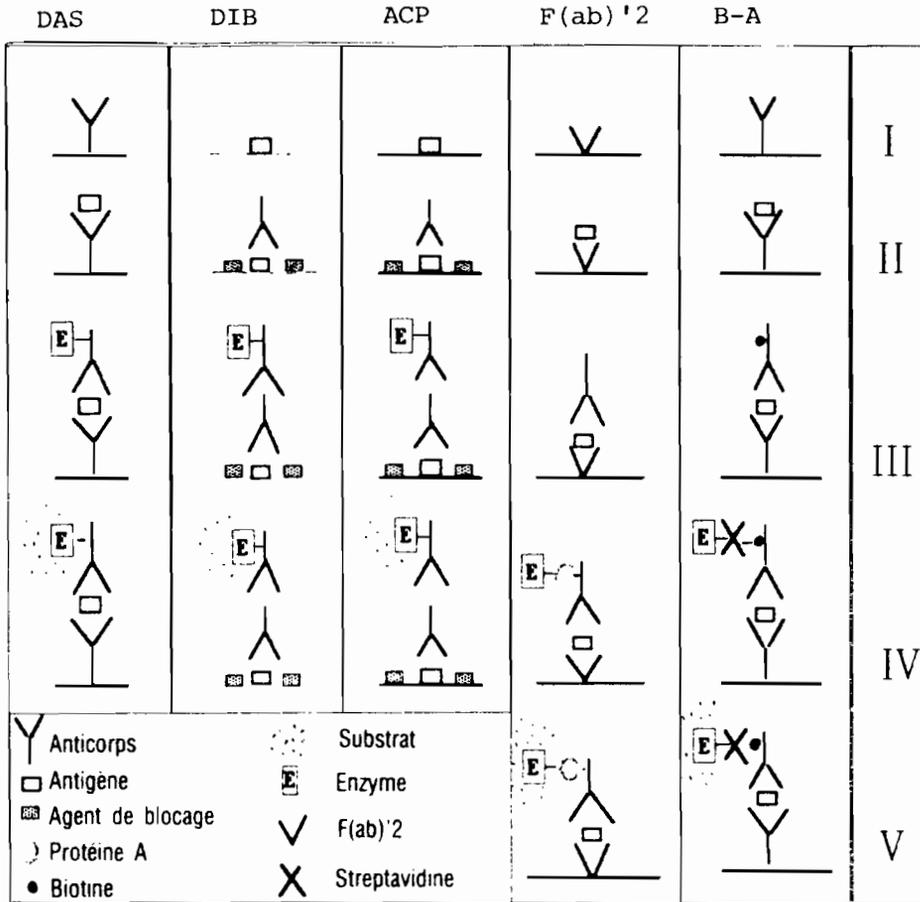
Ces limites ont conduit donc, progressivement, certaines équipes à étudier dans le cas des maladies cryptogamiques végétales, la variabilité que l'on peut rencontrer au niveau protéique, afin d'en tirer toutes les informations nécessaires à l'amélioration de tests biochimiques et immunoenzymatiques pour les utiliser dans divers champs de la mycologie. Or les protéines fongiques sont, pour une espèce, très nombreuses et encore mal connues. La grande difficulté d'étude immunologique des champignons provient de la complexité d'une cellule fongique.

Chaque préparation contient un nombre important de déterminants antigéniques produits par cette diversité. Le tableau 3 indique le nombre théorique possible de protéines des divers organismes vivants (des viroïdes aux plantes et aux animaux).

On voit qu'il est de l'ordre de 15.000 pour les champignons (levures). Une cellule fongique est beaucoup plus complexe, vu sous l'angle de l'immunologie qu'un virus! Elle contient un cytoplasme, riche en ribosomes, mitochondries et autres particules cellulaires, un (ou plusieurs) noyaux, une membrane, des systèmes enzymatiques, et une paroi rigide et très spécifique contenant aussi des glycoprotéines et des molécules polysaccharidiques.

Figure 1. Représentation des différentes variantes d'ELISA (Lemattre *et al.* 1990 8th Congress of ANAPPAV

I = Fixation des anticorps spécifiques ou de l'antigène; II = Saturation par les agents bloquants; III = Révélation par l'anticorps spécifique marqué ou par l'anti-anticorps de lapin (conjugue universel); IV = Introduction du substrat; V = L'utilisation d'un système d'amplification (ex = Avidine Biotine) suppose une étape supplémentaire.



Ce grand nombre de protéines antigènes est probablement la raison la plus significative des faibles progrès obtenus dans le développement du diagnostic immunologique pour champignons. De plus, non seulement ces protéines sont nombreuses, mais elles varient avec la croissance du champignon. Une étude réalisée à Versailles (Fegies 1991) illustre dans le cas du complexe *Phomopsis-Diaporthes* du Soja cette notion de variabilité dans le temps des protéines, surtout celles excrétées dans le milieu.

Le principal problème posé par les études sérologiques avec les champignons est le manque de spécificité. La nature et le site des antigènes spécifiques n'est pas encore connu. On peut observer des protéines non spécifiques, c'est-à-dire des protéines communes à plusieurs espèces, familles, ordres et même parfois à la plante hôte. Le choix de la (les) protéine(s) immunogène(s) est donc crucial et les débats scientifiques actuels portent beaucoup sur le type d'immunogènes permettant d'accéder à des anticorps spécifiques.

Pour obtenir une réaction antigénique spécifique, il est donc en général nécessaire d'isoler et de purifier une ou plusieurs protéines caractéristiques. Mais il y a alors une contradiction fondamentale entre la spécificité recherchée et la sensibilité de la méthode qui doit être conservée. En effet, si les anticorps sont obtenus à partir d'une quantité spécifique, mais faible, du contenu protéique total, la sensibilité du test sera moins élevée.

Figure 2. Filtrats de *D. phaseolorum* var. *batatatis*

Profils-types des filtrats de cultures prélevés après sept périodes de culture (3, 5, 7, 9, 15, 21 et 28 jours). SDS-PAGE sur gradient d'acrylamide 8-25%.

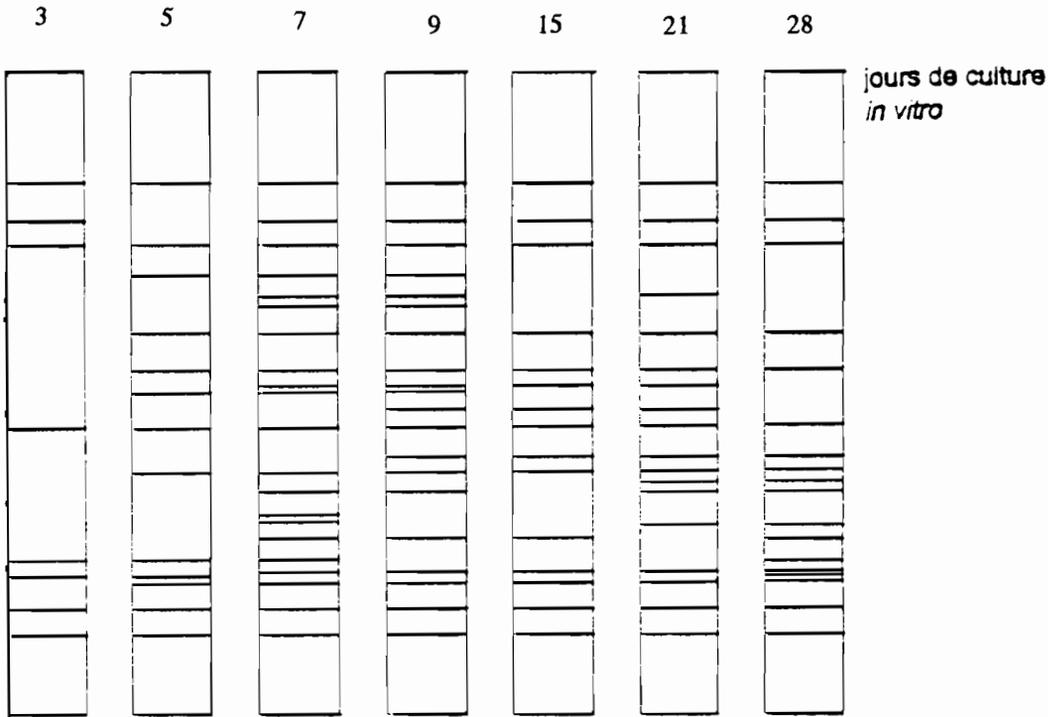


Tableau 2. Sensibilité de détection de plusieurs méthodes de diagnostic (d'après Lot et Lecoq)

CLASSIQUES	Microséroréaction sur lame	1 - 10 µg/ml
	Immunodiffusion	2 - 20 µg/ml
	Test au Latex	5 - 20 µg/ml
RECENTES	ELISA classique	1 - 10 ng/ml
	Immunoélectromicroscopie	1 - 10 ng/ml
	ELISA/Avidine-Biotine	10 pg/ml
	Sondes cDNA	1 - 10 pg/ml

Les extraits antigéniques sont en général préparés soit à partir des cellules mycéliennes ou d'une partie de ce mycélium (antigènes dit cytoplasmiques ou cellulaires), soit à partir du milieu de culture (composants extracellulaires ou exoantigènes, ou antigènes métaboliques), soit encore des parois cellulaires.

Les antigènes produits par injection directe de spores ou autres fructifications sont considérés comme des antigènes de parois, dans la mesure où ces éléments sont probablement en contact avec l'animal uniquement par leurs motifs antigéniques externes. Rien ne permet de dire d'après les publications actuelles quel type de réactif antigénique va produire l'antisérum polyclonal le plus spécifique.

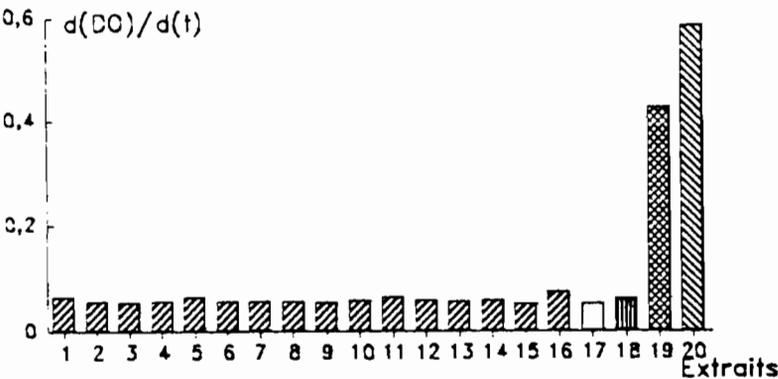
La première étape, avant de proposer un diagnostic immunologique est donc d'avoir le maximum d'information sur les protéines fongiques du pathogène étudié, et de comparer le plus vite possible ces protéines à d'autres champignons proches (saprophytes ou parasites) et qui peuvent être retrouvés sur la même plante, ou la même semence. Ceci pour savoir si une chance existe d'obtenir, par une production classique d'anticorps polyclonaux, un diagnostic spécifique. Diverses variantes d'électrophorèse en gel de polyacrylamide sont intéressantes pour séparer en milieu solide les principales protéines du champignon. On peut avoir la chance de détecter par ce biais certaines protéines dites "majeures" qui prédominent dans certain cas à un moment particulier de la croissance du champignon.

C'est ainsi que certains auteurs (Pettersen *et al.* 1979, Van Etten *et al.* 1982) décrivent l'apparition de ces protéines majeures associées à l'émergence de fructifications ou de sclérotés (*Neurospora*, *botryodiplodia*, *sclerotinia*). Leur concentration augmente considérablement juste avant la formation des sclérotés dans le cas des trois *Sclerotinia* (*S. sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, *S. minor*) pour atteindre jusqu'à 40% des protéines totales du sclérote mature. Une comparaison électrophorétique de ces protéines permet une distinction des trois espèces. Mais, pour l'obtention d'un diagnostic suffisamment précoce, l'apparition de ces protéines survient trop tard dans le cycle du champignon pour être utilisable.

Tableau 3. Classement des organismes par ordre de complexité de leur information génétique. La masse moléculaire du DNA ou RNA des organismes pluricellulaires est donnée pour une cellule (extrait de *Eléments de virologie végétale* P. Cornuet - INRA).

Organismes	Masse moléculaire approximative du RNA ou du DNA en daltons	Nombre probable de protéines codées
Viroïdes	120 000	0
Satellite du Virus de la Nécrose du Tabac	400 000	1
Virus de la Mosaïque du Concombre	2×10^6	4
Potyvirus, Comovirus	3.5×10^6	6 à 7
Virus de la Mosaïque du Chou-fleur (DNA deux brins)	5.1×10^6	6
Virus oncogènes, Retrovirus	$10 \text{ à } 13 \times 10^6$	30
Virus de la Vaccin	200×10^6	200
Mollicute (mycoplasmes, spiroplasmes)	0.5×10^9	500 à 700
Colibacille	2.6×10^9	3000 à 5000
Levures	8.5×10^9	15 000
Drosophile	0.1×10^{12}	165 000
Certaines plantes, certains poissons et batraciens	1×10^{13}	

Figure 3. Spécificité en ELISA d'un sérum anti-*Peronospora pisi* vis-à-vis de 16 agents pathogènes et saprophytes du pois en 17 tampon - 18 pois sains - 19 plantes infectées - 20 conidies broyées de *P. pisi* - N. Fegies.



Dans les travaux que nous avons entrepris, nous avons utilisé le contenu protéique cellulaire total du mycélium et les protéines extracellulaires issues du milieu de culture pour comparer, non pas les trois *sclerotinia*, mais deux maladies que l'on retrouve simultanément sur le Tournesol: *Sclerotinia sclerotiorum* et *Botrytis cinerea* (El Biari 1989). Des différences dans les profils électrophorétiques ont été observées, mais elles sont insuffisantes pour obtenir un antisérum capable de distinguer les deux pathogènes. Il est clair, dans ce cas, que trop de protéines communes provoquent une forte réaction non spécifique.

Des résultats de même type ont été obtenus en comparant les protéines du complexe fongique *Diaporthe-Phomopsis*, le plus important ensemble pathogène du Soja, transmissible par la semence (Fegies 1991). Dans certains autres exemples, il semble possible, si les pathogènes ne sont pas taxonomiquement proches, d'obtenir directement par extraction du cytoplasme fongique, des anticorps polyclonaux, spécifiques au niveau de l'espèce, avec une réaction de sensibilité suffisante. C'est le cas de la détection de *Verticillium* sur coton, où juste une faible réaction croisée a été observée avec *Fusarium oxysporum*. Cette réaction croisée est ensuite éliminée par purification des anticorps (Gerik *et al.* 1987). L'antisérum spécifique a permis des études d'immunocytométrie du pathogène dans les racines. Dans une étude allemande, il a été possible d'obtenir un bon niveau de spécificité avec *Pseudocercospora herpotrichoides* sur blé (Unger, Wolf 1988).

Une série de travaux réalisés pour détecter des endophytes (*Acremonium*) du Ray-grass et de la Fétuque ont permis aussi de produire des antisérums spécifiques et une détection de ces champignons toxiques pour les animaux, dans la plante et les semences (Musgrave *et al.* 1986). Récemment un diagnostic quantitatif par ELISA de *Microdochium nivale* (syn. *Gerlachia nivalis-Fusarium nivale*) a été mis au point (Höxter *et al.* 1991), les anticorps purifiés ne réagissent pas avec d'autres espèces attaquant le seigle. Il est nécessaire de préciser la stratégie à mettre en oeuvre pour une production d'anticorps.

Deux cas différents peuvent survenir: dans le premier cas, il n'existe qu'un seul champignon du genre ou de l'espèce recherchée au niveau de la plante ou de la graine à tester, les autres pathogènes ou la flore saprophytique présents dans cette espèce végétale étant très différents taxonomiquement. Dans cette hypothèse, la réaction non spécifique des espèces proches sera sans conséquence. Il est donc possible de produire un réactif simple et spécifique dans le cas "une seule espèce fongique pour une plante".

Cela s'est présenté pour la détection du *Verticillium dahliae* dans les boutures de *Pelargonium* (Balesdent *et al.* 1989). Certes les antisérums obtenus ne sont pas spécifiques de l'espèce et peuvent détecter d'autres verticillium. Mais un seul *V. dahliae* se trouve associé au *Pelargonium*. Un test officiel, combinant virus, bactéries et champignons dans un même diagnostic est maintenant appliqué en France. Le même cas se présente si on applique les anticorps obtenus du complexe *Diaporthe-phomopsis sojae* pour la détection de *Phomopsis citri* des agrumes, seul *Phomopsis* présent dans cette espèce végétale (Fegies 1991). C'est enfin encore pour la même raison que nous avons pu récemment développer une méthode de diagnostic sérologique pour détecter le mildiou du pois (*Peronospora pisi*) et les mildious en général.

Un antiserum a été préparé à partir d'extraits de conidiophores injecté à un lapin. La méthode ELISA permet une détection de 1ng/ml de protéines de conidies. Aucune réaction croisée n'a été observée avec 16 champignons saprophytes ou pathogènes du Pois. Mais les antisérums réagissent fort bien avec d'autres peronosporacées (*Plasmopara halstedii* du Tournesol ou *Bremia lactucae* de la laitue). Un test a été mis au point pour analyser des lots de semences de pois infectés. L'eau de lavage de ces lots donne une réaction positive avec la méthode ELISA sur plaque.

Il existe un deuxième cas où plusieurs pathogènes (ou saprophytes) existent simultanément dans la même plante ou la même semence, avec des protéines en commun, des espèces taxonomiquement proches. La possibilité d'une détection sérologique est alors rendue plus difficile. C'est le cas déjà cité de *Sclerotinia* et *Botrytis*. Il en est de même pour la détection des trois ascochytes du Pois, susceptibles d'être présentes conjointement dans la semence. (*Ascochyta pisi*, *Mycosphaerella pinodes*, *Phoma medicaginis* var. *pinodella*).

Différentes techniques doivent alors être appliquées: soit séparer et extraire une ou plusieurs protéines spécifiques et produire l'antisérum à partir de ces protéines, soit éliminer, une fois l'antisérum obtenu, les anticorps non spécifiques par divers processus (chromatographie d'exclusion, précipitation des anticorps homologues par les protéines du champignon qui interfère), ou enfin en préparant des anticorps monoclonaux.

Séparation de protéines spécifiques

Ribosomes: Pour réduire le nombre de protéines à comparer, il est possible d'isoler certains éléments de la cellule; en particulier les ribosomes. Les protéines ribosomales de certains champignons ont pu être comparées. Sur des électrophorogrammes de différents *Ascochyta*, par exemple, on peut observer des lignes spécifiques. Il en est de même avec divers *Podospora*. Mais, si ces expériences apportent un renseignement utile sur les chances de réussir un antiserum spécifique, la séparation et la purification de ces protéines particulières va conduire très probablement à une forte diminution de la sensibilité de l'antisérum.

Protéines extracellulaires - enzymes: En règle générale, les protéines extraites du milieu de culture (et concentrées) donnent un profil électrophorétique avec moins de bandes que l'extrait cellulaire mycélien total. Il est donc plus facile de comparer divers champignons et de sélectionner les protéines spécifiques. Il faut tenir compte cependant de l'évolution de ces protéines dans le temps, (de l'âge de la culture et choisir les bandes présentant une certaine persistance).

De nombreux exemples d'analyse électrophorétique de ces protéines ont été produits. Citons les recherches de caractérisation de certaines pythiacées par cette méthode (Nwaga 1988, Nwaga *et al.* 1990); des électrophorèses en gel de polyacrylamide à partir de ces protéines extracellulaires permettent la différenciation d'espèces de *Phytophthora* (Nwaga *et al.*). L'extraction est issue d'un milieu de culture de sept jours. Chaque espèce a un profil bien particulier, bien qu'une certaine variabilité s'observe entre souches.

Les diagrammes isoenzymatiques sont aussi des éléments d'analyse de la variabilité protéique. Leur application au diagnostic fongique vient juste de commencer. L'analyse des isoenzymes est très utile pour mieux connaître les caractères de variabilité d'un pathogène et permet de résoudre des problèmes taxonomiques quand les paramètres morphologiques sont peu nombreux ou quand d'autres caractéristiques sont très élastiques parmi les isolats d'une même espèce. Nous pouvons donner des exemples différents.

L'étude faite pour des estérases d'*Ascochyta rabiei* et d'autres *Ascochyta* montre des profils isoenzymatiques assez constants et une réelle stabilité intraspécifique. Sur milieu minimum, il est possible d'observer quelques différences entre races, mais ceci reste à confirmer. Dans d'autres cas, on observera des variations intraspécifiques importantes, signe d'une variabilité plus forte.

Ce sont les enzymes directement liées au début du processus infectieux qui sont le plus spécialement étudiés (avec l'espoir d'obtenir un diagnostic précoce). Par exemples, toutes celles qui permettent au pathogène de s'installer dans la cellule de la plante hôte : cutinase, pectinase, polygalacturanase etc... Ces enzymes ne sont que partiellement spécifiques, mais si apparaissent des bandes protéiques spécifiques au cours d'électrophorèse, leur injection peut apporter des résultats intéressants.

Des corrélations ont été trouvées entre les zymogrammes et les groupes d'anastomose de *Rhizoctonia solani*. Ceci ouvre la voie à une reconnaissance pratique des espèces de ce grand complexe. On a même reproduit des anticorps avec des protéines spécifiques du groupe 8 de *Rhizoctonia solani* (probablement des pectinases). Ils permettent de faire une distinction entre les groupes d'anastomose (Cruikshank 1990, Lecoq *et al.* 1991) graduellement, la recherche se dirige vers l'étude de la paroi cellulaire et de la surface des spores, dernière possibilité pour trouver et séparer des protéines.

Récemment, de nouvelles techniques ont permis de dissoudre des protéines de paroi, en utilisant le chlorure de lithium (Hassan *et al.* 1991). L'un des principaux avantages de l'analyse des protéines de surface est la réduction des nombres de bandes protéiques des diagrammes électrophorétiques par rapport aux analyses traditionnelles du contenu cellulaire total. De plus, la paroi du champignon joue certainement un rôle important dans l'interaction plante-pathogène. Elle aura certainement son rôle dans les futurs diagnostics.

Développement du diagnostic à partir d'anticorps monoclonaux

Il y a encore peu de résultats à propos d'anticorps monoclonaux obtenus à partir de champignons phytopathogènes dans un but de diagnose. Les succès ne sont pas a priori garantis et beaucoup pensent que cette technique longue et coûteuse doit être raisonnée et employée après une analyse critique des protéines de l'espèce considérée. C'est ainsi que Banowitz *et al.* (1984) ont essayé les premiers, mais sans succès, de distinguer les téliosporos de *Tilletia caries* et *Tilletia controversa*.

La plupart des anticorps monoclonaux produits depuis lors, l'ont été à un niveau de spécificité correspondant à l'espèce, par exemple vis-à-vis de *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora*

megasperma var. *glycinae*, *Ceratocystis ulmi* et plus récemment *Rhizoctonia solani*, *leptosphaeria Korea*. Il est sûr que de nouveaux diagnostics seront encore produits à partir d'anticorps monoclonaux dans un avenir proche. Mais cette revue générale indique qu'il n'est pas toujours nécessaire de prendre cette voie coûteuse. S'il faut tirer une conclusion de cet exposé, nous pourrions dire que l'intérêt de ces nouvelles méthodes de diagnostic en mycologie réside:

- dans le fait qu'elles permettent une évaluation quantitative du pathogène. C'est peut-être important, en particulier pour des études qui porteraient sur une analyse de la résistance variétale;
- dans l'amélioration de nos connaissances sur la variabilité des pathogènes, avec les implications que cela peut apporter pour la résistance des plantes et l'épidémiologie;
- dans le fait que les kits de diagnostic pourront être utilisables non seulement pour la détection, mais aussi pour des études d'ultrastructure, et la répartition du pathogène ou de ses toxines dans une plante;
- que peut-être, il sera possible de détecter un sol infecté, mais il est trop tôt pour le dire;
- que le principal rôle de ces tests sera de connaître très tôt la présence du pathogène et d'être capable, en conséquence, d'appliquer des traitements moins nombreux et dans de meilleures conditions.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Balesdent M.H., Albouy J., Narcy J.P., Robin P., Tronchet M. and Lemattre M. (1989). Enzyme-linked immunosorbent assay for the selection and certification of pathogen-tested *Pelargonium*. *Acta Horticulturae* 246: 291-294.
- Banowitz G.M., Trione E.S. and Krygier B.B. (1984). Immunological comparisons of Teliospores of two wheat bunt fungi, *Tilletia* species, using monoclonal antibodies antisera. *Mycologia* 76 (1): 51-62.
- El Biari A. (1989). Contribution à l'étude du *Sclerotinia* du Tournesol. Comparaison sérologique et électrophorétique de *S. sclerotiorum* et *Botrytis cinerea*. DEA Phytopathologie Université Paris XI.
- Clark M.F. and Adams A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Cornuet P. (1987). *Eléments de Virologie Végétale* - INRA-PARIS.
- Cruickshank R.H. (1990). Pectic zymogramms as criteria in taxonomy of *Rhizoctonia*. *Mycol. Research* 94 (7): 938-948.
- Dewey F.A. (1988). Development of Immunological diagnostic assays for fungal plant pathogens. Brighton crop protection conference. pp. 777-786.
- Fegies de Castro N. (1991). Études électrophorétiques et sérologiques d'agents pathogènes de légumineuses: le complexe *Diaporthe/Phomopsis* du Soja et le mildiou du Pois. Thèse Université - Rennes.
- Gerik J.S., Lommel S.A. and Huisman O.C. (1987). A specific serological staining procedure for *Verticillium dahliae* in cotton root tissue. *Phytopath* 77, 2, 261-270.
- Hassan A.K., Schulz C., Sanistan M.D. and Wostemeyer J. (1991). Biochemical and molecular tools for the differentiation of aggressive and non aggressive isolates of the oilseed rape pathogen, *Phoma lingam*. *J. Phytopath.* 131: 120-136.

- Hoxter H., Miedaner Th., Sander E. and Geiger H. (1991). Quantitative assessment of *Microdochium nivale* in rye with ELISA (1991). *Zeichrift Pfl. Krank, Pflschutz* 98, 1, 13-17.
- Lecoz S., Gillet and Hingand L. (1991). Use of specific antibodies to a fraction obtained by size exclusion chromatography, to improve the serological characterizatón of *Rhizoctonia solani* AG3.
- Legoff V. (1983). Divergence évolutive des protéines ribosomiques. Comparaison électrophorétique et immunologie chez *Podospora* et *Saccaromyces*. Thèse Univ. Paris XI. 1983.
- Lemattre M., Albouy J., Balesdent M.H. et Spire D. (1991). Les méthodes sérologiques appliquées au diagnostic de routine des agents phytopathogènes. *Phytoma* 430: 3-5.
- Matthew J.S., Brooker J.D. (1991). The isolation and characterisation of polyclonal and monoclonal antibodies to anastomosis group 8 of *Rhizoctonia solani*. *Plant Pathology* 40: 67-77.
- Meiller S.A. and Martin R.R. (1988). Molecular diagnosis of Plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol* 26: 409-432.
- Musgrave D.R., Grose T.A., Latch G.C.M. and Christensen M.J. (1986). Purification and characterisation of the antigens of endophytic fungi isolated from *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea* on New Zealand. *N.Z. Journ. of Agric. Res.* 29: 121-128.
- Nwaga D. (1988). Intérêt du polymorphisme protéique et enzymatique pour la caractérisation des Pythiacées. Thèse doctorat. Un. Rennes I.
- Nwaga D., Lenormand M. and Citharel J. (1990). Identification et différenciation par électrophorèse de protéines mycéliennes et d'isoenzymes. *Bull. OEPP* 20, 35-45.
- Petersen G.R., Russo G.M. and Van Etten J.L. (1982). Identification of major proteins in *Sclerotia* of *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia trifoliorum*. *Exp. Mycol.* 6: 268-273.
- Unger J.G. and Wolf G. (1988). Detection of *Pseudocercospora herpotrichoides* (From) Deighton in wheat by indirect ELISA. *J. Phytopath.* 122: 281-286.
- Van Etten J.L., Freer S.N. and Mc Cane B.K. (1979). Presence of major (storage ?) Protein in dormant spores of the fungus *Botryodiplodia theobromae*. *J. of Bacteriol.* May 1979. 650-652.
- Wycoff K. and Agers A.R. (1990). Monoclonal antibodies to surface and extracellular antigens of a fungal plant pathogen, *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea*, recognize specific carbohydrates epitopes. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 37: 55-79.

ENDOMYCORHIZATION VA DES VITROPLANTS DE VIGNE: APPROCHE IMMUNOLOGIQUE POUR LA DETECTION DES CHAMPIGNONS IMPLIQUES

F. RAVOLANIRINA*, V. GIANINAZZI-PEARSON**, S. GIANINAZZI**

*Ministère de la Recherche Scientifique et Technologique pour le Développement

D.A.R.S.E 101 Antananarivo Madagascar

**Laboratoire de Phytoparasitologie, INRA-CNRS

Station de Génétique et Amélioration des Plantes, INRA

B.V 1540, 21034 Dijon cédex, France

Résumé: La vigne, comme la majorité des espèces agricoles pérennes ou annuelles forme naturellement et dépend des endomycorhizes à vésicules et arbuscules (VA). Cependant, le développement de la pratique de la culture *in vitro* de ces espèces a abouti à la production de plantes totalement dépourvues de leurs symbiotes pendant la première étape de leur croissance. La première partie de cette communication rapporte les travaux portant sur la mise au point d'une méthode d'inoculation endomycorhizienne VA lors d'un sevrage précoce de vitroplants de vigne; cette méthode s'est avérée très efficace pour la reprise et la croissance de vitroplants. La deuxième partie présente la production d'anticorps polyclonaux produits à partir des fractions solubles de broyats de spores de *Gigaspora margarita* et leur utilisation pour la détection et la différenciation des champignons VA seuls ou en association avec les racines de vitroplants de vigne infectés.

Abstract: Like most annuals and perennials, grapevines form and depend on vesicular and arbuscular VA endomycorrhiza for their growth. However, micropropagation techniques lead to the production of plants that are exempt from this symbiosis during the earliest stages of their growth. The first part of this paper reports the development of a VA endomycorrhizal inoculation technique during the weaning period of grapevine microplants which have proven to be very effective for plant recovery and growth. The second part of the presentation concerns the production of polyclonal antibodies against soluble spore extracts of *Gigaspora margarita* and their use in the identification of VA fungi either alone or in endomycorrhizal association with the roots of microplants.

Il a été démontré que les champignons endomycorhiziens VA peuvent améliorer la croissance de la vigne en sols désinfectés et en conditions contrôlées (Schubert and Cammarata 1986). Cependant, la pratique de la culture *in vitro* dans les programmes d'amélioration de cette plante (Martin *et al.* 1987) a abouti à la production de plants totalement dépourvus de leurs symbiotes endomycorhiziens pendant la première étape de leur croissance.

Nous nous sommes proposés au cours de nos travaux, de déterminer le moment opportun pour intégrer les champignons VA dans le cycle de vitroplants de vigne. Une des voies d'approche pour aborder ce problème est la mise au point d'une technique permettant l'endomycorhization VA directement *in vitro*, c'est-à-dire pendant le processus de multiplication végétative, en culture axénique.

Cependant, la comparaison du comportement en serres des plants inoculés *in vitro* et des plants inoculés *post vitro*, c'est-à-dire à la sortie des tubes, montrait que l'endomycorhization *post vitro* est plus bénéfique aux plantes que l'endomycorhization directement *in vitro*

(Ravolanirina *et al.* 1989). Compte tenu de ces résultats nous rapportons ici, dans un premier temps, la mise au point d'une méthode d'endomycorhization *post vitro* très précoce des vitroplants de vigne.

Par ailleurs, les techniques immunologiques utilisant des anticorps polyclonaux, produits à partir des spores ou de mycélium des champignons VA se sont développées. Les méthodes employées aussi bien d'immunofluorescence (Kough *et al.* 1983, Wilson *et al.* 1983) qu'immunoenzymatique (méthode ELISA indirecte: Aldwell *et al.* 1983, 1985) ont permis d'étudier les relations immunologiques existantes entre les champignons VA et leur identification au niveau du genre. Toutefois, elles restent limitées pour distinguer les espèces entre elles car des réactions croisées ont été observées.

Ainsi dans un deuxième temps, nous décrivons la production d'anticorps polyclonaux contre la fraction soluble de broyats de spores de *Gigaspora margarita*, et leur utilisation dans les tests ELISA, DIBA, en immunoblotting et en immunocytochimie pour d'une part, caractériser l'antisérum et d'autre part, détecter les champignons VA dans les tissus infectés.

MATERIEL ET METHODES

Endomycorhization VA des vitroplants

Production de vitroplants

Les vitroplants de vigne, porte-greffe SO₄ 102 sont produits selon la méthode de Carre *et al.* (1979).

Obtention d'inoculum de champignons VA

Les vitroplants ont été inoculés avec les champignons suivants: *Gigaspora margarita*, *Glomus mosseae*, *G. caledonicum* et *G. fasciculatum*. Ils proviennent des racines fortement mycorhizées des poireaux cultivés et entretenus dans des conditions saines et contrôlées. En effet, au départ de la production d'inoculum, les spores des champignons VA et les semences de poireaux sont désinfectés en surface tandis que les pots et les substrats utilisés le sont aux rayons gamma. Au moment de l'inoculation, les fragments d'endomycorhizes sont encore désinfectés en surface à l'aide d'une solution de chloramine T à 2%.

Techniques d'inoculation

Deux méthodes d'inoculation *post vitro* ont été appliquées et comparées.

Inoculation au repiquage

Les vitroplants de vigne sont sortis du tube après six semaines de rhizogénèse et sont repiqués individuellement en pots dans un mélange de terre/tourbe/gravier (50:25:25) préalablement

sterilisé aux rayons gamma. L'inoculum endomycorhizien VA est apporté à raison de 0,5g/plante.

Inoculation au sevrage

Les *vitroplants* sont sortis du tube très précocement au stade de deux ébauches racinaires après avoir passé seulement deux semaines de rhizogénèse (au lieu de six habituellement). Les plants sont sevrés pendant deux ou trois semaines, et groupés en terrine dans le mélange terre/tourbe/gravier en présence d'inoculum endomycorhizien VA à raison de 5g/25 plantes. Les *vitroplants* ainsi inoculés sont ensuite repiqués individuellement en pots comme décrit précédemment mais sans apport supplémentaire d'inoculum.

Conditions de culture

Après inoculation, les *vitroplants* sont restés en chambre climatisée (26/18°C, 16h, 12.000 lux, 100% d'humidité relative). Deux semaines après, l'humidité est réduite à 70%. Ensuite, les *vitroplants* passent dans une chambre climatisée ayant une température de 22/18°C. Pendant le sevrage, les *vitroplants* sont arrosés à l'eau; ensuite, ils reçoivent la solution nutritive dès la première semaine. Ensuite, les plants âgés de onze semaines sont endurcis en serre pendant deux semaines puis transplantés au champ sur des parcelles désinfectées à la vapeur.

Mesures

La croissance des porte-greffes de vigne a été appréciée 13 semaines après l'élevage en chambre climatisée, par la mesure de la hauteur des plantes (cm), du nombre de vrilles, de la longueur moyenne de la nervure principale des feuilles (cm) et après 12 semaines de plantation en plein champ par la mesure du poids de matière fraîche (g) des parties aériennes et de la hauteur (cm) des plantes. L'estimation de l'infection endomycorhizienne des racines de plants de vigne a été faite par la méthode de Trouvelot *et al.* (1986) après éclaircissement et coloration des fragments de racines selon la technique de Philipps et Hayman (1971).

Approche immunologique

Préparation d'extraits protéiques des spores

Les spores de *Gigaspora margarita* ayant servi à l'immunisation du lapin proviennent des cultures de poireaux endomycorhizés par cette espèce et conduites en chambre climatisée. Les spores sont récoltées par tamisage du sol, triées sous une loupe binoculaire et stérilisées en surface selon la méthode décrite par Ravolanirina *et al.* (1987). Cinq mille spores de *Gig. margarita* ont été broyés à 4°C, dans 5 ml de tampon phosphate citrate 0,06M contenant du saccharose 0,1 M, de l'acide ascorbique 0,05 M et du mercaptoéthanol 0,1%. Le mélange est centrifugé à 10.000 g pendant 30 mn, le surnageant constitue la fraction soluble. Deux rinçages successifs du culot ont été réalisés et l'ensemble du surnageant obtenu a été

lyophilisé et stocké à -20°C jusqu'à utilisation. Les protéines totales contenues dans la fraction soluble sont dosées selon la méthode de Bradford (1976).

Production d'antisérum polyclonal

La fraction soluble contenant 1,8 mg/ml de protéines totales mélangées à un volume égal de l'adjuvant complet de Freund est administré à un lapin de laboratoire par des injections sous cutanées de petits volumes. Quatre semaines après, une injection de rappel contenant 0,4 mg/ml de protéines totales a été faite. Avant l'immunisation, un sérum témoin (préimmun) a été prélevé au niveau d'une veine marginale de l'oreille, puis les autres prélèvements du sang ont été effectués de la même façon aux 4, 6, 7, 9, 10, 12^{ème} semaines après la 1^{ère} injection. Le sang recolté est laissé 2h à la température ambiante puis une nuit à 4°C. Le sérum recueilli a été partiellement purifié par précipitation au sulfate d'ammonium selon le protocole décrit par Clark et Bar-Joseph (1984).

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Le test ELISA indirect a été effectué selon la technique décrite par Straker *et al.* (1989) avec des modifications dans les temps d'incubation, pour caractériser l'antisérum obtenu (titre et spécificité) et pour détecter les antigènes dans les racines. 100ul de suspension antigénique (d'origine sporale ou racinaire) diluées dans le tampon carbonate de sodium 0,1M pH 9,6 sont réparties dans les plaques de microtitration (NUNC) et mis à incuber une nuit à 4°C. Les lavages, après chaque incubation sont effectués à l'aide du tampon tris-caséine contenant du NaCl 15 mM, caséine 5% et thimérosal 0,02%.

Ensuite, 100 ul d'une série de dilutions de l'antisérum à tester, dans le même tampon tris-caséine, sont distribués dans chaque puit. Au bout de 2h d'incubation à 37°C les puits sont lavés et sont remplis de 100ul de protéine A-peroxydase diluée à 1:2500 dans du tris-caséine. Après 1h 30 mn d'incubation à 37°C, les puits sont à nouveau rincés et le substrat approprié (mélange de 3, 3', 5, 5' tetraméthylbenzidine et de l'eau oxygénée) selon le protocole de Straker *et al.* (1989) est ensuite ajouté (100 ul). La réaction est arrêtée 30 mn après, avec de l'acide sulfurique 2 N (50 ul) et la lecture se fait à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm.

DIBA (Dot immunobinding assay)

Cette technique consiste à déposer 1 ul d'extrait de spores de champignons VA à tester, sous forme d'un spot sur une feuille de nitrocellulose (0,1 um de porosité) qui adsorbe très fortement les antigènes de nature protéique ou glycoprotéique.

Après séchage de dépôts (30 mn), elle est saturée dans du tris-caséine à pH 7,6 pendant 1h. Ensuite, la feuille de nitrocellulose est incubée 1h à la température ambiante avec l'anticorps primaire (dilué au 1:2000 dans le même tampon) puis avec l'anticorps secondaire anti-IgG du lapin marqué à la phosphatase alcaline (Sigma), dilué au 1:800, pendant 1h à la température

ambiante, après une série de lavages. La révélation de l'activité de la phosphatase alcaline se fait selon la méthode décrite par Burgmeister et Koenig (1984) dans un mélange de Na naphthyl phosphate et Fast Blue RR (Sigma). La réaction est arrêtée par un rinçage abondant avec de l'eau distillée.

Immunoblotting

Cette technique a été réalisée pour identifier certains antigènes contre lesquels les anticorps sont dirigés. Elle comporte trois étapes: la séparation des protéines contenues dans la fraction soluble de broyats de spores par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, l'électrotransfert des protéines ainsi séparées sur une feuille de nitrocellulose et la détection des protéines à l'aide des anticorps spécifiques.

Electrophorèse

La séparation de protéines solubles de *Gig. margarita*, à l'état brut ou après purification partielle par précipitation à - 20°C dans de l'acétone à des degrés de saturation croissants (30%, 50% et 80%), a été faite selon la technique proposée par Davis (1964) en système discontinu et en conditions non dénaturantes sur des gels en plaque (7 x 8 x 1,5 cm). Le gel de séparation contient 12% de polyacrylamide à pH 8,8 et le gel de concentration à 5% à pH 6,8. Le dépôt des protéines étant effectué, leur migration est conduite à ampérage constant de 30mA/gel et le voltage limité à 350V pendant 2h à 4°C; le tampon de migration est du tris-glycine à pH 8,3 (tris 25 mM, glycine 192 mM). Les protéines sont colorées à l'argent à 2% selon le protocole de Blum *et al.* (1987).

Electrotransfert

Après électrophorèse, les protéines sont immédiatement transférées sur une feuille de nitrocellulose (0,1µm de porosité) à l'aide d'un système de transfert électrique semi-sec de Biolyon; le tampon de cathode est le tris-glycine pH 8,3 (tris 25mM, glycine 192mM) et le tampon anodique est le même additionné de méthanol à 20% (v/v). Le transfert est réalisé sous un voltage de 12V pendant 15mn puis de 24V durant 1 heure.

Détection immunologique des protéines

Après transfert, la feuille de nitrocellulose est équilibrée dans le tampon TBS (tris 10 mM, NaCl 154 mM à pH 7,5) pendant 15 mn à la température ambiante, puis saturée à l'aide de la gélatine, rincée brièvement et incubée dans du TBS additionné du Tween 20 à 0,05% et du thimérosal 0,02%, contenant le premier anticorps dilué à 1:2000, pendant 2h à 37°C, ou toute la nuit à température ambiante. La fixation de l'anticorps primaire sur les antigènes est révélée par les anti-IgG du lapin conjugués à la phosphatase alcaline avec les mêmes substrats que ceux utilisés dans le test DIBA.

Préparation d'antigènes provenant des racines infectées

Des vitroplants de vigne inoculés par *Gig. margarita* selon la méthode d'endomycorhization au sevrage décrite précédemment, ont été utilisés après six et 15 semaines de culture. Les racines des plantes témoins et infectées sont broyées à 4°C dans le tampon tris-HCl pH 7,6 contenant de l'acide ascorbique 0,2%, Na₂EDTA 2%, tetraborate disodique 0,38%, NaCl 0,36%, thioglycolate de sodium 2,5%, PVP 10% activé à l'HCl et PEG 20.000 à 2% comme l'avait proposé Benin (1989). Après centrifugation à 10.000g pendant 30mn, le surnageant est testé en ELISA.

Localisation cellulaire des antigènes par immunocytochimie

Les racines des plantes témoins et infectées sont lavées, fixées et incluses dans du LR White selon la technique décrite par Gianinazzi et Gianinazzi-Pearson (1992). L'immunomarquage a été réalisé en utilisant l'anticorps dilué à 1: 1000 ou 1: 10.000 sur des coupes minces et observé en microscopie optique et électronique. En microscopie optique, la méthode de l'amplification à l'argent a été utilisée et en microscopie électronique, les antigènes sont révélés en utilisant le marquage indirect (Straker *et al.* 1989, Gianinazzi and Gianinazzi-Pearson 1992).

RESULTATS ET DISCUSSION

Effet de l'inoculation des champignons VA sur la croissance des vitroplants

Quel que soit le champignon VA utilisé, les vitroplants endomycorhizés ont eu un meilleur développement que les témoins non inoculés (Tableau 1). Cette stimulation apparaît dès la cinquième semaine qui suit l'inoculation et varie en fonction du champignon VA utilisé. Le gain de croissance par rapport aux témoins non inoculés varie entre 172% (*G. caledonicum*) et 291% (*G. fasciculatum*) (Tableau 1). Pour tous les paramètres étudiés, *G. fasciculatum* s'est avéré être le plus efficace, bien que dans tous les cas le taux d'infection ait été très satisfaisant (*Gig. margarita* 75%, *G. caledonicum* 83%, *G. mosseae* 94% et *G. fasciculatum* 95%).

Comparaison de l'inoculation au sevrage et au repiquage pour la croissance des vitroplants

Le moment de l'inoculation influence de façon significative la croissance du porte-greffe de vigne. L'inoculation lors du sevrage précoce se montre plus efficace et plus bénéfique dans la stimulation de la croissance de la vigne que celle obtenue au repiquage classique (Tableau 2). L'endomycorhization s'établit plus vite et se développe dès la première semaine. L'apport deux fois par semaine d'une solution nutritive avec phosphore (+P), ne modifie pas le développement des plantes endomycorhizées au sevrage, bien que le taux d'infection diminue.

Tableau 1. Influence de quatre champignons VA sur la croissance de *vitroplants* de porte-greffe de vigne (SO₄ 102) inoculés au repiquage, 13 semaines après microbouturage

Traitements	Hauteur des plantes	Nombre de vrilles par plante	Longueur de la nervure principale (cm)
Plantes témoins	21,5 c	0,0 b	6,1 d
Plantes inoculées avec:			
<i>G. margarita</i>	39,0 b	0,4 b	8,2 bc
<i>G. caledonicum</i>	37,0 b	0,6 b	7,9 c
<i>G. mosseae</i>	42,0 b	0,7 b	8,5 b
<i>G. fasciculatum</i>	62,5 a	1,5 a	9,1 a

Chaque valeur représente la moyenne de six répétitions. Dans chaque colonne, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à P = 0,05.

Tableau 2. Influence du moment d'inoculation par *G. fasciculatum* (+ G.f) sur la croissance du porte-greffe de vigne (SO₄ 102) produit *in vitro*, 13 semaines après microbouturage

Inoculations et traitements	Hauteur des plantes (cm)	Longueur de la nervure principale (cm)	Taux d'infection (%)
Repiquage			
Témoins - P	22,0 f	6,2 f	0 d
+ G.f - P	66,6 d	11,5 c	65,5 b
Témoins + P	39,0 e	9,8 e	0 d
+ G.f + P	70,0 cd	11,7 c	57,6 bc
Sevrage			
Témoins - P	13,0 g	5,5 g	0 d
+ G.f - P	77,0 bc	11,7 c	72,0 a
Témoins + P	45,0 e	10,8 d	0 d
+ G.f + P	79,8 b	12,1 c	60,0 bc

Chaque valeur représente la moyenne de six répétitions. Dans chaque colonne, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à P = 0,05.

Comportement en plein champ des vitroplants inoculés lors du sevrage

Les *vitroplants* transférés en plein champ ont eu 100% de reprise. Après 12 semaines, tous les plants endomycorhizés ont présenté une croissance significativement plus élevée par

rapport aux témoins non inoculés (Tableau 3). Il est intéressant de noter que la différence de l'effet endomycorhizien observé en chambre climatisée entre *G. mosseae* et *G. fasciculatum* s'est estompé au champ. La meilleure croissance obtenue en chambre climatisée chez les plantes inoculées avec *G. fasciculatum* pourrait être due à la capacité de ce champignon de coloniser plus rapidement les racines. Les résultats rapportés ici montrent clairement que la recherche de l'expression maximale de l'effet bénéfique des endomycorhizes VA passe non seulement par le choix du champignon VA, du substrat mais aussi par le moment de l'inoculation. Nos travaux démontrent que l'endomycorhization *post vitro* est d'autant plus efficace qu'elle est pratiquée conjointement à un sevrage précoce des plantes, c'est-à-dire très tôt dans le processus de rhizogenèse. De ce fait, les endomycorhizes se développent en même temps que les racines dans le milieu de sevrage, rendant tout autre inoculation inutile.

Ce procédé présente plusieurs avantages. Tout d'abord, il raccourcit sensiblement le temps de séjour du *vitroplant* dans le tube. Ensuite, il permet de conjuguer efficacement les processus d'acclimatation et d'endomycorhization pour disposer rapidement des plants très vigoureux à repiquer que par la pratique habituelle. Et comme les *vitroplants* pourront être repiqués aussi dans des substrats non désinfectés contenant des champignons VA indigènes, l'inoculation précoce au sevrage assure l'introduction et l'installation de souches fongiques performantes. Enfin, cette méthode d'endomycorhization au sevrage présente l'avantage de réduire considérablement la quantité d'inoculum VA nécessaire, car avec 100 g d'inoculum il est possible d'inoculer 500 plantes. Cela est intéressant quand on sait que la production massive d'inoculum de bonne qualité est le principal obstacle à l'utilisation raisonnée des endomycorhizes VA en production végétale (Gianinazzi *et al.* 1988).

Tableau 3. Influence de l'inoculation au sevrage sur la croissance du porte-greffe de vigne (SO₄102) en parcelles désinfectées au champ

Traitements	Poids frais des parties aériennes (g)	
	Expérience 1	Expérience 2
Plantes témoins	150 b	238 b
Plantes inoculées avec:		
<i>Glomus mosseae</i>	508 a	-
<i>Glomus fasciculatum</i>	474 a	546 a

Chaque valeur représente la moyenne de neuf répétitions. Dans chaque colonne, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à $P = 0,05$.

Production et caractérisation de l'antisérum contre Gig. margarita

ELISA: L'antisérum brut et la fraction enrichie en IgG ont été testés en ELISA sur des extraits des spores de *Gig. margarita*. Les résultats ont montré que c'est l'antisérum obtenu

10 semaines après la première injection qui est le plus réactif. L'antisérum dilué au 1 : 100 donne sur des extraits de spores contenant 200 ng/ml de protéines, des valeurs de D.O. de l'ordre de 1,08 et 0,85 respectivement, avec l'antisérum brut et la fraction enrichie en IgG. Avec des dilutions élevées (1:1000), des réactions nettement positives ont été observées (Figure 1A). Par contre avec le sérum préimmun ou en absence d'antigènes, aucune réaction positive n'a été observée. Un test ELISA effectué à une dilution fixe (1: 100) d'antisérum enrichi en IgG a montré que les réactions antigènes-anticorps sont proportionnelles à la concentration d'antigènes et que le seuil de détection peut être fixé à 25 ng de protéine/ml (Figure 1B).

DIBA: Cette technique a été utilisée pour étudier les relations immunologiques existant entre les autres espèces de champignons VA. Les résultats (non rapportés ici) indiquent que les anticorps obtenus contre *Gig. margarita* présentent des réactions croisées vis à vis des extraits de spores d'autres champignons VA tels que *G. caledonicum*, *Acaulospora laevis* et deux espèces de *Scutellospora*.

Identification par immunoblotting de quelques antigènes ayant servi à préparer l'antisérum contre Gig. margarita

Les résultats sont illustrés sur la Figure 2. La séparation électrophorétique des protéines solubles de spores de *Gig. margarita* précipitées à l'acétone à 80% montre huit bandes bien distinctes d'intensité variable ayant les Rf suivants: (1) 0,415; (2) 0,321; (3) 0,226; (4) 0,169; (5) 0,134; (6) 0,113; (7) 0,037; (8) 0,018 (Figure 2A). L'électrotransfert correspondant, après incubation avec l'antisérum (fraction enrichie en IgG) montre qu'au moins cinq protéines réagissent avec les anticorps; ce sont les bandes n° (1), (3), (4) et faiblement (5) et (6) (Figure 2B). Par contre, l'analyse électrophorétique suivi d'électrotransfert de la fraction soluble de broyats de spores d'autres champignons VA (*G. mosseae*, *G. monosporum* et *A. laevis*) n'a pas donné des réponses immunologiques positives avec les anticorps produits contre *Gig. margarita*.

Détection de Gig. margarita dans les racines infectées

Les extraits des racines de vigne témoins et infectées par *Gig. margarita* sont testés en ELISA en utilisant la fraction enrichie en IgG dilué au 1: 100. Les résultats sont présentés dans le tableau 4. Les extraits des racines infectées montrent un valeur de D.O. significativement plus élevée comparée à celle de plantes témoins. Ces dernières donnent des valeurs de D.O. très faibles, ce qui laisse supposer qu'il n'y a pas eu de réaction croisée due au matériel végétal. Cependant, la réponse du test ELISA change avec l'âge des plantes endomycorhizées et diminue significativement entre six et 15 semaines après l'inoculation. Cette diminution de la réponse immunologique des extraits n'est pas due à une baisse de la concentration en protéines des racines qui, au contraire augmente en même temps que le taux d'infection. Ces résultats montrent que les anticorps produits à partir de la fraction soluble de broyats de spores de *Gig. margarita* sont capables de détecter l'antigène fongique dans les racines infectées et les réactions sont fortement positives durant les premières étapes de l'infection. L'étude immunocytochimique en microscopie électronique et optique a confirmé ces résultats.

Les anticorps reconnaissent les antigènes localisés dans le compartiment cytoplasmique des hyphes de *Gig. margarita*, qu'ils soient issus de la germination des spores ou dans les racines mycorhizées (résultats non montrés). Par contre, aucun immunomarquage n'a été détecté sur les hyphes morts, seuls ou dans les racines. De plus, une réaction croisée a été observée avec *Glomus monosporum* et *G. caledonicum* mais pas avec *G. intraradices*.

Figure 1A. Influence de la dilution de l'antisérum de *Gig. margarita* sur la réponse des extraits solubles de spores en ELISA

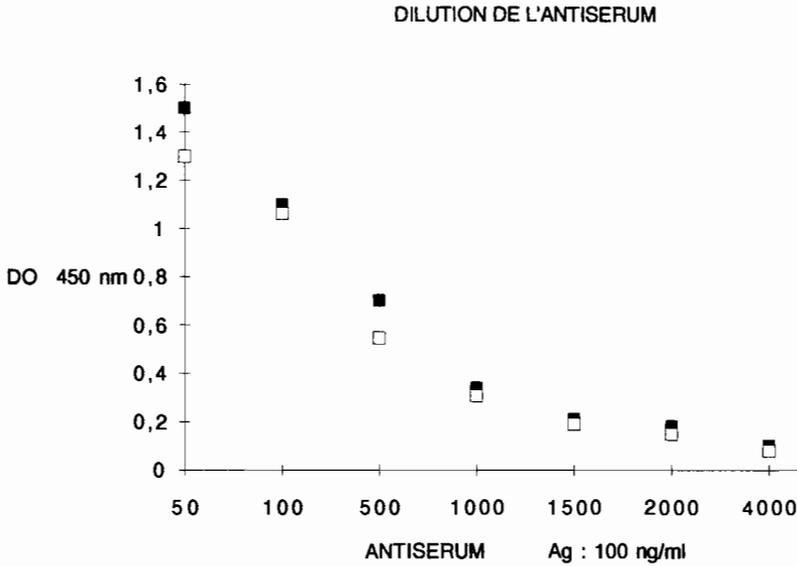


Figure 1B. Influence de la dilution des antigènes dans les extraits de spores de *Gig. margarita* sur la réponse à l'antisérum en ELISA

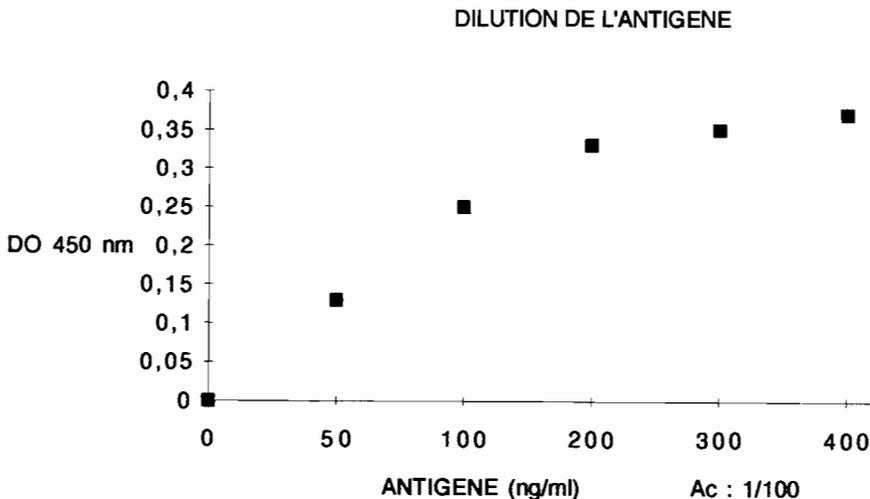


Figure 2. (A) Electrophorégramme sur gel de polyacrylamide à 12% en conditions non dénaturantes des protéines solubles de *Gig. margarita* (après précipitation à l'acétone à 80%) et (B) l'immunoblot correspondant après réaction avec les anticorps.

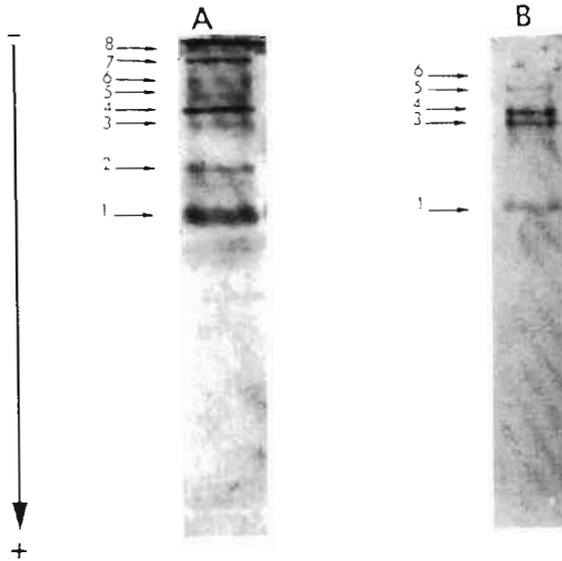


Tableau 4. Détection des antigènes fongiques dans les extraits racinaires de vignes

Semaine après inoculation	Traitement	Teneur en protéines g/l	Taux d'infection M%	D.O. à 450 nm des extraits dilués à		
				ND	1: 2	1: 10
6	Témoins	0.34 b	0.0 c	0.002 b	0.005 c	0.005 c
	+ <i>Gi. margarita</i>	0.36 b	49.0 b	0.088 a	0.181 a	0.311 a
15	Témoins	0.50 a	0.0 c	0.002 b	0.003 c	0.004 c
	+ <i>Gi. margarita</i>	0.54 a	65.0 a	0.002 b	0.035 b	0.130 b

Chaque valeur représente la moyenne de quatre répétitions. Dans chaque colonne, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à P = 0,05.

Les résultats obtenus montrent que l'antisérum que nous avons produit possède des anticorps capables de reconnaître spécifiquement les antigènes contre lesquels ils sont dirigés. Cette reconnaissance est possible, que le champignon soit seul sous forme de spores non germés, d'hyphes issus de germination ou en association dans les racines sous forme d'arbuscules. Ces observations suggèrent que ces stades morphologiques du champignon VA présentent le même motif antigénique que ces anticorps peuvent reconnaître, du moins pendant les premières phases de l'infection. En effet, bien que l'infection endomycorhizienne VA et la teneur en protéines observées chez les plantes de vigne infectées par *Gig. margarita* augmentent entre

six et 15 semaines après l'inoculation, la réponse au test ELISA, effectué pour détecter le champignon dans l'extrait racinaire au cours de cette même période, diminue comme si le vieillissement de l'infection se traduisait par une diminution de l'antigenicité des extraits de racines infectées. Cela est confirmé par le fait qu'en immunocytochimie les hyphes morts ne réagissent pas avec les anticorps.

L'immunoblotting des antigènes ayant servi à préparer l'antisérum contre *Gig. margarita*, nous a permis de mettre en évidence qu'au moins cinq protéines réagissent avec les anticorps obtenus. Par contre, aucune réponse positive n'a été observée lorsque ce sont les antigènes protéiques des autres champignons VA qui ont été testés. Ces résultats semblent en contradiction avec ceux du test DIBA dans lesquels les anticorps obtenus montrent des réactions croisées vis à vis d'autres champignons mais en fait, ils se complètent.

En effet, les réactions positives observées dans le test DIBA seraient dues à des antigènes de nature autre que protéique (glycoprotéique, polysaccharidique ...) fortement adsorbés par la feuille de nitrocellulose et ayant réagi avec l'antisérum, qui lui-même pourrait être constitué par une population d'anticorps dirigés contre ces antigènes de par sa nature de départ. Cette hypothèse a été vérifiée récemment par les travaux de Sanders *et al.* (1992) qui ont montré que l'aspécificité des anticorps polyclonaux obtenus à partir de la fraction soluble des spores est liée à la présence des glycoconjugués communs aux différents champignons VA, et que la nature spécifique des anticorps dépend de la présence d'antigènes protéiques dans les extraits.

CONCLUSION

Nos travaux ont permis de proposer une possible stratégie d'intégration de l'endomycorhization VA dans le processus de micropropagation des plantes. Avec le développement de plus en plus important de la production des *vitroplants* fruitiers, ornementaux et forestiers et l'utilisation quasi-générale de substrats artificiels et de la désinfection en pépinière, la méthode d'endomycorhization que nous avons proposée devrait trouver des applications fort intéressantes pour l'utilisation des champignons VA en vue de l'amélioration de la production des plants micropropagés. Elle devrait permettre aussi d'obtenir des jeunes plants dotés d'un système racinaire plus performant et apte à résister aux stress biotiques et abiotiques qu'ils rencontrent lors de leur croissance et développement.

Pour atteindre ce but il faudra procéder à une sélection de champignons VA efficaces pour chaque type de culture, mais surtout pour les différents objectifs et caractères recherchés (augmentation de la résistance aux stress, adaptation à certains écosystèmes, stimulation de la nodulation ...). Enfin, nous avons produit des anticorps polyclonaux contre *Gig. margarita* à partir de la fraction soluble de broyats de spores. L'utilisation de ces anticorps en immunoblotting et en immunocytochimie, en complément des tests immunoenzymatiques (ELISA, DIBA) nous a permis de diversifier les approches expérimentales dans la détection immunologique des différentes espèces fongiques VA mais surtout de montrer que de tels anticorps peuvent représenter un moyen pour détecter spécifiquement des champignons VA seuls ou en association symbiotique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aldwell F.E.B., Hall I.R. and Smith J.M.B. (1983). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to identify endomycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem* 15: 377-378.
- Aldwell F.E.B., Hall I.R. and Smith J.M.B. (1985). Enzyme immunosorbent assay as an aid to taxonomy of the Endogonaceae. *Trans. Br. mycol. Soc.* 84: 399-402.
- Benin M. (1989). Recherches sur l'évaluation de la variabilité ampelométrique et enzymatique inter et intravariétale chez la vigne. Thèse de Doctorat, Université de Bourgogne, Dijon, 212 pp.
- Blum H., Beier H. and Gross H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Bradford M.M. (1976). A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Burgermeister W. et Keoning R. (1984). Electroblot Immunoassay. A means for studying serological relationships among plant viruses. *Phytopath. Z.* 111: 15-25.
- Carre M., Martin-Tanguy J., Mussillon P. et 1
- Martin. (1979). La culture de méristèmes et la multiplication végétative *in vitro* au service de la pépinière. Publ. INRA, ANPPF, INVUELEC. *Petits fruits* 14: 8-65.
- Clark M.E. and Bar-Joseph M. (1984). Enzyme immunosorbent assay in plant virology. *In: Methods in Virology.* K. Maramorosch and Korrowskj Eds. Vol VII, pp. 51-85.
- Davis B.J. (1964). Disc electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Science* 121: 404-427.
- Gianinazzi S., Trouvelot A. et Gianinazzi-Pearson V. (1989). Valorisation par les endomycorhizes en agriculture: une reflexion nécessaire pour l'arboriculture fruitière et d'ornement. *C.R. 8ème Colloque sur les Recherches Fruitières*, INRA-CTIFL, 119-129.
- Gianinazzi S. and Gianinazzi-Pearson V. (1992). Histology, cytochemistry and immunocytochemistry as tools for studying structure and function in endomycorrhizae. *Methods in Microbiology* 24: 109-139.
- Martin C., Vernoy R. et Carre M. (1987). Vignes et techniques de cultures "*in vitro*". Quelques résultats d'une collaboration entre recherche publique et entreprise privée. *Bulletin de l'O.I.V.*, pp. 675-676.
- Phillips J.M. and Hayman D. S. (1971). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Ravolanirina F., Gianinazzi S., Trouvelot A. and Carre M. (1990). Production of endomycorrhizal explants of micropropagated grapevine rootsocks. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 29, 1/4, 323-327.
- Ravolanirina F., Gianinazzi-Pearson V. and Gianinazzi S. (1987). Preliminary studies on *in vitro* endomycorrhizal inoculation of micropropagated tree species of nutritional value. *In: Trees and Mycorrhizae.* F.S.P. Ng Ed. *Proceedings of the Asian seminar IFS.* pp. 91-101.
- Sanders I.R., Ravolanirina F., Gianinazzi-Pearson V., and Gianinazzi S. (1992). Detection of specific antigens in the vesicular arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora margarita* and *Acaulospora laevis* using polyclonal antibodies to soluble spore fractions. *Mycol. Res.* 96 (in press).
- Schubert A. and Camarata S. (1986). Effect of inoculation with different endophytes on growth and P nutrition of grapevine grown in pots. *In: Physiological and genetical aspects of mycorrhizae.* V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi Eds., INRA, Paris. pp. 327-331.
- Straker C.J., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S., Cleyet-Marel J.C. and Bousquet N. (1989). Electrophoretic and immunological studies on acid phosphatase from a mycorrhizal fungus of *Erica hispidula* L. *New Phytol.* 111: 215-221.
- Trouvelot A., Kough J.L. et Gianinazzi-Pearson V. (1986). Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche des méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. *In: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae.* V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi Eds. INRA, Paris. pp. 217-221.

DIVERSITE GENETIQUE DES ACACIAS SAHELIENS: EXPLOITATION PAR LES VOIES CLONALES ET SEXUEE

A. BORGEL*, C. CARDOSO*, M.-H. CHEVALLIER**
P. DANTHU**, J.-M. LEBLANC*

Génétique et Amélioration des Plantes, ORSTOM Dakar*

Génétique et Amélioration des Ressources Forestières, ISRA/DRPF Dakar**

Résumé: Depuis la fin des années 60, les causes et les conséquences de l'avancé du désert du Sahara vers le sud sont l'objet de nombreuses études tant au niveau climatique et agro-écologique que socio-économique et démographique. La déforestation qui touche l'aire sahélienne en est un des symptômes les plus spectaculaires. Une estimation de 1977 indique que 60% des Acacia senegal du Nord-Ferlo avaient disparu à la suite des grandes sécheresses. Ces pertes touchent tout aussi bien les autres espèces d'Acacias sahéliens. Une étude de la diversité génétique des populations restantes des différentes espèces d'Acacias devient une nécessité si l'on veut entreprendre des programmes de reboisement en ayant le souci de conserver une richesse génétique dans les populations à mettre en place.

Des études antérieures montrent que l'on pourrait assimiler plusieurs espèces d'Acacia à un groupe d'espèces à l'intérieur duquel des flux géniques ne sont pas exclus. Cette hypothèse est à tester avec les moyens modernes de l'exploration comparative des génomes des différentes espèces.

Nos travaux actuels portent sur l'analyse de la variabilité génétique intra et inter populations des Acacias; d'une part par l'étude des électrophorogrammes d'isoenzymes, et d'autre part par la mise en place d'essais comparatifs multilocaux sur le terrain.

Afin de mettre en évidence la part génétique de la variabilité observée vs. la part environnementale, nous avons choisi de travailler avec des clones plutôt qu'avec des populations hétérogènes. Pour ces aspects, le bouturage horticole n'est pas le moyen de propagation habituel, aussi avons nous choisi d'étudier leur aptitude à la micropropagation in vitro. Pour cela, le laboratoire a entrepris les études de physiologie du développement in vitro: rajonissement, multiplication conforme et enracinement.

Le but final de notre démarche est de promouvoir la plantation multiclonale de vergers à graines améliorés dans les centres agricoles. Les descendances par polycross ou par croisements contrôlés récoltées dans ces vergers serviront aux opérations de reboisement en y apportant un gain génétique et en tenant compte de la conservation nécessaire de la diversité.

Abstract: Since the end of the 1960s, climatological, agro-ecological, socio-economic and demographic studies have been carried out on the causes and consequences of the Sahara's continued extension towards the south. Deforestation of the Saharan desert region is one of the most spectacular symptoms. According to a 1977 estimate, 60% of the Acacia senegal of North Ferlo have disappeared as a result of the drought. Other Acacia species in the Sahel have suffered the same fate. A study of the genetic diversity of the remaining populations of Acacia species is essential if the genetic heritage of the past is to be preserved in future reforestation programmes.

Studies show that several Acacia species could be considered as a group of species wherein genes have perhaps moved around. This hypothesis needs to be tested using modern means for making comparative studies of genomes of different species.

At present we are looking for inter- and intra-population genetic variability in Acacias, by studying the electrophoregrammes of the isoenzymes and by carrying out multilocational comparative field trials.

In order to better weigh the genetic origin of observed variability against the environmental origin, we decided to work with clones rather than with heterogeneous populations. In these species, cuttings are not usually used in plant propagation work, so we decided to study their aptitude for in vitro micropropagation. The laboratory thus made special physiological studies of in vitro development: rejuvenation, standard propagation and rooting.

Our ultimate aim is to promote multiclonal plantations of improved seed orchards in agricultural centres. Progeny from polycrossing or from controlled crossing in these orchards will be used in reforestation operations, making genetic improvement possible, while maintaining genetic diversity.

APPLICATION DES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE A L'ETUDE DE LA DIVERSITE GENETIQUE DES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES

Diana FERNANDEZ
Laboratoire de Phytopathologie Tropicale
ORSTOM BP 5045
34032 Montpellier cedex 1 France

Résumé: La diversité génétique des microorganismes phytopathogènes au sein d'une population s'exprime au niveau phénotypique par des types morphologiques distincts, par exemple, ou encore par des pouvoirs pathogènes très différents. La variabilité du pouvoir pathogène se traduit au niveau de l'interaction hôte-parasite par des variations au niveau de la virulence (on définit alors des pathotypes ou des races au sein d'une même espèce de champignon) et par des variations au niveau de l'agressivité de chacun des individus qui compose cette population. Cette diversité génétique confronte le phytopathologiste à des problèmes d'identification et de caractérisation du pathogène et le sélectionneur à des problèmes d'obtention de matériel végétal résistant.

Des techniques récentes de biologie moléculaire permettent l'analyse directe du génome. En général, les champignons, organismes eucaryotes, possèdent un génome constitué d'une part d'un nombre variable de chromosomes nucléaires et, d'autre part, d'un chromosome mitochondrial. La variabilité génétique au sein d'une espèce est liée à des variations dans la séquence des acides nucléiques portant l'information génétique. Etant donné la grande taille du génome chez les champignons (10 à 50 millions de paires de bases), l'analyse du polymorphisme génomique se limite à l'étude de certaines parties caractéristiques.

L'approche la plus développée jusqu'à présent chez les champignons phytopathogènes est l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) qui révèle toute mutation au niveau des sites de restriction de l'ADN. Cette technique permet ainsi d'estimer les distances génétiques entre les individus et d'obtenir des marqueurs moléculaires caractéristiques d'un genre ou d'une espèce. En utilisant des sondes d'ADN multi-locus, on peut affiner le niveau de spécificité des marqueurs moléculaire en obtenant des "fingerprint" ou empreintes génétiques spécifiques d'un individu ou d'un groupe d'individus. Récemment, il a été montré que l'on pouvait obtenir des empreintes génétiques en amplifiant au hasard des séquences polymorphes sur le génome par la technique dite des RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), dérivée de la PCR (Polymerase Chain Reaction).

Ces techniques seront présentées illustrées par les principaux résultats obtenus sur les champignons phytopathogènes.

Abstract: The genetic diversity of phytopathogenic microorganisms within a given population can be identified, as far as the phenotype is concerned, either through differences in morphological type, or through great differences in pathogenic capacity. The latter, as concerns host-parasite interaction, results in differences in virulence (in this case the pathotypes or the race within the fungus species are determined) and aggressivity of each of the individuals in the population. Because of this genetic diversity, the plant pathologist has to cope with problems of pathogen identification and characterization, while the plant breeder has to work to obtain resistant plant matter.

Modern molecular biology techniques can be used to make direct analyses of the genome. Fungi are eucaryotic organisms which usually have a genome composed on a variable number of nuclear chromosomes and, also a mitochondrial chromosome. Genetic variability in a species is related to variations in the sequence of nucleic acids that bear the genetic information. Considering the volume of the genome in the fungi (10 to 50 million base pairs), analyzing the genomic polymorphism means studing certain representative parts.

The most advanced approach used to date on phytopathogenic fungi is the analysis of the RFLP (restriction fragment length polymorphism) which brings out all the mutations that occur in the DNA restriction sites. This technique can also be used to assess the genetic distance between individuals and to obtain molecular markers that characterize a genus or a species. By using multi-locus DNA probes, the specificity of the molecular markers can be further detailed through the obtention of fingerprints which are (genetically) specific to an individual or a group of individuals. Research carried out recently allows genetic fingerprints to be obtained by random amplification of polymorphic sequences on the genome using the RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) technique which has been derived from the PCR (Polymerase Chain Reaction).

These techniques will be reported and illustrated using results obtained on phytopathogenic fungi as an example.

TAXONOMIE, CHARACTERISATION ET IDENTIFICATION IN SITU DES SOUCHES DE FRANKIA

Pascal SIMONET

Laboratoire d'Ecologie Microbienne du Sol, URA CNRS 1450
Université Lyon 1 Villeurbanne F-69622 Cedex, France

Résumé: *Frankia est un actinomycète qui a établi une symbiose fixatrice d'azote avec un grand nombre de plantes dicotylédones ligneuses. En fait, les véritables études sur cette symbiose n'ont débuté que très récemment avec l'isolement en 1978 de la première souche de Frankia. Depuis cette date, de nombreuses souches ont pu être isolées en culture pure à partir de différentes plantes actinorhiziennes de la flore européenne, américaine, océanienne ou africaine.*

Les premières tentatives de classification des souches de Frankia ont été basées sur leur pouvoir d'infection ce qui a permis de définir trois grands groupes d'inoculation croisée. Toutefois, un certain nombre de souches se sont révélées capables de franchir les barrières d'incompatibilité reposant ainsi les problèmes de classification au sein de ce genre. Afin de répondre aux problèmes de caractérisation, d'identification et de taxonomie des isolats de Frankia nous avons développé une panoplie d'outils basés sur les techniques de Biologie Moléculaire. Les hybridations ADN-ADN ainsi que les séquences des gènes ribosomiques et de structure de la nitrogénase ont permis d'apporter une base aux problèmes de taxonomie et de phylogénie chez Frankia. Par ailleurs, l'utilisation de plasmides cryptiques puis les séquences nif et ribosomiques ont permis de définir des signatures pour chaque souche permettant d'identifier et de suivre ces isolats dans les nodules ou dans le sol.

Nous présenterons ainsi quelques résultats de tests de compétitivité pour la nodulation obtenus par hybridation de type Southern ou par PCR.

Abstract: *Frankia is an actinomycete which has established a nitrogen-fixing symbiosis with a great number of woody dicotyledonous plants. Studies of this symbiosis only started in 1978 when the first Frankia strains were isolated. A lot of strains are now available, having been isolated from actinorhizal plants from Europe, America, Oceania and Africa.*

The first attempts to classify the Frankia strains were based on nodulation abilities and permitted three major cross-inoculation groups to be established. However, these experiments were conducted using crushed nodules as inocula and numerous strains showed that they were able to cross boundaries of incompatibility, which proved that more accurate methods of classification and characterization were needed. This was done by developing a large range of tools based on molecular techniques. DNA-DNA hybridization studies and sequences of the ribosomal and nitrogenase genes were used to assess the Frankia taxonomy and phylogeny. Moreover, cryptic plasmids and nif and rrn sequences have enabled a signature for each strain to be defined allowing the identification of these strains in the nodules and in the soil.

Results concerning competitiveness tests using Southern hybridizations and PCR will be presented and discussed.

**VARIABILITE DANS LE POUVOIR PATHOGENE DES ISOLATS
ET SOUCHES DE *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *ALBEDINIS*,
AGENT DE LA FUSARIOSE VASCULAIRE (BAYOUD) DU PALMIER DATTIER**

My Hassan SEDRA
Laboratoire de Phytopathologie
Centre Régional du Haouz-Présahara
INRA BP 533 Marrakech-Maroc

Résumé: L'étude de l'agressivité des isolats et de souches du Fusarium oxysporum f.sp. albedinis prélevés dans différentes palmeraies a permis de mettre en évidence un gradient dans les niveaux d'agressivité. Sur des plantules de palmier dattier issues de deux croisements réalisés entre parents sensibles ou résistants, on distingue trois groupes d'isolats présentant des niveaux différents d'agressivité allant de 5% à 100% d'attaque. En outre, l'inoculation de trois souches du parasite à des plantules issues de cinq croisements différents a montré que certaines souches se sont révélés peu ou pas pathogènes sur les descendants de certains croisements. D'autre part, la confrontation entre certaines souches isolées de cultivars ou "variétés" résistants et quelques génotypes de palmier a mis en évidence l'absence d'attaque d'un génotype par une souche du parasite. Les résultats indiquent donc qu'il y a une certaine interaction souche x croisement et souche x génotype.

Abstract: A study of the aggressiveness of Fusarium oxysporum f. sp. albedinis strains and isolates sampled from various palm groves shows that aggressiveness follows a gradient. Out of date palm plantlets produced by two crosses of susceptible or resistant parents, there were three groups of isolates with levels of aggressiveness ranging from 5% to 100%. Further inoculating three strains of the parasite in plantlets produced from five different crosses showed that certain strains had little or no pathogenic effect on the progeny of certain crosses. Inoculation of certain strains that have been isolated from resistant varieties with certain palm tree genotypes, showed that there was one genotype that was not attacked by one strain of the parasite. The results thus indicate the existence of an interaction between the strain and the cross and between the strain and the genotype.

Le Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) causée par *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* est la maladie la plus redoutable en Afrique du Nord. En effet, en l'espace d'un siècle, il a détruit plus de 10 millions de palmiers au Maroc (Pereau-Leroy 1958) et 3 millions d'arbres en Algérie (Djerbi 1982). Cette maladie épidémique constitue une menace potentielle pour la Tunisie et les autres pays producteurs de dattes. Au Maroc, la voie jusqu'ici privilégiée pour lutter contre le Bayoud est la sélection variétale pour la résistance à la maladie.

Plusieurs travaux réalisés dans ce sens ont été publiés (Pereau-Leroy 1958, Louvet et Toutain 1973, Saaïdi *et al.* 1981, Djerbi *et al.* 1986, Saaïdi 1989, Sedra 1989a, 1989b, 1990, 1992). Par ailleurs, pour reconstituer la palmeraie dévastée par la maladie, il est nécessaire de n'utiliser que des cultivars (variétés) et clones de palmier présentant le maximum de garantie de résistance sur le terrain. Pour cela, la connaissance de la population naturelle du parasite sur les plans qualitatif et quantitatif et des interactions hôte-parasite s'impose. Plusieurs auteurs ont constaté que la population du parasite est répartie de façon très hétérogène dans

les sols de palmeraie et que sa densité est faible (Bulit *et al.* 1967, Louvet *et al.* 1970, Abbassi 1981, Sedra 1985, Djerbi *et al.* 1985, Tantaoui 1989).

L'objectif de ce travail est d'étudier les aptitudes pathogènes d'une gamme d'isolats de *F. o. f.sp. albedinis* isolés de différentes variétés et qui proviennent de régions phoénicoles plus ou moins éloignées. Cette étude permettrait en outre de sélectionner des souches ou des isolats du pathogène très agressifs en vue de leur utilisation dans les tests de sélection variétale et de screening des palmiers pour leur résistance au Bayoud; et de déceler certaines interactions hôte-parasite.

MATERIEL ET METHODES

Matériel fongique

Seize isolats et sept souches monospores ont été isolés initialement à partir de palmes atteintes de Bayoud prélevées de plusieurs variétés dont le comportement à l'égard de la maladie est varié selon la classification établie par Pereau-Leroy (1958), Louvet et Toutain (1973) et Saaidi *et al.* (1981) (Tableau 1). Ces isolats proviennent des principales palmeraies marocaines: Drâa, Ziz, Tafilalet et Bani.

Après isolement, le champignon est conservé dans le sable stérile à la mycothèque. L'inoculum utilisé est produit sur milieu gélosé PDA à base d'extrait de pomme de terre (250 g/l), glucose (2%) et de gélose (2%). Les colonies développées sur le milieu et âgées de huit jours sont récupérées puis mises en suspension dans l'eau stérile. Après élimination du mycélium par filtration, la concentration de l'inoculum est ajustée à 10^6 spores par ml.

Matériel végétal

Production de plantules de palmier issues de graines

Le matériel utilisé est constitué de plantules issues de différents croisements contrôlés entre des parents sensibles et parents résistants (Tableau 2). La résistance des parents mâles, représentés par des individus uniques n'est pas confirmée. La résistance ou la sensibilité des parents femelles est connue.

Il est vraisemblable que les descendants de croisements sont génétiquement différents étant donné l'hétérozygotie et la dioïcie du palmier. Faute de *vitroplants*, nous avons utilisé les graines dans les premiers essais.

Pour avoir une idée précise sur le matériel utilisé, nous avons estimé préalablement le taux d'homogénéité des descendants sur le caractère de résistance ou de sensibilité (Tableau 2). Les graines sont utilisées après une phase de prégermination qui nécessite huit à dix jours d'incubation (sous des conditions précises de température et d'humidité (Sedra, résultats non publiés).

Tableau 1. Origine des isolats et des souches du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*

Isolat ou souche	Parasite isolé des cultivars		Localité géographique
	Nom du cultivar	Comportement à l'égard du Bayoud	
1 TB	Boufeggous	TS	Tabouassant (T)
2 Z	Boufeggous	TS	Zagora (D)
3 TB	Mejhoul	TS	Tabouassant (T)
4 Z	Bouskri	TS	Zagora (D)
5 Z	Jihel	AS	Zagora (D)
6 Z	Ahardane	S	Zagora (D)
7 Z	Iklane	R	Zagora (D)
8 Z	Boufeggous ou Moussa	R	Zagora (D)
9 Z	Mekt	AS	Zagora (D)
10 Z	Outoukdime	PR	Zagora (D)
11 Z	Outoukdime	PR	Zagora (D)
12 Z	Azigzao	AS	Zagora (D)
13 Z	BelHazit	AR	Zagora (D)
14 MZ (Fao 66)	Boufeggous	TS	Zagora (D)
15 MTF	Boufeggous	TS	Tafilalet (T)
16 MTB	Mejhoul	TS	Tabouassant (T)
MNS1	Boufeggous	TS	Achouria (T)
MNS2	Boufeggous	TS	M'hamid (D)
MNS3	Boufeggous	TS	Zagora (D)
Foa 133	Saïr	S	Tissergale (D)
Foa 145	Saïrlayate	R	Tata (B)
Foa 168	Boufeggous ou Moussa	R	Zagora (D)
Foa 172	Iklane	R	Zagora (D)

Tous les isolats exceptés 14 Mz, 15 MTF et 16 MTB sont isolés de palmes fraîches atteintes de Bayoud, les autres ont été pris de la mycothèque du laboratoire; ils y étaient conservés sur milieu gélosé (14MZ) et sur sable (15MF, 16 MTB). Les souches MNS1, MNS2 et MNS3 sont obtenues par cultures monospores. Les isolates Foa 145, Foa 168 et Foa 172 sont récemment isolées des variétés résistantes. Cultivars ou variétés très sensibles (TS), sensibles (S), assez sensibles (AS), peu résistantes (PR), assez résistantes (AR) et résistantes (R). D: vallée du Drâa, T: vallée du Ziz - Tafilalet, B: Bani, Zagora (Domaine Expérimental de l'INRA), Achouria et Tabouassant (ex - stations expérimentales de l'INRA).

Vitroplants obtenus par culture des tissus

Les *vitroplants* utilisés dans notre travail sont produits par organogénèse ou embranchement axillaire par le laboratoire de l'Institut National de Recherches Agronomiques (Marrakech) et

le laboratoire privé (Ouislane-Meknés). Ces plants élevés sur un substrat dans des sachets individuels, sont utilisés au stade végétatif de deux à trois feuilles.

Inoculation expérimentale des plantes

Pour les plantules issues de graines, l'inoculation des plantes a été réalisée selon la méthode mise au point par Sedra (1991a). Elle consiste à apporter l'inoculum liquide sur les racines à travers du sachet en plastique transparent et ceci à l'aide d'une pipette par perforation du sachet; trois graines étant semées initialement à la périphérie de chaque sachet. L'inoculation a lieu lorsque les plantules développent deux feuilles, stade végétatif favorable à l'infection selon les travaux de Nlendi (1978) et Saaidi (1979). Quant aux *vitroplants*, ils ont été inoculés par apport d'inoculum liquide sur les racines principales et latérales après enlèvement de la terre jusqu'à une profondeur de 5 cm (Sedra 1989c). Dans le cas des deux types de plant, on apporte 10 ml d'inoculum par plant à la concentration 10^6 conidies par ml. Les plants témoins reçoivent de l'eau. Le niveau d'agressivité des isolats est exprimé en pourcentage de plantes mortes après cinq à six mois de culture (22-27°C) en fonction des essais.

Tableau 2. Origine de plantules de palmier dattier issues de graines obtenues par croisements contrôlés

Croisement ♀ x ♂	Code	Comportement à l'égard du Bayoud	Taux d'homogénéité %
Boufeggous x mâle local	BFG x DS1	TS x S	84 - 93
Boufeggous x mâle local	BFG x ZS3	TS x S	85 - 94
Jihel x mâle local	JHL x ZS1	AS x S	81 - 92
Aguelid x mâle local	AGL x NP4	AS x R ?	60 - 74
Iklane x mâle local	IKL x NP4	R x R ?	85 - 92
Boutkammi noire x mâle local	BSTN x DR	R x R ?	75 - 81
Tadmante x mâle local	TDMT x ZS1	R x S	76 - 85

Variétés ou mâles sensibles (TS, S AS) au Bayoud résistantes (R); R ? : la résistance des palmiers mâles, individus uniques n'est pas confirmée; taux d'homogénéité estimé relativement au comportement du parent femelle à l'égard de la maladie. Il correspond au pourcentage de plants atteints (croisement TS ou AS ou S X S) par le Bayoud ou sains (croisement R X R ?) après inoculation artificielle de 3 séries de 50 plantes chacune par croisement avec le *F.o.f. sp. albedinis*

Evaluation des niveaux d'agressivité des isolats et des souches du parasite et étude du comportement des croisements et des génotypes de palmier

Dans l'essai 1, l'agressivité de 16 premiers isolats du parasite présentés dans le tableau 1 a été comparée sur les plantules de palmier issues de deux croisements entre parents sensibles

(BFG x DS1) et résistants (BSTN X DR) (Tableau 2). Deux répétitions de 20 plants chacune ont été utilisées par isolat et par croisement.

L'essai 2 consiste à étudier le pouvoir pathogène de trois souches monospores du parasite MNS1, MNS2 et MNS3 (Tableau 1) sur les plantules de cinq croisements différents (BFG x ZS3, JHL x ZS1, IKL x NP4, AGL x NP4 et TDMT x ZS1) (Tableau 2). Pour chaque souche et chaque croisement, quatre répétitions de 20 plantes chacune ont été utilisées. D'autre part, l'essai 3 vise à étudier les interactions éventuelles entre quatre souches particulières du parasite isolées des variétés résistantes et les *vitro*plants de trois génotypes de palmier dattier.

RESULTATS

Comparaison de l'agressivité des isolats sur les deux croisements de palmier (essai 1)

La figure 1 indique une graduation importante et significative dans l'agressivité des isolats qui peuvent se grouper en trois niveaux d'agressivité. Le groupe I comprend six isolats à haut niveau d'agressivité sur les plantules de deux croisements. Le pourcentage moyen d'attaque des plantes varie de 70% à 100%. Le groupe II est composé de sept isolats qui sont plus agressifs sur le croisement des parents sensibles (65% à 95% d'attaque) et relativement moins agressifs sur le croisement des parents résistants (35% à 60%). Les trois isolats du groupe III manifeste un niveau moyen d'agressivité faible allant de 6% à 50% sur les deux croisements.

L'isolat Foa66 a montré une très faible agressivité sur les deux croisements. L'origine des isolats du *F.o.f.sp.albedinis* est un facteur non négligeable à prendre en considération. En effet, tous les isolats qui proviennent du Tafilalet et du Tabouassamt sont capables d'attaquer plus de 60% de plantules tandis que pour ceux de Zagora, les niveaux d'agressivité sont extrêmement variés (6% à 80% d'attaque). Les isolats 7Z et 8Z prélevés respectivement des variétés résistantes Iklane et Boufeggous ou Moussa appartiennent aux différents groupes d'isolats précités et présentent des niveaux d'agressivité extrêmement différents et opposés.

Aggressivité de trois souches monospores et comportement de cinq croisements (essai 2).

Le tableau 3 présente les niveaux d'agressivité des trois souches monospores sur cinq croisements étudiés. L'analyse statistique des résultats n'a révélé aucune différence significative entre les souches (30,7% à 40,1% d'attaque) sur tout le matériel végétal confondu mais elle permet de noter un comportement différent des croisements pour l'ensemble des souches (13,8% à 51,4%).

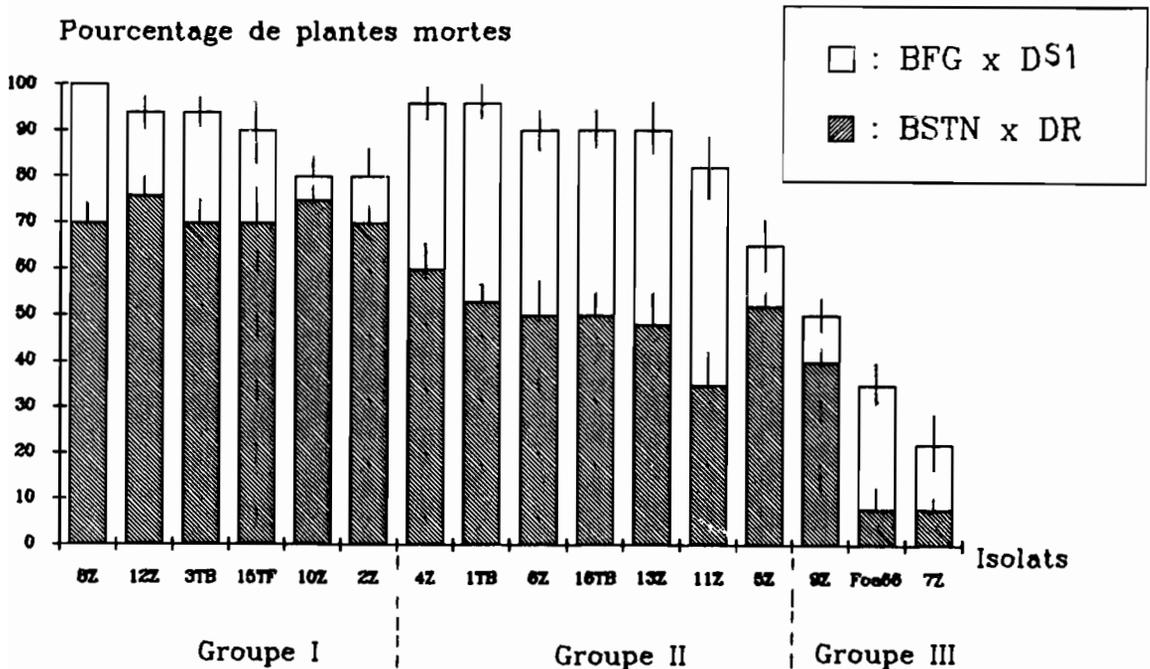
La souche MNS3 n'a attaqué aucune plantule du croisement réalisé entre les parents résistants (IKL x NP4) alors qu'elle est très agressive sur les autres croisements. La performance relative de certains croisements est donc modifiée en fonction des souches; il y a donc une interaction souche x croisement.

Tableau 3. Pourcentage de plants atteints de Bayoud évalué en fonction des croisements et des souches du parasite

Croisement	Souches du parasite						Moyenne
	MNS1	MNS2		MNS3			
BFG x ZS3	57,5(1)	aA	60,0	aA	36,6	aB	51,4a
JHL x ZS1	40,0	aA	25,0	cB	33,6	aB	32,8b
AGL x NP4	20,0	cA	38,3	cB	40,0	aB	32,8b
IKL x NP4	8,7	cA	33,0	bB	0,0	bA	13,8c
TDMT x ZS1	27,5	bA	44,1	bB	51,2	aB	40,9a
Moyenne	30,7	A	40,1	A	32,2	A	34,4

(1): Pourcentage moyen de plants atteints de Bayoud calculé à partir de 4 répétitions de 20 plants chacune. L'essai est conduit sous serre vitrée pendant 6 mois. L'analyse de la variance ($P=0,05$) ne révèle aucune différence significative entre les souches ($F_{cal} = 1,75$) mais une différence significative est observée entre les croisements ($F_{cal} = 7,99$) et les interactions souches-croisements ($F_{cal} = 2,31$). Les nombres suivis de la même lettre minuscule sur la même colonne ou majuscule sur la même ligne ne sont pas significativement différents pour $P = 0,05$ (test de Newman et Keuls).

Figure 1. Niveaux d'agressivité de 16 isolats de *F.o albedinis* sur des plantules de palmier issues de 2 types de croisements entre parents sensibles (BFG x DS1) et résistants (BSTN x DR). Pourcentage moyen (suivi de l'écart-type) de plants atteints calculé à partir de 2 répétitions de 20 plants chacune. Différence significative entre les isolats et les croisements pour $p = 0,05$ (analyse de variance).



Comportement de certaines souches particulières du parasite vis à vis de quelques génotypes de palmier (essai 3)

Le tableau 4 montre que les quatre souches du parasite sont toutes capables de provoquer les symptômes sur les *vitroplants* des génotypes exceptée la souche Foa 145 qui n'attaque pas le clone CH-1. Pour le cultivar Boufeggous sensible au Bayoud, le pourcentage d'attaque varie de 31,2% à 68,7% en fonction des souches contre seulement 12,5% à 33,3% pour le cultivar résistant Saïr Layalate. L'origine de production des *vitroplants* ne semble pas avoir une influence sur leur comportement vis-à-vis du Bayoud.

Tableau 4. Pourcentage de *vitroplants* atteints par le Bayoud en fonction des souches du *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* et des génotypes du palmier dattier

Souches du parasite (3)	Boufeggous (1)	Sairlayalate (1)	Clone CH-1 (1)	Clone CH-1 (2)
Foa 133	43,2* cA	33,3 aB	31,8 bB	17,3 bC
Foa 145	31,2 dA	28,6 aA	0,0 cB	0,0 cB
Foa 168	62,5 aA	25,0 aC	41,2 aB	12,5 bD
Foa 172	56,2 bA	12,5 bC	38,0 aB	60,7 aA
Foa MS	68,7 aA	25,0 aD	37,5 aC	56,2 cB
moyenne	52,5 A	19,5 C	29,1 B	30,5 B

* pourcentage moyen de plants atteints par le Bayoud 5 mois après l'inoculation avec le *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* (*F.o.a.*). Les nombres suivis de la même lettre majuscule sur la même ligne ou minuscule sur la même colonne) ne sont pas significativement différents pour $p = 0,05$ (test de Newman et Keuls). Cultivars Boufeggous (BFG) sensible, Saïr Layalate (SLY) résistant. (3): parasite Foa isolé des cultivars résistants SLY, BFGM (Boufeggous ou Moussa), Iklane (IKL) et du clone "Saïr". (1) et (2): *vitroplants* du clone CH-1 et des cultivars (BFG et SLY) produits par le laboratoire de culture des tissus de l'INRA (1) et le laboratoire privé de Oued Ouïslane (2).

DISCUSSION

Les résultats obtenus de l'essai 1 ont montré qu'il existe une différence importante dans l'agressivité des isolats en fonction non seulement de leur origine mais aussi du matériel avec lequel ils se confrontent. Le nombre des isolats étudiés n'est qu'un échantillon de l'ensemble des isolats naturels. Mais les résultats obtenus permettent de mettre en évidence une variabilité dans l'agressivité des isolats.

La comparaison de l'aptitude pathogène des isolats qui proviennent d'une même localité de la palmeraie (Domaine Expérimental de Zagora [INRA] indique en outre, que le niveau d'agressivité de ces isolats semble avoir une relation avec leur origine de prélèvement. Bulit *et al.* (1967) puis Dubost et Kada (1974) et enfin Tantaoui (1989) ont constaté que les souches

isolées à partir du sol sont moins agressives que celles isolées de palmes atteintes de Bayoud. Sedra (1991b) a ajouté que les souches de *F.o.f.sp. albedinis* isolées à partir d'un sol de palmeraie infesté artificiellement ont des capacités pathogènes plus élevées que celles des souches de type morphologique proche isolées du sol naturel. L'isolat Foa66 isolée en 1966 et utilisée dans les tests de résistance des descendants de plusieurs séries de croisements (Saaidi 1979) manifeste dans notre essai le plus faible niveau d'agressivité sur les deux croisements utilisés. D'autres essais ont montré que cet isolat a dégénéré et perdu en plus ses caractères morphologiques initiaux (Sedra 1982, Sedra et Djerbi 1985).

La confrontation des souches du parasite avec les plantules descendant de cinq croisements différents et les *vitroplants* de quelques cultivars de palmier a permis de révéler certaines interactions souche x croisement ou souche x génotype. Ces constatations permettent de penser à l'existence de différentes virulences ou races physiologiques chez le *F.o.f.sp.albedinis*. Ce type d'interaction a déjà été signalé dans le cas de plusieurs autres couples hôtes-parasite (Armstrong and Armstrong 1981). On peut encore expliquer les interactions souche MNS x descendants du croisement IKL x NP4 ou souche Foa 145 x clone CH-1 par la présence chez ces hôtes d'un matériel génétique approprié qui leur a conféré une résistance totale à ces souches.

Les résultats obtenus des essais 2 et 3 sont alors à prendre en compte en matière de sélection et d'évaluation de la résistance au Bayoud des palmiers, étant donné qu'ils permettent de réfléchir pour le choix des souches du parasite à utiliser et les concentrations d'inoculum à recommander dans les essais de screening variétal pour le caractère de résistance à la maladie. L'importance de ces facteurs a été déjà démontrée dans le cas d'autres fusarioses vasculaires (Douglas 1970, Martin and Laughlin 1983).

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Mr D. Fria et Mmes F. Chadly et K. Assari, techniciens du laboratoire pour l'aide technique et la réalisation pratique de ce travail. Mes remerciements vont aussi aux responsables du laboratoire privé de culture des tissus (Oued Ouislane-Meknès) et MM A Zaïd et Aït Chitt du laboratoire de physiologie végétale (INRA-Marrakech) pour notre approvisionnement en *vitroplants*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Armstrong G.M. and Armstrong J.K. (1981). *Formae specialis* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: *Fusarium, Diseases, Biology and Taxonomy*. P.E. Nelson, T.A. Toussoun and R.J. Cook, Eds. The Penn. State Univ., Press Univ. Park and London, pp. 391-399.
- Abbassi M.T. (1981). Distribution de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* dans le sol de différentes palmeraies dans la vallée du Drâa et du Ziz. Mémoire de fin d'études. Inst. Agro. et Vétér. Hassan II. Rabat, 45 pp.
- Bulit J., Louvet J., Bouhot D. et Toutain G. (1967). Recherches sur les fusarioses. I. Travaux sur le Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier en Afrique du Nord. *Ann. Epiphytie* 18:231-239.

- Djerbi M. (1982). Le Bayoud en Algérie, problèmes et solution, FAO. Regional projet for Palm and Dates Research. Centre in the Near East and North Africa Baghdad. Iraq, 45 pp.
- Djerbi M., Sedra, My H. et El Idrissi Ammari M.A. (1985). Caractéristiques culturales et identification du *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis*, agent causal du Bayoud. *Ann. Inst. Nat. Rech. Agr. Note de Rech. n°1*, 58:1-8.
- Djerbi M., Aouad H., El Filali H., Saaidi M., Chtioui A., Sedra, My H., Allaoui M., Hamdaoui T. and Oubrich M. (1986). Preliminary results on selection of high quality Bayoud resistant clones among natural date palm population in Morocco. Le 2^{ème} symposium sur le palmier dattier 3-6 Mars 1986. Univ. Roi Faïssal, Arabie Saoudite. pp. 386-399.
- Douglas D.R. (1970). The effet of inoculum concentration on the apparent resistance of muskmelons to *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. *Can. J. Bot.*, 48: 687-693.
- Dubost D. et Kada A. (1974). Etude expérimentale de l'inoculation de jeunes palmiers dattiers issus de semis par *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. *Bull. Agr. Sahar.* 1: 19-27. CNRA, EL Harrach-Algérie.
- Louvet J. et Toutain G. (1973). Recherches sur les fusarioses VII. Nouvelles observations sur la fusariose du Palmier dattier et précisions concernant la lutte. *Ann. Phytopathol.* 5:35-52.
- Louvet J., Bulit J., Toutain G. et Rieuf P. (1970). Le Bayoud, fusariose vasculaire du Palmier Dattier: symptômes et nature de la maladie: moyens de lutte. *Al Awamia, Rabat* 35:161-181.
- Martin R.D. and Laughlin R.J. Mc. (1983). Effects of inoculum concentration on the apparent resistance of watermelons to *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*. *Plant disease* 67: 493-495.
- Nlendi N. (1978). Recherches sur les relations entre l'ontogenèse vasculaire et le déroulement de la maladie chez le Palmier dattier atteint de fusariose. D.E.A. Fac. Sci. Univ. de Dijon, France.
- Pereau-Leroy P. (1958). Le palmier dattier au Maroc. Ministère de l'Agriculture. Service de la Recherche Agronomique. Maroc. 142 pp.
- Saaidi M. (1979). Contribution à la lutte contre le Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier. Thèse d'université. Dijon-France. 140 pp.
- Saaidi M. (1989). Programme d'amélioration génétique du palmier dattier au Maroc. Méthodologie, résultats et problèmes. Colloque sur la génétique de la résistance du palmier dattier au Bayoud. 2-7 Décembre 1989. Adrar. Algérie.
- Saaidi M., Toutain G., Bannerot H. et Louvet J. (1981). La sélection du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) pour la résistance au Bayoud. *Fruits* 4, 36:241-249.
- Sedra My H. (1982). Contribution à l'étude *in vitro* du polymorphisme du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, agent du Bayoud, maladie vasculaire du palmier dattier. (*Phoenix dactylifera* L.); mémoire; Certificat d'Etudes Approfondies. Univer. de Cadi Ayyad. Marrakech, Maroc. 52 pp.
- Sedra My H. (1985). Potentiel infectieux et réceptivité de quelques sols de palmeraie à la fusariose vasculaire de palmier dattier (Bayoud) causée par *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Kil et Maire) Malençon. Thèse de 3^{ème} cycle. Inst. Agro. et Vétér. Hassan II, Rabat, Maroc. 88 pp.
- Sedra My H. (1989a). Sélection en palmeraie des palmiers résistants au Bayoud et de bonne qualité du fruit: méthodologie, résultats et problèmes. Colloque sur la génétique de la résistance du palmier dattier au Bayoud 2-7 Décembre 1989. Adrar, Algérie 26 pp.
- Sedra My H. (1989b). Etude de l'hérédité de la résistance au Bayoud chez le palmier dattier: Intérêt de quelques facteurs à prendre en considération et étude de trois séries de croisement dirigés. Colloque sur la génétique de la résistance du palmier dattier au Bayoud. 2-7 Décembre 1989. Adrar-Algérie. 22 p.
- Sedra My H. (1989c). Recherche d'une méthode fiable d'évaluation de la résistance des *vitroplants* du palmier dattier: mise au point et application. Colloque sur la génétique du palmier dattier 2 au 7 Décembre 1989. Adrar, Algérie. 24 pp.

- Sedra My H. (1990). Preliminary results on the evaluation of the resistance to the Bayoud of the clones (Khalts), cultivars and some hybrids of the date palm trees selected on the fruit quality criterium. 8th Congress of Mediterranean Phytopathological Union, Agadir-Morocco, 1990. 529 pp.
- Sedra My H. (1991a). Mise au point d'une technique répétitive pour l'évaluation rapide de la résistance au Bayoud des plantules du palmier dattier obtenues par croisements contrôlés. (soumis à *Al Awamia-Rabat*).
- Sedra My H. (1991b). La fusariose vasculaire du palmier dattier. Possibilités d'identification du *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis* sur la base des caractéristiques morphologiques et culturales en relation avec le pouvoir pathogène (soumis à *Al Awamia-Rabat*).
- Sedra My H. et Djerbi M. (1985). Mise au point d'une méthode rapide et précise d'identification *in vitro* du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, agent causal du Bayoud. *Ann. Inst. Nat. Agr. Tunisie. Note de Recherches n° 2*, 58: 1-12.
- Sedra My H., El Filali H. et Frira D. (1992). Observations sur quelques caractéristiques phénotypiques et agronomiques des variétés et clones de palmier dattier sélectionnés (soumis à *Al Awamia-Rabat*).
- Tantaoui A. (1989). Contribution à l'étude de l'écologie de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, agent de la fusariose vasculaire du Palmier dattier/Bayoud: Densité et répartition de l'inoculum au sein du peuplement des *Fusarium* spp. dans le sol. Thèse de 3ème cycle. Univ. Caddi Ayyad. Marrakech, Maroc. 84 pp.

FACTEURS DE VARIATION DE LA RESISTANCE DU RIZ A LA PYRICULARIOSE CAUSEE PAR *PYRICULARIA ORYZAE* CAV.

Raymond S. VODOUHE
DRA B.P. 226, Bohicon, Benin

Résumé: Sept souches de *Pyricularia oryzae* Cav. de la gamme des races différentielles de Kiyosawa ont été utilisées pour tester la résistance de 36 variétés de riz très utilisées en Afrique de l'Ouest. Les résultats obtenus ont montré que d'autres gènes et par conséquent d'autres souches du pathogène différentes de celles identifiées au Japon prévalent en Afrique de l'Ouest. L'étude de la répartition géographique des souches de *P. oryzae* Cav. en République du Bénin a permis de révéler la prédominance de souches efficaces contre le gène Pi-a dans le sud et Pi-a + Pi-K^h dans le nord du pays. Ces gènes seuls ne permettent toutefois pas d'expliquer la résistance de 14 autres variétés testées avec des souches locales. La faible épidémie de la maladie de 1989 à 1991 n'a pas permis d'identifier les facteurs impliqués dans le comportement des variétés africaines face aux souches de *P. oryzae* Cav. L'analyse de l'interaction de la fumure azotée et de la pyriculariose a indiqué un effet net du milieu sur l'expression de la résistance partielle alors qu'il est sans influence sur la résistance spécifique complète. La résistance spécifique complète lorsqu'elle est efficace, peut donc être conseillée dans le cadre de l'intensification de la culture.

Abstract: Seven strains of *Pyricularia oryzae* Cav. of different Kiyosawa races were used to test the resistance of 43 very popular varieties of rice in West Africa. Results of tests in West Africa showed the presence of genes and hence strains of pathogens that are different from those found in Japan. A study of the geographical distribution of the *P. oryzae* Cav. strains in Benin indicated the predominance of strains that were effective against the Pi-a gene in the south and the Pi-a + Pi-K^h strains in the north of the country. These genes cannot provide the full explanation of the resistance of 28 other varieties that were tested with the local strains. The small epidemic of the disease from 1989 to 1991 did not suffice to identify the factors that were involved in the reaction of African varieties to the Japanese strains of *P. oryzae* Cav. An analysis of the interaction of nitrogen fertilizer and pyriculariose indicate that the environment has a clear effect on the expression of partial resistance while it has no effect on the specific complete resistance. When effective, specific complete resistance is advisable under intensive cropping conditions.

La pyriculariose du riz causée par *Pyricularia oryzae* Cav. est l'une des maladies les plus importantes du riz dans toutes les régions productrices de riz dans le monde (Izadyar 1985). L'Association pour le Développement de la Riziculture en Afrique de l'Ouest (ADRAO) a indiqué en 1988 que cette maladie est responsable pour environ 7,5% de l'ensemble des pertes subies par la culture du riz en Afrique de l'Ouest. La pyriculariose représente un danger non seulement pour les dégâts qu'elle occasionne mais également du fait de sa très grande variabilité dans le temps et dans l'espace.

Plusieurs méthodes de lutte sont utilisées contre cette maladie. Les fongicides donnent des résultats très appréciables, mais leurs coûts généralement très élevés limitent leurs emplois à des systèmes de culture intensive. Les techniques culturales appropriées assurent un contrôle relativement satisfaisant de la maladie, mais la résistance variétale apparaît la méthode la plus efficace et la plus pratique pour le contrôle de la maladie puisque directement

utilisable par les paysans sans coûts supplémentaires. Malheureusement, la plupart des variétés résistantes voient leurs résistances surmontées quelques années seulement après leur vulgarisation (Ahn *et al.* 1981). Plusieurs auteurs ont reporté que les variations du niveau de la résistance sont dues soit à des facteurs de l'environnement (notamment l'azote) soit à la faillite de la résistance (apparition de races virulentes).

Afin de mieux connaître la nature de la résistance à *P. oryzae* de certaines variétés communes en Afrique de l'Ouest et les races de *P. oryzae* Cav. prédominantes en République du Bénin des analyses de la résistance en conditions contrôlées et en milieu réel ainsi que des sondages de la répartition des races de *P. oryzae* Cav. ont été organisées. L'étude de l'influence de la fumure azotée sur la maladie a été également conduite.

MATERIEL ET METHODES

Etude de la nature de la résistance à la pyriculariose

Cette étude comporte trois volets: l'étude de la résistance de 36 variétés utilisées comme géniteurs, l'étude de la répartition des souches de *P. oryzae* Cav. en République du Bénin et l'étude de la nature de la résistance de 14 variétés améliorées.

Etude de la nature de la résistance de 36 variétés

Matériel: La résistance à *P. oryzae* Cav. de 36 variétés utilisées comme parents dans de nombreux croisements par l'IRAT en Afrique a été testée à Montpellier (Vodouhe 1986) avec sept races différentielles de *P. oryzae* de Kyosawa (1976) et une souche collectée en Côte d'Ivoire sur IRAT 13. Les réactions de ces variétés aux souches de *P. oryzae* ont été comparées à celles de 13 variétés différentielles de riz de Kyosawa (1976). Les caractéristiques des variétés testées, les gènes de résistance identifiées chez les variétés différentielles et les gènes de virulence connus chez les races différentielles de *P. oryzae* sont présentés aux tableaux 1, 2 et 3 respectivement.

Méthodes: Les variétés ont été cultivées en serre dans des terrines (45 x 30 x 8 cm) sur terre de bruyère. Quatorze demi-lignes sont semées par terrine à raison de 10 plants par demi-lignes, chaque variété étant semée sur deux demi-lignes opposées. Les plantes ont été arrosées avec une solution nutritive. Les souches de *P. oryzae* Cav. ont été cultivées sous éclairage artificiel (13 h de lumière par jour) dans une pièce maintenue à 28°C et à 80% HR. Le milieu de culture est composée de farine de riz (20 g/l), de gélose (15 g/l) et d'extrait de levure (2,5 g/l) dans de l'eau distillée. Après 10 à 14 jours de culture, le mycélium est raclé et les spores de *P. oryzae* sont recueillies dans de l'eau permutée. La concentration de l'inoculum utilisé est ajusté à 5×10^4 spores/ml. La technique d'inoculation des feuilles par seringue a été utilisée. Les plantes sont inoculées à l'âge de cinq à six feuilles. Les feuilles inoculées sont récoltées, séchées et notées. Quatre classes de notation sont utilisées: résistante (R), moyennement résistante (MR), moyennement sensible (MS) et sensible (S).

Etude de la répartition géographique de *P. oryzae* en République du Bénin

Matériel: Afin de mieux appréhender la présence et la prédominance des différentes races de *P. oryzae* en République du Bénin, une gamme de variétés différentielles complétée avec trois témoins de résistance et de sensibilité a été implantée dans cinq régions agroclimatiques différentes pour piéger les souches présentes.

Méthodes: Les variétés sont cultivées à la densité normale (25 cm x 15 cm) et ont été fumée avec 80 unités de N, 30 unités de P₂O₅ et 40 unités de K₂O. L'azote a été apportée sous forme d'urée, 30 unités au semis en même temps que la totalité des autres éléments et le reste (50 unités) au tallage. Le dispositif de Diter a été utilisé. La bande infestante composée d'un mélange de IR 442, IR 8 et Delta a été semée en forte densité et a reçu la même fumure que les variétés testées. Les quatre classes de notation ont été utilisées. Les feuilles et panicules infectées ont été récoltées et conservées pour des inoculations au laboratoire.

Etude de la nature de la résistance de 28 variétés

Matériel: La résistance à *P. oryzae* de 14 variétés améliorées sélectionnées pour leurs performances agronomiques et 14 variétés différentielles a été testée avec trois souches locales de *P. oryzae* collectées sur IR 442, ADNY 11 et Aichi Asahi. Les souches de *Pyricularia* sont nommées BEN 5 (IR 442) BEN 6 (ADNY 11) et BEN 7 (Aichi Asahi).

Méthodes: Les variétés ont été cultivées dans des bacs de 50 x 25 cm x 12 cm sur du terreau. Douze lignes sont semées par bac à raison de 20 plants par ligne. Chaque variété est plantée sur deux lignes. Les souches de *P. oryzae* conservées sur tiges sèches dans une armoire frigorifique sont remise à germer dans des boîtes de Pétri, et les tiges sont mouillées et gardées à la température ambiante 37-40°C pendant 48 heures. Les tiges sont ensuite lavées dans de l'eau distillée. Les plantes sont inoculées au stade de 5 à 6 feuilles par pulvérisation de la solution obtenue à raison de 10 cc par bac répété deux fois. Les plantes inoculées sont recouvertes de plastic pendant 16 heures (de 18 heures le soir à 10 heures le lendemain). Quatre classes de notation sont utilisées (R, MR, MS et S).

Etude de la variation de la résistance en fonction de la fertilité (azotée) du milieu de culture

Matériel: Les comportements de quatre variétés de riziculture pluviale stricte et de bas-fond (IR 442, RAU 4072-13 et IRAT 13) vis-à-vis de la pyriculariose ont été testés en culture de bas-fond sous trois niveaux de fumure azoté N1 (30 unités d'azote à l'hectare), N2 (60 unités de N/ha) et N3 (120 unités de N/ha) à Moussourou en 1990.

Méthodes: Le dispositif de split-plot avec quatre répétitions a été utilisé. Les grandes parcelles sont attribuées aux fumures azotées et les petites parcelles aux variétés. Toutes les parcelles ont reçu la fumure de base 40 unités de phosphore et 30 unités de potassium à l'hectare. L'infestation naturelle a été utilisée. Les observations ont porté sur les symptômes foliaires et les attaques du cou (échelle 1-5). Les pourcentages de cous malades, les taux de fertilité des panicules et les rendements parceliaires ont été également observés.

RESULTATS ET DISCUSSION

Etude de la nature de la résistance à la pyriculariose et à P. oryzae de 36 géniteurs

Les résultats d'inoculation des 36 variétés testées et des 13 variétés différentielles par les sept races différentielles de Kiyosawa et la souche Ci 41 sont présentés au tableau 4. Sur les 36 variétés testées, 23 ont montré des réactions de compatibilité avec une ou plusieurs souches de *P. oryzae* (réponses MS ou S) et pour les 13 autres aucune réaction de compatibilité n'a été observée (réponses MR ou R). Ces résultats peuvent être analysés soit par comparaison avec ceux des variétés différentielles, soit par comparaison des réponses aux différentes souches de *P. oryzae* Cav.

Analyse par comparaison des variétés testées aux variétés différentielles

Aucune des variétés testées n'a présenté des réactions différentielles identiques à celles d'une des variétés différentielles. On note toutefois deux types d'analogie de réponses; d'une part pour les réactions de résistance à toutes les souches et d'autre part pour les réactions de sensibilité à toutes les souches.

Comparaison avec Toride 1: Plusieurs variétés testées ont un comportement semblable à celui de la variété différentielle Toride 1 qui possède le gène Pi-zt. Cet ensemble de variétés résistantes à toutes les souches de *P. oryzae* Cav. comprend Carreon, Bansi, Teksi-chut, Pursigui, Khao Hay et KU 86. A partir de ces résultats, on peut émettre deux hypothèses. La première est que ces variétés possèdent une résistance complète spécifique contrôlée par le gène Pi-zt ou un ou plusieurs gènes inconnus. La présence du gène Pi-zt dans la variété Carreon avait été signalée par Tanaka (1984). L'hypothèse de la présence du gène Pi-zt dans Carreon paraît donc plausible. D'autres expérimentations (hybridation des variétés à tester avec Toride 1) sont toutefois nécessaires pour confirmer la présence de ce gène. La deuxième hypothèse est que ces variétés possèdent une résistance complète générale qu'aucune des souches utilisées n'a surmontée.

Les variétés 902 TONI, R 67, RT 1031-69 et Makouta pourront être rattachées à ce groupe si leur réaction MR à la souche Ci41 est considérée comme de même valeur que la réponse R donnée par les autres variétés. Les variétés R 3-1 et Bete 3 pourront également être rapprochées de cet ensemble si les réactions MR à Ken 53-33 et HOKU 1 de R 3-1 et à Ken 53-33 et Ken 54-20 de Bete 3 sont analogues la réaction R des autres variétés. Toutefois, cet ensemble est hétérogène et il est peu probable que les gènes de résistance de ces variétés soient identiques.

Comparaison avec Shin 2: Delta, le témoin sensible a donné des réponses de sensibilité à toutes les races différentielles et à la souche Ci 41 utilisée. La variété différentielle Shin 2 qui possède le gène Pi-Ks donne les mêmes réactions que Delta aux inoculations des races différentielles, mais diffère de cette dernière par sa résistance à la souche Ci 41.

Des différences de comportement avaient été également observées entre ces deux variétés par Notteghem (1981) où Delta était sensible à plusieurs souches auxquelles Shin 2 était résistante.

Ces résultats suggèrent deux hypothèses: soit Delta est dépourvue de gène de résistance spécifique complète efficace contre les souches utilisées; soit la résistance de Shin 2 à certaines souches auxquelles Delta est sensible serait peut-être due à un ou plusieurs autres gènes de résistance inconnus. La présence éventuelle d'autres gènes dans Shin 2 en plus du gène Pi-Ks avait été signalée par Kiyosawa (1983). Dans ce cas Delta pourrait avoir le gène Pi-Ks.

Regroupement des variétés suivant leurs réponses aux souches de *P. oryzae* Cav.

Les variétés IRAT 13 et KH Chebrock résistent à toutes les races différentielles, mais sont sensibles à la souche C1-41 isolée de IRAT 13. Ces deux variétés du groupe Javanica possèdent une résistance complète spécifique probablement contrôlée par des gènes différents de ceux identifiés au Japon ou par certaines associations de ces derniers non présentes chez les variétés différentielles.

Les variétés 62-667 et 63-83 se rapprochent de ce groupe si l'on considère leurs réponses MS à Ci 41 comme du à l'absence de résistance oligo-génique spécifique efficace contre cette souche.

Les variétés 63-104, Pate Blanc Man 1, Chianan 8, Tjempo Welut, DK 11, Todoroki Wase, Chin Tsowoh Tao yi, Cuttak 4, Tainan Iku 512, Sa Moow Thou Goo, Khao Mone Tia, Khao Chao, Hybride 1716/3/3, IRAT 105 et BG 90-2 présentent des réactions variables suivant les souches.

La plupart de ces variétés possèdent une résistance complète spécifique, mais l'analyse de leurs réactions vis-à-vis des souches de *P. oryzae* seule ne suffit pas pour expliquer avec certitude les gènes qui contrôlent leurs résistances.

CONCLUSION PARTIELLE

Si l'ensemble des souches utilisées a permis de révéler l'existence d'une résistance complète spécifique chez la plupart des variétés testées, aucune d'elle n'a pu surmonter les résistances des variétés Carreon, Bansi, Teksichut, Pursigui, Khao Hay et Ku 86.

Afin de vérifier si les résistances de ces variétés sont complètes et générales ou complètes et spécifiques, il est indispensable de les confronter à d'autres souches de *P. oryzae*.

La variété Morobérékan présente une résistance moyenne à la plupart des souches utilisées. L'hypothèse de la présence d'un bon niveau de résistance partielle dans cette variété peut être formulée et devra être confirmée par des expérimentations complémentaires (Analyse des générations F2 et F3).

Tableau 1. Caractéristiques des 36 variétés testées

No. d'ordre	Variétés	Groupe variétal	Origine géographique
1	902 TONI	Javanica p G ₃ /G ₄	Zaïre
2	R 67	Javanica p G ₃ /G ₄	Zaïre
3	RT 1031-69	Javanica G ₄ A	Zaïre
4	Makouta	Javanica p G ₃ /G ₄	Côte d'Ivoire
5	Morobérékan	Javanica G ₃ B	Côte d'Ivoire
6	62-667	Javanica	Sénégal
7	63-104	Javanica	Sénégal
8	Pate Blanc Man 1	Javanica G ₃ B	Côte d'Ivoire
9	Chianan 8	Japonica G ₂ B	Taïwan
10	63-83	Javanica	Sénégal
11	H 105	Indica G ₅	Ceylan
12	Carreon	Indica G ₅	Philippines
13	Tjembo Welut	Javanica p G ₃	Indonésie
14	DK 11	Indica	Pakistan
15	Todoroki Wase	Japonica G ₂ A	Japon
16	Fossa HV	Javanica G ₃ B	Burkina Faso
17	Chiu Tsowoh Tao Yi	Indica	Chine
18	Bansi	Indica G ₅	Inde
19	Cuttak 4	Javanica G ₄ B	Inde
20	Tainan IKU 512	Japonica G ₂ B	Taïwan
21	Sa-Moow-Thou-Goo	Indica	Chine
22	R 3-1		Zaïre
23	Teksichut	Indica G ₅	Taïwan
24	Pursigui	Indica G ₅	Philippines
25	Khao Mone Tia	Javanica sp.	Laos
26	Khao Hay	Javanica	Laos
27	KH Chebrock	Javanica	Laos
28	Kha Chao	Javanica	Laos
29	KU 86	Javanica sp.	Thaïlande
30	Bete 3	Javanica G ₄ A	Côte d'Ivoire
31	Hyb 1716/2/3/3	Indica x Javanica	Côte d'Ivoire
32	IRAT 105	Javanica x Japonica	Côte d'Ivoire
33	BG 90-2	Indica	Sri Lanka
34	Lung Sheng 1	Japonica G ₂ A	Taïwan
35	IRAT 13	Javanica	Côte d'Ivoire
36	Delta	Japonica	France

Tableau 2. Liste des gènes de résistance spécifique complète identifiés chez les variétés différentielles

Variétés différentielles	Gènes de résistance connus
Skin 2	Pi-K _s
Aichi Asahi	Pi-a
Fujisaka 5	Pi-i + Pi-K _s
Kusabue	Pi-K
Tsuyuake	Pi-K ^m
Fukunishiki	Pi-Z
K 1	Pi-ta
K 2	Pi-K ^p + Pi-a
K 3	Pi-K ^h
Pi n° 4	Pi-ta ²
Toride 1	Pi-Z ^t
BL 1	Pi-b
K 59	Pi-t

Tableau 3. Races différentielles de *P. oryzae* Cav de Kiyosawa (1976)

Gènes de virulence connus	Races de <i>Pyricularia oryzae</i> Cav.						
	P ₂ B	Ken53-33	INA 72	HOKU 1	Ken54-20	Ken54-04	INA 168
Av - a	+	+	-	+	+	+	-
Av - i	-	+	-	+	-	-	-
Av - k	-	+	+	-	-	-	-
Av - k ^s	+	+	+	+	+	+	+
Av - K _p	+	+	+	-	-	-	-
Av - K ^h	-	+	+	-	-	-	-
Av - K _m	-	+	+	-	-	-	-
Av - ta	+	+	-	-	-	-	+
Av - ta ²	+	-	-	-	-	-	-
Av - Z	-	-	-	-	-	-	-
Av - Z ^t	-	-	-	-	-	-	-
Av - b	-	-	-	-	-	-	-
Av - t	-	-	-	-	-	-	-

+ Présence du gène de virulence; - Absence du gène de virulence

Tableau 4. Résultats d'inoculation de 36 variétés testées et des variétés différentielles de Kiyosawa avec les races différentielles de *P. oryzae* Cav. et la souche Ci 41

Variétés de riz (<i>Oryzae sativa</i> L.) testées	Gènes connus	Races différentielles de Kiyosawa (1976)							Souche africaine Ci41
		P2b	Ken 53-33	INA 72	Hoku 1	Ken 54-20	Ken 54-04	INA 168	
902 TONI	-	R	R	R	R	R	R	R	MR
R 67	-	R	R	R	R	R	R	R	MR
RT 1031-69	-	R	R	R	R	R	R	R	MR
Makouta	-	R	R	R	R	R	R	R	MR
Morobérékan	-	MR	MS	MS	MR	R	MS	R	MR
62-667	-	R	R	R	R	R	R	R	MS
63-104	-	R	MS	R	R	MR	R	R	MS
Pate Blanc Man 1	-	MS	MS	MS	MR	R	S	MR	S
Chianan 8	-	S	S	MS	S	S	S	S	MS
63-83	-	R	R	R	R	R	R	R	MS
H 105	-	R	R	MR	MR	MR	R	R	R
Carreon	-	R	R	R	R	R	R	R	R
Tjempo Welut	-	R	R	MS	MR	R	R	R	MS
DK 11	-	S	S	MR	S	S	S	MR	S
Todoki wase	-	R	S	MR	MS	MS	R	R	S
Fossa HV	-	S	S	S	MS	MR	S	R	S
Chiu Tsowoh	-	MS	MR	S	MS	MR	MS	MR	S
Bansi	-	R	R	R	R	R	R	R	R
Cuttak 4	-	S	MS	R	R	R	R	R	MS
Tainan Iku 512	-	S	S	MS	S	MS	S	MR	MS
Sa Moow Thou Goo	-	R	R	S	MS	S	S	R	S
R 3-1	-	R	MR	R	MR	R	R	R	R
Teksichut	-	R	R	R	R	R	R	R	R
Pursigui	-	R	R	R	R	R	R	R	R
Khao Mone Tia	-	MR	MS	R	MR	MS	R	MS	R
Khao Hay	-	R	R	R	R	R	R	R	R
KH Chebrock	-	R	R	R	R	R	R	R	S
Khao Chao	-	R	MR	R	MR	R	R	R	MR
KU 86	-	R	R	R	R	R	R	R	R
Bete 3	-	R	MR	R	R	MR	R	R	R
Hybride 1716/2/3/3	-	R	R	R	MR	MR	R	R	S
IRAT 105	-	S	S	MS	MS	S	MR	MS	MR
BG-90-2	Pi-b*	R	R	MS	MS	R	R	R	MR
Lung Sheng 1	-	S	S	S	S	S	S	MR	S
IRAT 13	Pi-St*	R	R	R	R	R	R	R	S
Delta	-	S	S	S	S	S	S	S	S

Tableau 4. suite

 Variétés différentielles
de Kiyosawa (1976)

	Gènes connus	Races différentielles de Kiyosawa (1976)							Souche africaine Ci41
		P2b	Ken 53-33	INA 72	Hoku 1	Ken 54-20	Ken 54-04	INA 168	
Shin 2	Pi-Ks	S	S	S	S	S	S	S	R
Aichi Asahi	Pi-a	MS	S	R	S	S	S	R	S
Fujisaka 5	Pi-i + Pi-Ks	MS	S	S	S	MR	MS	R	S
Tsuyuake	Pi-K ^m	R	S	S	R	R	R	R	MS
Fukunishiki	Pi-Z	MS	MR	R	MR	MS	MS	R	R
K 1	Pi-ta	S	S	R	MR	R	R	S	S
K 2	Pi-K ^p + Pi-a	S	MS	S	R	R	R	R	R
K 3	Pi-K ^h	R	MS	S	R	R	R	R	R
Pi No 4	Pi-ta ²	S	R	R	R	R	R	R	R
Toride 1	Pi-Z ^l	R	R	R	R	R	R	R	R
BL 1	Pi-b	R	R	MR	R	R	R	R	R
K 59	pi-t	R	MS	R	MR	MS	MS	R	S

NB: R = Résistant; MR = Moyennement résistant; MS = Moyennement sensible et S = Sensible. * Hypothèse émise par Tanaka, 1984.

Etude de la répartition géographique de P. oryzae en République du Bénin

La grande variabilité de l'agent pathogène de la pyriculariose a été signalée par de nombreux auteurs. Kiyosawa (1972, 1977) Iwano *et al.* (1990) ont indiqué qu'il existe en fonction des localités, plusieurs groupes de races de *P. oryzae*. La connaissance des races prédominantes dans chaque région facilite le choix de la stratégie d'utilisation de la résistance disponible. Mboj (1981, 1989, 1990) a montré que sur huit groupes internationaux de races de *P. oryzae* un seul est absent du Sénégal; il s'agit du groupe IA. Vodouhe (1986) a indiqué que les gènes de résistance à la pyriculariose identifiés au Japon ne suffisent pas à eux seuls pour expliquer certaines résistances observées chez des variétés populaires en Afrique de l'Ouest.

Le sondage de la répartition géographique des souches de *P. oryzae* présentes dans les zones de culture du riz au Bénin effectué de 1989 à 1991 (Tableau 5) a indiqué la présence de souches efficaces contre Aïchi Asahi et IR 442 dans toutes les localités, K3 dans deux localités au Nord du Pays, Shin 2 dans toutes les localités sauf une (Moussourou) et ADNY 11 dans deux localités sur 5. Le faible niveau de développement des épidémies de pyriculariose au Bénin en général depuis 1989 ne permet pas de conclure, aux vues des présents résultats, à l'absence de souches capables de surmonter les résistances de plusieurs autres variétés différentielles. Ces résultats permettent toutefois d'émettre l'hypothèse de la présence au Bénin de souches possédant les gènes de virulence Av-a, Av-K^s et Av-K^h; les

souches surmontant la résistance Pi-K^h étant surtout présentes dans la partie septentrionale du pays. La variété IR 442 confirme sa sensibilité dans toutes les zones (Vodouhe 1981) ce qui rapproche beaucoup de la variété différentielle Aïchi Asahi qui ne possède que le gène de résistance Pi-a. ADNY 11 précédemment résistante s'affaiblit dans certaines localités surtout lorsque les conditions de culture deviennent difficiles (déficit hydrique).

En attendant des conditions plus favorables pour recueillir des informations sur la présence éventuelle d'autres souches au Bénin, il doit être tenu compte des présentes informations dans le choix des variétés propices à ces différentes régions.

Tableau 5. Etude de la répartition géographique des souches de *P. oryzae* Cav. au Bénin (1989-1991)

No. d'ordre	Variétés différentielles	Niaouli	Moussourou	Lema	INA	Bagou
1	Aïchi Asahi	MS	S	S	S	S
2	K1	R	R	R	R	R
3	K2	R	R	R	R	R
4	K3	MR	R	R	S	MS
5	K59	R	R	R	MR	MR
6	K60	R	R	R	R	R
7	Shin 2	MR	MR	MR	MS	MS
8	Fukunishiki	R	R	R	R	R
9	Toride 1	R	R	R	R	R
10	OU-244	R	R	R	R	R
11	Pi no. 4	R	R	R	R	R
12	BL 1	R	R	R	R	R
13	Kusabue	R	R	R	R	R
14	Chugoku	R	R	R	R	R
15	IR-442 (témoin)	S	S	S	MS	MS
16	IRAT 13 (témoin)	R	R	R	R	R
17	ADNY 11 (témoin)	R	MR	R	MS	R

N.B.: R = Résistant; MR = Moyennement résistant; S = Sensible; MS = Moyennement sensible.

Etude de la réaction de 14 variétés améliorées aux souches BEN 5, BEN 6 et BEN 7

Les résultats de la confrontation des souches de *P. oryzae* isolées de IR 442, ADNY 11 et Aïchi Asahi avec 14 variétés améliorées et 14 variétés différentielles sont présentées au Tableau 6. D'une manière générale on note une assez faible virulence pour toutes les souches testées; la souche BEN 6 isolée de ADNY 11 étant la plus virulente. Les variétés IR 442, Aïchi Ashai et Shin 2 ont été sensibles à toutes les souches tandis que K3 et Kusabue ne l'ont

été que pour les deux souches BEN 5 et BEN 6. Ces deux variétés différentielles possédant respectivement les gènes de résistance Pi-K^h et Pi-K, on pourrait émettre l'hypothèse que les variétés IR 442 et ADNY 11 possèdent en commun un ou plusieurs gènes communs. Notons par ailleurs que ces deux variétés ont Peta comme parent commun. Cette hypothèse devra toutefois être vérifiée par des études de leurs descendance.

Etude des variations de la résistance en fonction de la fertilité (azote) du sol

Les doses croissantes de fumure azotée ont pour conséquence d'augmenter les niveaux d'attaques par *P. oryzae* (Mbodj *et al.* 1988, 1989, 1990; Vodouhe 1989). Les résultats de l'étude des variations de la résistance en fonction de la fertilité (azote) a confirmé ces observations pour la variété IR 442 sensible à la pyriculariose (Tableau 7).

Par contre pour IRAT 13 et 11365, en dehors des variations constatées pour la durée du cycle et la verse, aucune variation de la résistance à la pyriculariose n'a été observée. Ces variétés ont d'ailleurs connu des augmentations continues de leurs productions de la plus faible dose à la plus forte dose de fumure azotée.

Une légère chute de la production à la plus forte dose d'azote a été enregistrée pour la variété RAU 4072-13 sans qu'il soit observé une variation substantielle des niveaux d'attaque de pyriculariose. Cette légère baisse de productivité pourrait avoir donc d'autres causes que la pyriculariose.

Tableau 6. Réactions de 14 variétés améliorées et de 14 variétés différentielles aux souches BEN 5, BEN 6 et BEN 7

No. d'ordre	Variétés	Pyriculariose foliaire			Variétés différentielles	Pyriculariose foliaire		
		BEN5 (IR442)	BEN6 (ADNY11)	BEN7 (Aïchi Asahi)		BEN5 (IR442)	BEN6 (ADNY11)	BEN7 (Aïchi Asahi)
1	11365	R	R	R	Aïchi Asahi	S	S	S
2	ADNY 11	MR	MS	R	K 1	R	R	R
3	ITA 222	R	R	R	K 2	R	R	R
4	NIARIS 85-12	R	R	R	K 3	MS	MS	R
5	NIARIS 85-13	R	R	R	K 59	R	R	R
6	NIARIS 85-15	MR	R	R	K 60	R	R	R
7	IDSA 6	R	R	R	Shin 2	MS	S	MS
8	IRAT 170	R	R	R	Fukunishiki	R	R	R
9	ITA 302	MR	MR	R	Toride 1	R	R	R
10	ITA 304	R	MR	MR	Ou 244	R	R	R
11	IRAT 112	R	MR	MR	Pi no. 4	R	R	R
12	TGR 78	R	R	R	BL 1	R	R	R
13	IR 442	MS	S	MS	Kusabue	MS	MS	R
14	IRAT 13	R	R	R	Chugoku	R	R	R

Tableau 7. Etude des variations de la résistance en fonction de la fertilité (azote) du sol Moussourou (1990)

Variétés	Niveau d'azote unités/ha	Pyriculariose foliaire (1-5)	Pyriculariose du cou	Rendement en grain (t/ha)
IR 442	30	1	5	2,45
	60	3	25	2,12
	120	4	76	1,25
11 365	30	1	0	2,70
	60	1	1	2,95
	120	1	2	3,90
RAU 4072-13	30	1	0	2,50
	60	1	0	3,15
	120	2	3,2	3,06
IRAT	30	1	0	1,60
	60	1	0	2,05
	120	1	0	2,65

CV = 14%

VX Azote = Signification !%

Aux vues de ces résultats on serait tenté de conclure que la résistance spécifique telle que celle de IRAT 13 lorsqu'elle est efficace est recommandable dans un système de culture intensive du riz utilisant de fortes doses d'engrais azoté.

CONCLUSION GENERALE

L'agent pathogène responsable de la pyriculariose du riz a une faculté de variation très élevée qui met en échec la résistance des variétés sélectionnées quelques années seulement après leur utilisation (Ahn 1981). La connaissance des races du pathogène présentes dans l'environnement et le suivi de leurs évolutions dans le temps permettra l'adoption de stratégies de lutte efficaces contre cette maladie.

La durabilité de la résistance ne relèverait plus aujourd'hui seulement d'un type particulier de résistance (Mbodj 1990) mais de la combinaison d'un ensemble de mesures, de l'adoption d'une stratégie appropriée de lutte ou de la lutte intégrée. La résistance spécifique complète, lorsqu'elle est efficace dans le milieu, peut être conseillée dans le cadre de l'intensification de la culture faisant appel à l'utilisation de fortes doses d'engrais azoté.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADRAO (1983). Stratégie de l'ADRAO: 1990-2000
- Ahn S.W. (1981). The slow blasting resistance. In: *Proceedings of the Symposium on Rice Resistance to Blast, Montpellier, France. 18-21 March 1981*. Montpellier, IRAT-GERDAT. pp. 331-360.
- Iwano M., Lee S.L., Lee C.V. and Kong P. (1990). Distribution of pathogenic races and changes in virulence of rice blast fungus *Pyricularia oryzae* Cav. in Yunnan Province, China. *JARQ (Jpn. Agric. Res. Q.)*. 23 (3) 1990. pp. 241-248.
- Izadyar M. (1985). Comparison of effectiveness of several fungicides to control rice blast. *Iranian Journal of Plant Pathology*. Dec. 1985. v. 20 (1-4): 35-45; 6 tables 6 ref.
- Kiyosawa S. (1976). Methods for tests and gene analysis of blast resistance of rice varieties. *Oryza*, 1976 Vol. 13 (1): 1-31.
- Kiyosawa S. (1972). Genetics of blast resistance. In: *Rice breeding*. IRRI Los Banos, Philippines. pp. 203-225.
- Kiyosawa S. (1977). Some examples of pest and disease epidemics in Japan and their causes. *Annals New York Academy of Sciences* 287: 35-44.
- Kiyosawa S. (1984). Estimation of genes for rice blast resistance in Chinese differential varieties with Japanese fungus strains. *Scientia Sinica (Series B)*. Vol XXVII no. 3. pp. 273-283.
- Mbodj Y. (1981). Premier sondage sur la variabilité du pouvoir pathogène de *Pyricularia oryzae* Cav. en Casamance, au Sénégal. In: *Comptes rendus du symposium sur la résistance du riz à la pyriculariose*. IRAT, Montpellier 18-21 mars 1981, France pp. 176-190.
- Mbodj Y., Gaye S., Diaw S. et Syllam M. (1988). La pyriculariose du riz en Casamance, au Sénégal. Influence de la fumure azotée (organique et/ou minérale) sur la gravité des symptômes de pyriculariose. *PARASITICA* (sous presse).
- Mbodj Y. (1989). Recherche de variétés de riz adaptées à la riziculture en Casamance et pourvues d'un bon niveau de résistance à la pyriculariose (*Pyricularia oryzae* Cav.). *Collection "Etudes et documents" de l'ISRA* Vol. 1(2): 22 pp.
- Mbodj Y. (1990). Les maladies du riz en Casamance au Sénégal, lutte intégrée? Communication présentée au Séminaire sur la lutte intégrée, organisé par le CILSS en janvier 1990 à Bamako Mali. 32 pp.
- Notteghem J.L. (1981). Analyse des résultats d'inoculation de 67 variétés de riz par 15 souches de *P. oryzae* Cav. In: *Comptes rendus du "Symposium sur la résistance du riz à la pyriculariose"* IRAT-GERDAT, Montpellier France 18-21 mars 1981. pp. 74-96.
- Tanaka Y. (1984). *Annual Report* III. Embrapa Goiânia, Brazil. 285 pp.
- Vodouhe S.R., Djegui N. et Amadji F. (1981). Impact de la pyriculariose sur la riziculture en République Populaire du Bénin. *Dans comptes rendus du "Symposium sur la résistance du riz à la pyriculariose"* Montpellier France 18-21 mars 1981. pp. 26-33.
- Vodouhe S.R. (1986). Contribution à l'étude génétique de la résistance du riz (*O. sativa* L.) à la pyriculariose causée par *P. oryzae* Cav. Thèse de Docteur-Ingénieur, Université de Rennes-1 ENSA de Rennes, France.
- Vodouhe S.R. (1989). Base génétique de la résistance à *Pyricularia oryzaea* Cav. de quelques variétés utilisées comme géniteurs et facteurs de variations de la résistance. Communication présentée à l'Atelier de l'IRTP-Africa à Nairobi Kenya du 20 au 23 mars 1989. 27 pp.

CLASSIFICATION OF SYMBIOTIC INTERACTIONS BETWEEN STRAINS OF *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* AND GENOTYPES OF FABA BEAN

Mohammed SADIKI

Department of Agronomy and Plant Breeding

Hassan II Institute of Agronomy and Veterinary Medicine, Rabat, Morocco

Abstract: *The variability of biological nitrogen fixation (BNF) in legumes depends on the effect of plant genotype, strain of Rhizobium, and the host by strain interactions. The objectives of this research were to examine the relative importance of the plant, the Rhizobium, and plant by Rhizobium interaction on BNF associated traits in faba bean (Vicia faba L. var. major). Eight faba bean lines were grown in all combinations with six Rhizobium leguminosarum bv viciae strains in pots filled with sterile sand in the greenhouse. Plants were harvested at flowering stage and evaluated for actylene reduction activity, nodule number, nodule mass, shoot and root weights, and shoot nitrogen content. Plant genotype had the greatest effect on all traits with nodule number and mass being the most affected. The plant and Rhizobium symbionts individually, and their interaction, affected ARA. The host by strain interaction was most important for plant yield and N content. Two concepts were developed and proposed to characterize plant genotypes when breeding for improved BNF. "General Biological Nitrogen Fixation Ability" (GBNF) would characterize plant genotypes that perform equally with a series of Rhizobium strains. "Specific Biological Nitrogen Fixation Ability" (SBNF) would characterize plant genotypes that perform differently with different strains. Regression coefficients (b) can be used to quantify GBNF. Genotypes with good GBNF ($b=0$) and high mean yields would be desirable for a large target area, whereas genotypes with SBNF are only desirable for the specific areas from which the effective strains originated. Plant germplasms in breeding programmes should be selected for high GBNF and efficient symbiosis. This would require using a number of strains collected from the target culture area as inoculum.*

Résumé: *La capacité de fixation biologique de l'azote (BFA) par les légumineuses dépend du génotype de la plante, de la souche de Rhizobium, et de l'interaction hôte-souche. Les objectifs de cette étude consistaient à examiner l'importance relative de la plante, du Rhizobium et de l'interaction plante-Rhizobium sur les caractéristiques de FBA de la Fève (Vicia faba L. var. major). Huit lignes de fèves ont été cultivées selon toutes les combinaisons possibles avec six souches de Rhizobium leguminosarum bv viciae en serre dans les vases de végétation remplis de sable stérile. Au stade de la floraison, les plants ont été récoltés et évalués pour leur activité de réduction de l'actylène, le nombre et la masse de nodules, le poids des pousses et des racines et la teneur des pousses en azote. Le génotype s'est avéré avoir la plus grande influence sur toutes les caractéristiques de la plante, en particulier le nombre et la masse de nodules. On a constaté que la plante et les symbionts de Rhizobium avaient un effet sur la capacité de réduction de l'actylène, aussi bien individuellement que par leur interaction. L'interaction hôte-souche était plus importante pour le rendement de la plante et la teneur en azote. Deux concepts ont été mis au point et proposés pour caractériser les génotypes sélectionnés pour améliorer la FBA. La "capacité de fixation biologique générale de l'azote" (FBGA) caractériserait les génotypes dont les performances sont équivalentes à une série de souches de Rhizobium. La "capacité de fixation biologique spécifique de l'azote" (FBSA) caractériserait les génotypes dont les performances varient en fonction des différences de souches. Des coefficients de régression (b) peuvent être utilisés pour quantifier la FBGA. Des génotypes ayant une bonne FBGA ($b=0$) et des rendements*

moyens élevés conviendraient à une zone-cible très élargie alors que des génotypes FBSA ne sont adaptés qu'aux régions d'où proviennent les souches spécifiquement identifiées. Les ressources génétiques des programmes de sélection devraient être choisies pour leur forte capacité de FBGA et leur efficacité symbiotique. Cette sélection implique de collecter un certain nombre de souches qui serviront d'inoculum dans la zone de culture cible.

Biological nitrogen fixation (BNF) in legume species is influenced by host plant genotype, *Rhizobium* strain genotype and host by *Rhizobium* strain interactions. Significant host by *Rhizobium* strain interactions have been reported for many legume species, including soy beans (*Glycine max* [L.] Merr.) (Caldwell and Vest 1970), mungbean (*Vigna radiata* [L.] (Fernandez and Miller 1985, 1987), field pea (*Pisum sativum* L.) (Holl 1975), cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (Minchin *et al.* 1978), white clover (*Trifolium repens* L.) (Mytton 1975), faba bean (*Vicia faba* L.) (Mytton *et al.* 1977), and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) (Westermann and Kolar 1978).

Such interactions have many implications in BNF breeding and genetic research. For inheritance studies, it has been recommended that a single *Rhizobium* strain be used as opposed to a mixture of several strains, because rhizobia strain variability could confuse results (Lie and Mulder 1979, Miller *et al.* 1986). Conversely, a mixture of strains was suggested for use as inoculum in plant selection experiments because it better represents the field situation (Viands *et al.* 1981 and Barnes *et al.* 1984).

Our goal is to develop a breeding strategy for increasing BNF in Moroccan faba bean. The only pertinent research on the host by *Rhizobium* strain interaction for faba bean was reported by Mytton *et al.* (1977). However, their study reported observations of only plant weight and nitrogen concentration as plant traits associated with BNF. The objectives of this study were to assess the relative importance of the interaction between Moroccan faba bean genotypes and Moroccan *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* strains for a range of BNF associated traits and to establish a protocol for selecting the optimum germplasm and *Rhizobium* lines for use in a breeding programme.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

The faba bean lines used in this study were derived from accessions collected throughout Morocco (Sadiki 1990). Forty accessions were randomly polycrossed under natural conditions in Morocco, and the polycross seed was bulked to produce the Moroccan Gene Pool (MGP) of faba bean. One hundred lines were developed from random MGP seeds following four generations of selfing. These hundred parental lines were inoculated with a single *R. leguminosarum* strain and evaluated in a preliminary experiment for BNF traits under nitrogen-free conditions in the greenhouse. The eight parental lines chosen for this experiment (7, 28, 66, 73, 115, 150, 275, 311) represented the range of variability that we had observed in preliminary experiments for BNF traits.

Rhizobium strains

The experiment included six *R. leguminosarum* strains (F8, F17, F19, F43, F52, and F59) isolated from Moroccan soils by Dr Hilali in the Department of Soil Science, Hassan II Institute of Agronomy and Veterinary Medicine, Rabat. The *Rhizobium* strains chosen for this experiment represented a range of effectiveness from low to high. *Rhizobium* strains were tested for purity and cultured in YEM solution media at 25°C for five days. Inoculum was prepared by adding sterilized water to each solution to provide a concentration of about 10^7 to 10^9 cells per ml.

Procedures

Clay pots filled with sand and containing a glass watering tube were autoclaved. Seeds were surface sterilized by immersion in 5% mercuric chloride for five minutes and washed with sterilized water. Two seeds were planted per pot and after 10 days the seedlings were thinned to one per pot. The experiment was designed as a randomized complete block with 10 replications (pots) per parental line per *Rhizobium* strain.

Inoculation was done at seedling emergence by introducing 50 ml of inoculum solution of the appropriate *Rhizobium* strain into the pots through the watering tube. Plants received 100 ml of nitrogen-free nutrient solution (Dart and Pate 1959) every week and were watered as necessary with sterilized water. Two control treatments, uninoculated without nitrogen and uninoculated with nitrogen supplied as ammonium nitrate solution were also included in the experiment.

After nine weeks at the early flowering stage, all plants were removed from the sand. Plant shoots were removed and weighed (SFW), and oven dried (80° C for 12 h) to determine dry weight (SDW). Total nitrogen content (SNC) was determined by the Kjeldahl technique. The roots were immediately assayed for acetylene reduction activity (ARA) as described by Viands *et al.* (1981), and then visually scored for nodule number (NN) on a 1 to 9 scale (1 = 0 to 5 nodules and 9 = > 75 nodules) and nodule mass (NM) on a 1 to 5 scale (1 = 0 to 30 mg and 5 = > 90 mg), weighed to determine the root fresh weight (RFW), and oven dried to determine the root dry weight (RDW).

Statistical analysis

Analysis of variance was performed for each trait, and components of variance were estimated from the appropriate mean squares. Principal component analysis (PCA) was used to establish a BNF index by linear combination of BNF associated traits (Johnson and Wilchern 1982). This technique consisted of transforming the original variables (traits) into a few uncorrelated variables or principal components (PC). The same procedure was used by Fernandez and Miller (1987) to establish a BNF index in mungbean. An index was computed for each *Rhizobium* strain as an average of BNF (PC1) over lines and replications. Regression coefficients were computed for individual lines with *Rhizobium* strain index being the independent variable (X) and line performances being the dependent variable (Y).

RESULTS

Means for the six *Rhizobium* strains, the eight faba bean lines and the two controls, are presented in Tables 1 and 2 respectively. The two uninoculated controls (Table 1) showed no nodules and no ARA, thus demonstrating the lack of contamination and cross inoculation. The two control treatments also produced the most divergent values for plant fresh and dry weights, and total nitrogen. Significant differences were observed among *Rhizobium* strains for all traits evaluated. The plant genotype effects (Table 2) were relatively larger than the magnitude of *Rhizobium* strain effects. Significant differences were observed among the 48 host genotype by *Rhizobium* strain combinations (Table 3). The poorest plant genotype by *Rhizobium* strain combination for NN, NM, ARA, total plant fresh weight (TFW) and total plant dry weight (TDW), and total shoot nitrogen (TSN) was 28 X F17 while the best combination was 7 x F17. The plant effects were clearly demonstrated by these two combinations because *Rhizobium* strain F17 was used in both the highly and poorly performing combinations.

Table 1. Means of six *Rhizobium leguminosarum* strains and two uninoculated controls for six traits associated with biological nitrogen fixation and a BNF index measured over eight *Vicia faba* var. *major* lines.

<i>Rhizobium</i> strains	Nodule number ⁺ <i>score</i>	Nodule mass ⁺⁺ <i>score</i>	Acetylene reduction activity <i>micromol/pt/hr</i>	Fresh weight <i>g/pt</i>	Dry weight <i>g/pt</i>	Total shoot nitrogen <i>mg/pt</i>	BNF index [§]
F59	4.9	2.8	18.5	31.8	4.3	118.6	48.6
F43	4.4	2.5	8.9	19.6	1.5	42.2	30.3
F8	5.5	3.2	21.3	36.7	4.9	141.7	56.4
F19	4.7	2.6	18.1	28.2	3.8	108.2	44.5
F17	4.5	2.5	17.0	26.9	3.6	104.1	42.5
F52	4.6	2.6	17.9	31.0	4.1	123.9	47.8
Uninoculated Control-N	0.0	0.0	0.0	12.3	0.6	26.6	-
Uninoculated Control+N	0.0	0.0	0.0	73.4	5.6	161.6	-
LSD _{0.05}	0.3	0.3	1.3	1.6	0.2	8.9	2.3

⁺ Nodule number scored 1 - 9: 1 = 0 to 5 nodules, 2 = 6 to 15, 3 = 15 to 25 nodules, 4 = 26 to 35 nodules, 5 = 36 to 45 nodules, 6 = 46 to 55 nodules, 7 = 56 to 65 nodules, 8 = 66 to 75 nodules, 9 more than 75 nodules. ⁺⁺ Nodule mass scored 1 - 5: 1 = 0 to 30 mg, 2 = 31 to 50 mg g, 3 = 51 to 70 mg, 4 = 71 to 90 mg, 5 >90 mg. [§] BNF index computed by principal component analysis using 7 traits (high values indicate greatest BNF)

Table 2. Means for six traits associated with biological nitrogen fixation (BNF) and a BNF index for each of eight *Vicia faba* var. *major* germplasm lines individually inoculated with six strains of *Rhizobium leguminosarum*

Lines	Nodule number ⁺ <i>score</i>	Nodule mass ⁺⁺ activity <i>score</i>	Acetylene reduction <i>micromol/pt/hr</i>	Fresh weight nitrogen <i>g/pt</i>	Dry weight <i>g/pt</i>	Total shoot <i>mg/pt</i>	BNF index [§]
7	7.4	4.5	26.6	46.3	5.9	175.8	71.2
28	2.8	1.4	9.8	14.6	2.1	56.0	24.1
66	4.8	2.7	16.8	30.0	3.6	102.6	45.6
73	4.0	2.1	13.8	21.7	2.8	79.0	34.8
115	4.8	2.7	16.8	32.7	3.9	117.8	48.8
150	4.4	2.4	15.8	26.2	3.2	90.6	40.8
275	6.2	3.8	22.1	39.3	4.9	143.1	60.4
311	3.7	1.9	13.7	21.6	3.1	87.2	34.4
LSD _{0.05}	0.4	0.3	1.5	1.9	0.2	10.3	2.6

⁺ Nodule number scored 1 - 9: 1 = 0 to 5 nodules, 2 = 6 to 15, 3 = 15 to 25 nodules, 4 = 26 to 35 nodules, 5 = 36 to 45 nodules, 6 = 46 to 55 nodules, 7 = 56 to 65 nodules, 8 = 66 to 75 nodules, 9 more than 75 nodules. ⁺⁺ Nodule mass scored 1 - 5: 1 = 0 to 30 mg, 2 = 31 to 50 mg g, 3 = 51 to 70 mg, 4 = 71 to 90 mg, 5 >90 mg. [§] BNF index computed by principal component analysis using 7 traits (high values indicate greatest BNF)

The average TDW and TSN of the 48 plant/strain combinations were 37.5% and 34.1% less than the average for the uninoculated check supplied with mineral nitrogen respectively (Table 3), indicating that nitrogen from fixation was generally a limiting factor for plant growth. However, four combinations (7 x F59, 7 x F8, 7 x F5, and 115 x F8) produced statistically higher yields than the control supplied with nitrogen (Table 3), indicating that the nitrogen requirement of faba beans could be satisfied through symbiosis, when the most effective combinations of the two symbionts are realized. Analyses of variance showed highly significant effects of the three variation sources (host, strain and their interaction) for all traits. However, the contribution of each component to the total variation differed from trait to trait. The relative contribution of host, strain, and host by strain interactions were quantified by computing the appropriate variance components from the analysis of variance table (Table 4). Those estimates confirmed that host effects were generally larger than the strain and host by strain effects for all traits including in the index. The host effects contributed 51% of the total variability of the BNF index; the interaction contributed 21%; whereas the strain effects contributed 15%. The maximum plant effects were for NN, NM and TFW.

The contribution of the *Rhizobium* strain to the total variability fluctuated from trait to trait, but was greatest for TDW and ARA. The interaction effects were greatest for TFW, TDW, TSN, and BNF index. The BNF index is a linear combination of the traits measured, and was defined by the first principal component (PC1) which concentrated more than 72% of the total

variability in all traits measured. With the exception of nitrogen concentration, all other variables had about equal weights in the combination (~ 0.4). This demonstrated that PCA was a good approach to use when establishing such an index.

DISCUSSION

The host, *Rhizobium* strain, host by strain interaction effects were statistically significant for all the traits. Generally, the average effect of host genotype was larger than the average effect of the *Rhizobium* strains. The host by *Rhizobium* strain interaction effects were intermediate in importance. This contrasts with results in faba bean reported by Mytton (1977) which indicated that the interaction was the most important source of variability, followed by *Rhizobium* strain, then by the plant. The large effect of plant genotype on BNF related traits observed in our study confirmed results reported for other legumes that the host plant has primary control over nodulation, but that both symbionts affect nitrogenase activity. According to Kidby and Goodchild (1966), the host plant is involved in the regulation of the nitrogenase enzyme, which is synthesized by the *Rhizobium* through the contribution to leghemoglobin synthesis. Leghemoglobin content of the nodules was reported by Rai and Singh (1979) to be a more critical factor for maximum nitrogen fixation than the number of nodules or their dry weight in chick peas.

Table 3. Means for seven traits associated with biological nitrogen fixation (BNF) for 48 combinations of faba bean lines and *Rhizobium leguminosarum* strains

Faba bean line	<i>Rhizobium</i> strain	Nodule number score	Nodule mass score	Acetylene reduction activity micromol/plt/hr	Fresh weight	Dry weight g/plt	Total shoot nitrogen g/plt	BNF [§] index mg/plt
7	F59	7.8	4.9	29.7	49.9	6.7	184.6	75.6
7	F43	7.3	4.6	18.3	36.6	2.9	90.3	56.5
7	F8	7.7	4.6	30.0	49.9	6.8	214.8	77.5
7	F19	7.0	4.4	26.8	43.1	5.8	167.5	68.6
7	F17	8.2	4.9	31.4	54.4	7.4	205.9	81.9
7	F52	6.0	3.8	23.2	43.7	5.7	191.2	66.7
28	F59	2.2	1.3	6.9	19.7	2.5	55.5	25.9
28	F43	2.2	1.3	6.2	5.3	1.3	36.2	13.6
28	F8	4.2	2.2	16.5	16.7	2.4	68.5	32.2
28	F19	3.6	1.9	14.1	23.4	3.1	88.2	35.0
28	F17	1.9	1.0	6.0	9.1	1.3	34.8	15.2
28	F52	2.5	1.2	9.0	13.7	1.9	52.2	22.4
66	F59	5.3	3.1	20.3	36.4	4.8	129.9	54.8
66	F43	4.4	2.5	7.1	22.9	0.9	23.1	30.4
66	F8	5.5	3.2	21.3	35.8	4.8	127.3	56.1
66	F19	3.4	1.5	12.9	20.4	2.7	80.0	30.7
66	F17	4.9	3.0	19.2	28.3	3.8	110.0	46.3
66	F52	5.1	2.9	19.9	36.2	4.7	144.8	54.8

Table 3 contd.

Faba bean line	<i>Rhizobium</i> strain	Nodule number score	Nodule mass score	Acetylene reduction activity micro mol/plt/hr	Fresh weight g/plt	Dry weight nitrogen g/plt	Total shoot mg/plt	BNF ^s index
73	F59	4.5	2.5	17.3	28.5	3.8	105.7	43.9
73	F43	3.7	2.1	5.8	9.6	0.6	16.4	17.4
73	F8	4.0	2.2	15.5	22.7	3.1	87.0	36.7
73	F19	4.8	2.7	18.9	29.7	4.0	115.8	47.3
73	F17	2.2	1.0	7.5	9.3	1.4	40.7	17.1
73	F52	4.5	2.4	17.9	30.2	4.0	108.5	46.1
115	F59	4.1	2.3	15.7	24.3	3.3	91.1	38.9
115	F43	5.1	2.8	9.3	36.6	2.6	69.2	46.3
115	F8	5.3	3.2	20.6	50.6	6.5	204.6	70.1
115	F19	3.8	2.0	14.8	17.0	2.4	60.8	30.1
115	F17	5.2	3.1	19.8	30.5	4.1	124.1	49.5
115	F52	5.4	3.2	21.0	37.3	4.9	156.3	57.5
150	F59	4.1	2.1	15.9	23.5	3.2	92.4	37.3
150	F43	4.0	2.2	7.9	14.5	0.5	13.0	24.4
150	F8	4.7	2.6	18.0	30.5	4.0	109.6	46.7
150	F19	4.7	2.6	18.5	30.6	4.0	113.5	47.3
150	F17	3.8	2.1	15.1	24.8	3.3	81.6	37.4
150	F52	5.0	3.0	19.7	33.0	4.4	133.1	51.7
275	F59	7.0	4.4	26.8	46.3	6.1	189.0	71.2
275	F43	5.5	3.1	11.2	28.9	1.8	51.5	41.4
275	F8	6.7	4.3	26.1	44.4	5.9	166.0	68.5
275	F19	6.9	4.5	26.9	46.0	6.3	181.6	71.5
275	F17	6.0	3.8	23.4	39.6	5.3	157.1	62.3
275	F52	4.7	2.7	18.4	30.6	4.0	113.0	47.3
311	F59	4.0	2.1	15.6	26.3	3.6	100.7	40.4
311	F43	2.5	1.4	5.4	2.5	1.5	38.2	12.0
311	F8	5.6	3.6	22.2	42.7	5.6	155.6	63.1
311	F19	3.0	1.4	11.7	15.3	2.1	58.0	25.2
311	F17	3.4	1.6	13.3	19.3	2.6	78.7	30.1
311	F52	3.6	1.8	14.3	23.6	3.2	91.8	35.2
Mean		4.7	2.7	33.9	29.1	3.7	106.5	45.0
LSD _{0.05}		0.9	0.7	3.6	4.7	0.6	25.3	6.4

+ Nodule number scored 1 - 9: 1 = 0 to 5 nodules, 2 = 6 to 15, 3 = 15 to 25 nodules, 4 = 26 to 35 nodules, 5 = 36 to 45 nodules, 6 = 46 to 55 nodules, 7 = 56 to 65 nodules, 8 = 66 to 75 nodules, 9 more than 75 nodules. ++ Nodule mass scored 1 - 5: 1 = 0 to 30 mg, 2 = 31 to 50 mg, 3 = 51 to 70 mg, 4 = 71 to 90 mg, 5 > 90 mg. ^s BNF index computed by principal component analysis using 7 traits (high values indicate greatest BNF)

Table 4. Variance components for six traits associated with biological nitrogen fixation (BNF) when analyzed over 48 faba bean lines x *Rhizobium leguminosarum* strain combinations

Traits	Host genotype	<i>Rhizobium</i> strain	Interaction
	----- % of variation -----		
Nodule number score (NN)	52.5	2.4	13.3
Nodule mass score (NM)	49.4	3.1	13.0
Acetylene reduction activity (ARA)	37.6	23.8	13.1
Plant fresh weight	47.5	12.7	26.0
Plant dry weight	34.2	31.8	23.2
Total shoot nitrogen (TSN)	42.3	6.8	22.4
BNF index [§]	51.1	15.0	21.3

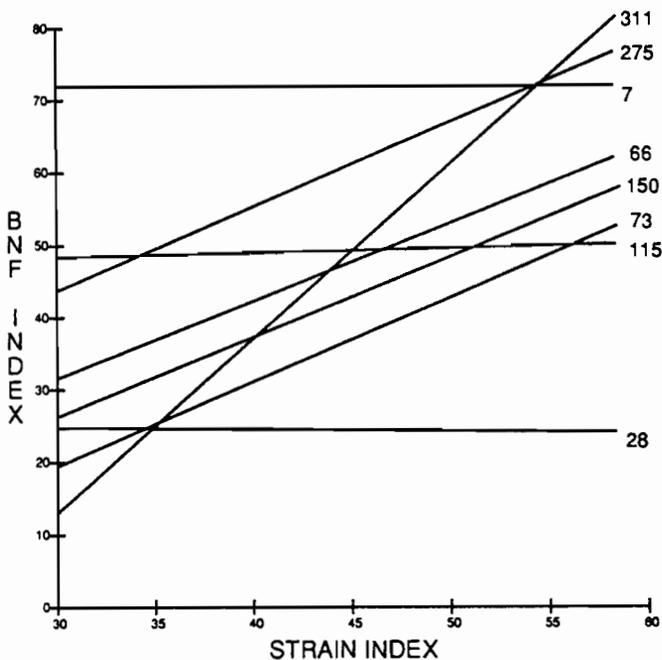
[§] BNF index computed by principal component analysis using six traits.

The significance of the host by *Rhizobium* interaction suggests that the selection and testing of both partners will be necessary to maximize the benefit from breeding for BNF improvement. This will probably require the use of mixed inoculum strains rather than using a singular strain because if superior host by *Rhizobium* strain combinations were identified there still would be problems of introduction and establishment of the improved *Rhizobium* strains into the soil. Even massive applications of an inoculated strain might be insufficient to successfully compete with the indigenous strains (Ellis *et al.* 1984).

Based on results from this study, we believe that *Rhizobium* could most effectively be introduced into faba bean breeding programmes during the germplasm testing and evaluation stages. The arguments supporting this strategy include the view that the legume by *Rhizobium* interaction is a plant-disease reaction in which the susceptibility of the host is desirable. Plant genotypes that perform equally with a series of *Rhizobium* strains could be referred to as having "Horizontal susceptibility" to nodulation or as having a "General Biological Nitrogen

Fixation Ability" (GBNF). Plant genotypes that perform differently with strains could be referred to as having "Specific" nodulation characteristics or "Specific Biological Nitrogen Fixation Ability" (SBNF). A GBNF type of performance would be the most desirable characteristic for planting in soils where indigenous *Rhizobium* strains are present. If the target area had no history of growing faba beans, then specific host by strain combinations could be useful. This would not be an alternative in Morocco where faba bean has been grown for centuries.

Figure 1. Regression of six *Rhizobium* strain indices on BNF index of eight lines of faba bean



The GBNF and SBNF concepts are similar to the average fixing ability (AFA) and to the specific fixing ability (SFA) terminology suggested by Fernandez and Miller (1987). These parameters can be quantified by using methods of stability and adaptation analysis based on research by Finlay and Wilkinson (1963) and Eberhart and Russel (1966). We used strains similar to environments in which each plant genotype was tested. Each strain then was characterized by an index represented by the mean efficiency over all genotypes in the study.

Strain index (X variable) was regressed on performance of individual genotypes (Y variable). Thus each plant genotype was characterized by a regression coefficient (b). Genotypes that had b close to 0 could be classified as having GBNF ability and could be expected to perform in a stable way with most *Rhizobium* strains. The other useful statistic in searching for

desirable plant genotypes is average performance. Lines with high stable performance would be preferred.

The foregoing computations were performed with data from this study, using PC1 (BNF index) as a BNF predictor. The results are shown in Figure 1. Lines 7, 28, and 115 had a regression coefficient not significantly different from zero. Lines 66, 73, 150, and 275 had b statistically equal to 1. Line 311 had a regression coefficient greater than 1. The two extreme lines for average performance (71.2 and 24.1 BNF index) had a good GBNF ($b=0$), demonstrating that the most desirable levels of GBNF and average performance can be frequently associated in a single line. Line 7 was the most desirable. Line 311 with the highest SBNF was low performing on the average.

We believe our GBNF protocol could be very useful for testing the interaction between elite plant germplasms with inoculums collected from a number of sites from the crop target areas. Genotypes that have good average performance and have b close to 0 are the most desirable. This would be a rapid test that could be done before genotype testing in the field. It also would allow the separation of *Rhizobium* effects from other environmental factors.

REFERENCES

- Barnes D.K., Heichel G.H., Vance C.P. and Ellis W.R. (1984). A multiple-trait breeding program for improving the symbiosis for N₂ fixation between *Medicago sativa* and *Rhizobium meliloti*. *Plant and Soil* 82:303-314.
- Caldwell B.E. and Vest G. (1970). Effects of *Rhizobium japonicum* strains on soybean yields. *Crop Sci.* 10:19-21.
- Dart P.T. and Pate J.S. (1959). Nodulation studies in legumes. III. The effects of delaying inoculation on the seeding symbiosis of Barrel Medic. *Medicago tribuloides* Desr. *Aust. J. biol. Sci.* 12:427-444.
- Eberhart S.A. and Russel W.A. (1966). Stability parameters for comparing varieties. *Crop. Sci.* 6:36-40.
- Ellis W.R., Ham G.E. and Schmidt (1984). Persistence and recovery of *Rhizobium japonicum* inoculum in a field soil. *Agron. J.* 76:573-576.
- Fernandez G.C.J. and Miller J.C. Jr. (1985). Estimation of heritability by parent-offspring regression. *Theor. Appl. Gen.* 70:650-654.
- Fernandez G.C.J. and Miller J.C. Jr. (1987). Analysis of host genotype x rhizobial strain interaction in N₂ fiion. *Euphytica.* 36:903-911.
- Finlay K.W. and Wilkinson G.N. (1963). The analysis of adaptation in a plant breeding program. *Aust. J. Agric. Res.* 14:742-754.
- Holl F.B. (1975). Host plant control of the inheritance of dinitrogen fixation in the *Pisum-Rhizobium* symbiosis. *Euphytica.* 24:767-770.
- Johnson R.A. and Wilchern D.W. (1982). Applied multivariate statistical analysis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Kidby D.K. and Goodchild D.L. (1966). Journal of General Microbiology 45:147-152. *In: The Biology of Nitrogen Fixation.* A. Quispel Ed. 1974 Amsterdam and Oxford: North-Holland.
- Lie T.A. and Mulder E.G. (1979). Breeding for symbiotic nitrogen fixation. p. 341-348. *In: Plant Breeding Perspectives.* J. Sneep and A.J.T. Hendriksen, Eds. PUDOC, Wageningen.
- Miller J.C., Zary and Fernandez G. C. J. (1986). Inheritance of N₂ fixation efficiency in cowpea. *Euphytica* 35:551-560.

- Minchin F.R., Summerfield R.J. and Eaglesham A.R.J. (1978). Plant genotype x rhizobial strain interaction in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. *Trop. Agric. (Trinidad)* 55:107-115.
- Mytton L.R. (1975). Plant genotype x *Rhizobium* strain interactions in white clover. *Ann. appl. Biol.* 80:103-107.
- Mytton L.R., El-Sherbeeny M.H. and Lawes D.A. (1977). Symbiotic variation in *Vicia faba*. 3. Genetic effect of host plant, *Rhizobium* strain and of host x strain interaction. *Euphytica* 26:785-791.
- Rai R. and Singh S.N. (1979). Interaction between chickpeas (*Cicer arietinum* Linn.) genotypes and strains of *Rhizobium* sp. *J. Agric. Sci., Camb.* 92:437-441.
- Sadiki M. (1990). Germplasm development and breeding for increased biological nitrogen fixation of Faba bean in Morocco. Ph.D. Dissertation, University of Minnesota.
- Viands D.R., Barnes D.K. and Heichel G.H. (1981). Responses to bidirectional selection for characteristics associated with nitrogen fixation in alfalfa. USDA Tech. Bull. 1643.
- Westermann D.T. and Kolar J.J. (1978). Symbiotic $N_2(C_2H_2)$ fixation by bean. *Crops Sci.* 18:986-990.

ETUDE TAXONOMIQUE DES *RHIZOBIUM* SP. D'ACACIA ET DE *SESBANIA*

P. de LAJUDIE*, G. LORTET*, M. NEYRA*, S. BADJI*+,
I. NDOYE*+, C. BOIVIN*, M. GILLIS**, B. DREYFUS*

*Laboratoire de Microbiologie des Sols, ORSTOM, BP 1386, Dakar, Sénégal

**Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent K.L.,
Ledeganckstraat, 35, 9000-Gent, Belgique

+ Direction des Eaux et Forêts, BP 1831, Dakar, Sénégal

+ + Direction des Affaires Scientifiques et Techniques, BP 4025, Dakar, Sénégal

Résumé: La classification des bactéries capables d'induire des nodules sur les Légumineuses a subi de nombreux remaniements ces dernières années. Autrefois basée sur l'aptitude des isolats à infecter certaines plantes, cette classification est maintenant davantage fondée sur l'étude phylogénétique des souches: hybridations ADN/ADN, ADN/ARNr, séquençage d'ARNr, analyse des protéines... Ainsi, on a vu récemment la description de plusieurs nouveaux genres et espèces, et cette classification est en constante évolution. Les *Rhizobium* tropicaux, en particulier ceux isolés des Légumineuses arborées, sont encore mal définis. En collaboration avec l'Université de Gand, nous avons entrepris l'étude d'une centaine de souches de *Rhizobium* isolés d'*Acacia* sp. et de *Sesbania* sp.: analyse des protéines par PAGE-SDS, tests nutritionnels en galeries API, hybridations ADN/ARNr, spectre d'hôtes. Les résultats montrent une grande hétérogénéité parmi ces souches, qui se répartissent en trois groupes principaux: un groupe rassemble des isolats de *Sesbania* sp. et d'*Acacia* sp., un groupe contient des isolats de *Sesbania* sp., et un groupe est composé d'isolats d'*Acacia* sp. Le spectre d'hôte montre que la plupart des isolats des différents groupes est capable d'induire des nodules sur différentes espèces d'*Acacia* et de *Sesbania* et qu'il est impropre de désigner comme des "souches d'*Acacia*" et des "souches de *Sesbania*".

Abstract: The taxonomy of nodule-inducing bacteria of leguminous plants has changed considerably over the last few years. It was first based on plant infection and is now based on DNA/DNA and DNA/rRNA hybridization, rRNA sequencing, protein analysis, etc. Several new genera and species have been proposed recently. Tropical rhizobia are poorly documented, especially those isolated from leguminous trees. In collaboration with the University of Gent, we began a study of close to 100 strains of *Rhizobium* sp. isolated from *Acacia* sp. and *Sesbania* sp., looking at SDS-PAGE protein patterns, API nutritional tests, DNA/DNA and DNA/rRNA hybridizations and host specificity. These strains appeared to be very heterogeneous, and belong to three main groups composed of *Sesbania* and *Acacia* isolates (group 1), *Sesbania* isolates (group 2), and *Acacia* isolates (group 3). Most isolates are capable of nodulating both *Acacia* and *Sesbania* species, thus indicating that they cannot be defined as "*Acacia* strains" or "*Sesbania* strains".

CLASSIFICATION DES RHIZOBIUMS

La classification bactérienne a évolué depuis la formation de groupements subjectifs vers des arrangements généraux plus objectifs généralement basés sur des ressemblances phénotypiques. Celles-ci se sont avérées être trop variables et ne représentent qu'une partie mineure du génôme. Ce sont enfin les classifications basées sur plusieurs aspects de la cellule bactérienne, incluant des parentées génétiques qui sont maintenant adoptées. En particulier, la classification des bactéries capables d'induire la nodulation des racines ou des tiges des

Légumineuses a subi de nombreux remaniements ces dernières années. Autrefois établie sur la base des spectres d'hôtes des bactéries, c'est-à-dire de leur aptitude à noduler certains genres ou groupes de genres de Légumineuses, cette classification peu satisfaisante a été abandonnée au début des années 1980.

De nouvelles approches moléculaires (hybridations ADN/ADN, analyse des protéines, hybridations 16S rARN/ADN total, séquençage de l'ARNr 16S...) ont alors été utilisées pour définir la position taxonomique des rhizobiums et leurs relations phylogénétiques. Ainsi de nouveaux genres et espèces de rhizobiums ont été décrits récemment et actuellement les rhizobiums sont classés en quatre genres (voir Figure 1): *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* (Jordan 1982, 1984), *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.* 1988) et *Sinorhizobium* (Chen *et al.* 1988). Cependant cette classification reste imparfaite: le groupe des *Bradyrhizobium* est assez homogène quoique on y distingue plusieurs sous-groupes; il est assez proche de *Rhodopseudomonas* et *Azorhizobium* en est apparenté. *Rhizobium* est plus hétérogène, *R. meliloti* et *R. leguminosarum* sont proches d'*Agri. tumefaciens* biovar 2, tandis que *R. loti* est plus proche d'*Agri. tumefaciens* biovar 1 B. Par ailleurs, des sous-groupes, qui n'ont pas encore reçu de nom, ont été identifiés chez *R. meliloti* (Eardly *et al.* 1990), *Azorhizobium* (Rinaudo *et al.* 1991), et parmi les rhizobiums de Légumineuses arborées (Jarvis 1983, Zhang *et al.* 1991). Enfin, cette classification est en constante évolution du fait de nouveaux isollements: seulement 15% des 19700 espèces de Légumineuses ont fait l'objet d'isollements bactériens à ce jour.

Un comité international s'est réuni et a publié récemment des recommandations sur les critères standards minimaux requis pour modifier la taxonomie des rhizobiums, et qui comprennent à la fois des données phylogéniques et phénotypiques (Graham *et al.* 1991, voir Figure 2). Il devenait en effet nécessaire que la taxonomie des rhizobiums réponde aux mêmes critères que ceux retenus pour la taxonomie du monde bactérien (caractéristiques morphologiques et culturelles, homologies ADN/ADN et ADN/ARNr, %G+C, profils électrophorétiques de protéines...), tout en conservant ses critères distinctifs particuliers (performances symbiotiques, sérologie, sensibilité aux phages...) qui sont secondaires pour la taxonomie mais essentielles pour les études pratiques et l'utilisation des souches.

Etude taxonomique des Rhizobium sp. nodulant les Sesbania et les Acacia au Sénégal

Les rhizobiums des Légumineuses arborées sont encore mal connus. Certaines souches sont très spécifiques, tandis que d'autres présentent un spectre d'hôte très large (Trinick 1980, Dreyfus et Dommergues 1981, Dommergues *et al.* 1984, Herrera *et al.* 1985). Beaucoup d'entre elles sont capables d'induire des nodules efficaces sur des Légumineuses herbacées (Trinick 1965, Herrera *et al.* 1985, Martinez-Romero *et al.* 1991). Certaines études portant sur un nombre restreint de souches suggèrent que les bactéries à croissance rapide isolées d'arbres sont proches de *Rhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum* (Trinick 1980, Dommergues *et al.* 1984, Lindström et Lehtomäki 1988).

Par analyse numérique basée sur 115 caractères phénotypiques, Zhang *et al.* (1991) ont montré qu'une centaine de souches isolées d'*Acacia senegal*, de *Prosopis chilensis* au Soudan

ou d'autres Légumineuses d'autres régions, présentent une grande diversité et forment 19 groupes séparés. Cependant leur position taxonomique exacte reste à déterminer.

Au laboratoire de microbiologie des sols de l'ORSTOM à Dakar, en association avec le laboratoire de microbiologie de l'Université de Gand, nous étudions les souches à croissance rapide isolées de différentes espèces d'*Acacia* et de *Sesbania* principalement au Sénégal. Rappelons que les acacias sont nodulés soit par *Bradyrhizobium* (*A. albida*), soit par *Rhizobium* (*A. senegal*, *A. raddiana*) ou indifféremment par l'un ou l'autre (*A. seyal*) (Dreyfus and Dommergues 1981); les *Sesbania* spp. sont nodulés par *Rhizobium* ou *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.* 1988).

Figure 1. Classification actuelle des rhizobiums

Genre	Espèce	Biovar	Plantes nodulées
<i>Bradyrhizobium</i>			
	<i>E. japonicum</i>		<i>Glycine soja</i> , <i>Glycine max</i>
<i>Rhizobium</i>			
	<i>R. leguminosarum</i>	<i>viciae</i>	<i>Pisum</i> , <i>Vicia</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i>
		<i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
		<i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
	<i>R. meliloti</i>		<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i>
	<i>R. loti</i>		<i>Lotus</i>
	<i>R. galegae</i>		<i>Galega</i>
	<i>R. tropici</i>		<i>Phaseolus vulgaris</i> L. Beans, <i>Leucaena</i> sp.
	<i>R. huakuii</i>		<i>Astragalus sinicus</i>
<i>Azorhizobium</i>			
	<i>A. caulinodans</i>		<i>Sesbania</i>
<i>Sinorhizobium</i>			
	<i>S. fredii</i>		<i>Glycine soja</i> , <i>Glycine max</i>
	<i>S. xinjiangensis</i>		<i>Glycine soja</i> , <i>Glycine max</i>

Les résultats de l'analyse numérique par ordinateur fondée sur l'étude du profil électrophorétique des protéines cellulaires totales en PAGE-SDS, des hybridations ADN/ADN et ARN/ADN montrent que ces souches (plus d'une centaine) appartiennent toutes au genre *Rhizobium*, présentent une grande hétérogénéité, et forment quatre groupes principaux, distincts des autres *Rhizobium* décrits (voir Figure 3): le groupe I, proche de *R. meliloti*, comprenant des isolats d'*Acacia* spp. et de *Sesbania* spp.; le groupe II, proche de *R. meliloti*,

ne comprenant que des isolats de *Sesbania* spp.; le groupe III, proche de *R. loti*, ne comprenant que des isolats d'*Acacia* spp. et un groupe atypique.

Figure 2. Etudes utiles pour la définition de nouveaux genres et espèces de rhizobiums (selon Graham et al. 1991)

- caractéristiques morphologiques et culturelles (taux de croissance, type de colonies sur YM, utilisation de différentes sources de Carbone...),
- G+C % *Rhizobium* 59-64 mol %
Azorhizobium 66-68 %
Bradyrhizobium 61-65 %,
- homologies ADN/ADN (> 70%, avec $\Delta T_m < 5^\circ\text{C}$ à l'intérieur d'une espèce),
- hybridations 16S rARN ADN total,
- profils électrophorétiques des protéines solubles totales en SDS-PAGE,
- mobilité électrophorétique des enzymes du métabolisme,
- séquence du 16S rARN,
- RFLP de l'ADN total (hybridations avec sondes spécifiques nif, nod, ISRm1, ...) ou de sections amplifiées par PCR.
- lipopolysaccharides cellulaires,
- performances symbiotiques avec les hôtes végétaux,
- groupe sérologique
- sensibilité aux bactériophages,
- et toute autre caractéristique utile.

N.B. La définition de nouvelles espèces nécessite la convergence du maximum de ces informations dont certaines sont indispensables (notamment les pourcentages d'homologie ADN/ADN).

Les résultats auxanographiques (API 50CH, API 50AO et API 50AA) sont en accord avec ces groupements. Par ailleurs, le contenu plasmidique des souches semble corrélé avec le groupe auquel elles appartiennent. Enfin, nous avons étudié les caractéristiques symbiotiques des souches de ces différents groupes taxonomiques en mesurant leur pouvoir de nodulation et leur potentiel fixateur d'azote sur différentes espèces de *Sesbania* et d'*Acacia*.

La figure 4 montre que le spectre d'hôte de ces souches est très varié, et fait apparaître que la plupart des isolats des différents groupes sont capables d'induire des nodules (plus ou moins efficaces) à la fois sur *Acacia* et sur *Sesbania*, suggérant qu'il est impropre de distinguer des "rhizobium d'*Acacia*" et des "rhizobium de *Sesbania*". A l'intérieur d'un groupe, il n'est pas possible de dégager clairement une logique de nodulation des souches qui le composent. Il en est de même des souches des différents groupes. Ainsi les spectres d'hôtes établis à partir des différentes espèces de *Sesbania* et d'*Acacia* ne sont pas caractéristiques des groupes taxonomiques précédemment définis. Ceci étaye le fait, déjà signalé plus haut, que les propriétés symbiotiques des rhizobiums ne reflètent pas leur proximité taxonomique.

Figure 3. Dendrogramme des souches isolées d'Acacia et de *Sesbania* au Sénégal (obtenu par analyse numérique des profils de protéines en SDS-PAGE).



Figure 4. Spectre d'hôte de quelques représentants des quatre groupes de *Rhizobium* isolés de *Sesbania* et d'*Acacia* sur différentes espèces d'*Acacia* et de *Sesbania*

	GROUPE I					GROUPE II					GROUPE III			GROUPE ATYPIQUE	
Souches	1009	1007	25	929	606	51	22	609	611	Pj12	1004	1010	1014	507	20MB
Plantes-hôtes d'origine	<i>Acacia laeta</i>			<i>Acacia</i> sp.	<i>Sesbania cannabina</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	<i>Sesbania cannabina</i>	<i>Sesbania grandiflora</i>	<i>Prosopis juliflora</i>	<i>Acacia senegal</i>	<i>Acacia senegal</i>	<i>Acacia senegal</i>	<i>Sesbania pachycarpa</i>	<i>Acacia senegal</i>	
Plantes-hôtes testées															
<i>A. seyal</i>	e	E	E	e	e	e	O	I	e	I	I	E	e	I	I
<i>A. raddiana</i>	I	e	e	O	I	I	O	O	O	e	I	I	I	O	I
<i>A. senegal</i>	e	e	E	O	O	O	O	O	O	e	e	e	e	O	I
<i>A. albida</i>	I	O	I	O	O	I	O	O	O	I	I	I	I	O	I
<i>S. rostrata</i>	I	I	O	E	e	E	E	E	e	e	O	O	O	I	O
<i>S. grandiflora</i>	I	I	O	O	e	E	I	e	E	I	O	O	O	I	O
<i>S. pubescens</i>	O	I	e	E	E	E	I	e	E	O	O	I	I	I	O

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

PERSPECTIVES

Nous allons poursuivre l'étude de ces groupes de souches en choisissant plusieurs voies d'approche: caractères phénotypiques (tests nutritionnels en galeries API 150, étude des flagelles, température maximale de croissance...), spectre d'hôte sur d'autres genres végétaux, analyse en RFLP de fragments PCR de la zone intergénique entre les ARNr 16S et 23S (en collaboration avec l'Université de Lyon I), séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S, localisation des gènes symbiotiques sur des plasmides ou sur le chromosome, étude des signaux bactériens ayant un rôle dans la nodulation (en collaboration avec le centre INRA de Castanet-Tolosan), construction de sondes spécifiques pouvant servir de marqueurs de ces groupes, moyen indispensable pour les études sur le terrain...

Ainsi, nous désirons accumuler le maximum d'informations sur le partenaire bactérien, sa compétitivité dans le sol en fonction de différentes conditions écologiques, dans la perspective d'améliorer la fixation d'azote, augmenter la croissance des plantes, contribuer à l'amélioration de la fertilité des sols sahéliens et à la réhabilitation des terres dégradées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chen W.X., Yan G.H. and Li J.L. (1988). Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium gen. nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 392-397.
- Chen W.X., Li G.S., Qi Y.L., Wang E.T., Yuan H.L. and Li J.L. (1991). *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 (2): 275-280.
- Dommergues Y.R., Diem H.G., Gauthier D.L., Dreyfus B.L. and Cornet F. (1984). Nitrogen-fixing trees in the tropics: potentialities and limitations. In: *Advances in nitrogen fixation research*. C. Veeger and W.E. Newton, Ed. Proceedings of the 5th International Symposium on Nitrogen Fixation. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, Wageningen, The Netherlands. pp. 7-8.
- Dreyfus B.L. and Dommergues Y.R. (1981). Nodulation of *Acacia* species by fast- and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 41(1): 97-99.
- Dreyfus B.L., Garcia J.L. and Gillis M. (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans gen. nov.*, sp. nov., a stem-nodulating, nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27: 222-240.
- Eardly B.D., Materon L.A., Smith N.H., Johnson D.A., Rumbaugh M.D. and Selander R.K. (1990). Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 187-194.
- Graham P.H., Sadowsky M.J., Keyser H.H., Barnett Y.M., Bradley R.S., Cooper J.E., de Ley D.J., Jarvis B.D.W., Roslycky E.B., Strijdom B.W. and Young J.P.W. (1991). Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 (4): 582-587.
- Herrera A.M., Bedmar E.J. and Olivares J. (1985). Host specificity of *Rhizobium* strains isolated from nitrogen-fixing trees and nitrogenase activities of strain GRH2 in symbiosis with *Prosopis chilensis*. *Plant Sci.* 42: 177-182.
- Jarvis B.D.W. (1983). Genetic diversity of *Rhizobium* strains which nodulate *Leucaena leucocephala*. *Current Microbiology* 8: 153-158.
- Jordan D.C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium gen. nov.*, a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32: 136-139.
- Jordan D.C. (1984). Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.1. N.R. Kreig and J.G. Holt, Ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. pp. 234-254.

- Lindström K. et Lehtomäki S. (1988). Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (Galega) compared with other fast-growing rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* 50: 277-287.
- Martinez-Romero E., Segovia L., Mercante F.M., Franco A.A., Graham P. and Pardo M.A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41(3): 417-426.
- Rinaudo G., Orenge S., Fernandez M.P., Meugnier H. and Bardin R. (1991). DNA homologies among members of the genus *Azorhizobium* and other stem- and root-nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41(1): 114-120.
- Trinick M.J. (1965). *Medicago sativa* nodulation with *Leucaena leucocephala* root-nodule bacteria. *Aust. J. Sci.* 27: 263-264.
- Trinick M.J. (1980). Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobia groups. *J. Appl. Bacteriol.* 49: 39-53.
- Zhang X., Harper R., Karsisto M., Lindström K. (1991). Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of Leguminous trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 (1): 104-113.

INDUCTION OF DISEASE RESISTANCE

R.K.S. WOOD FRS

Department of Biology - Imperial College
London SW7 2 BB UK

Abstract: Confined to diseases caused by fungi or bacteria, resistance to a parasite is induced by events caused by the parasite itself, or by another microorganism. Induced resistance is the most important form of resistance. It has been most studied as race-specific resistance between races of a pathogen and cultivars of a host in which genes for resistance are matched specifically by genes for virulence/avirulence. This research aims to determine how matching of these genes leads to resistance. Much is known about avirulence genes and their products, and expression of resistance through synthesis and accumulation of phytoalexins. Little is known about resistance genes and their products, and on how matching of gene products leads to the expression of resistance. The final objective of this very active field of research is the direct use of the DNA of resistance genes to transform selected susceptible into resistant plants. There has been much less research on race non-specific resistance between races and cultivars, probably controlled by many genes. And still less is known about the commonest form of resistance, non-host, the resistance of plants to microorganisms other than their own parasites. There are formidable problems in studying race non-specific and non-host resistance at physiological and molecular levels; progress in elucidating them will be slow despite their importance in crop production and in natural populations. The voluminous research on "cross-pollination", resistance induced other than by the parasite, locally and systemically, will be assessed in relation to a better understanding of self-induced resistance and to the development of new methods of disease control by sensitizing plants to infection.

Résumé: Limitée aux maladies dues à des champignons ou des bactéries, la résistance à un parasite est induite par des événements dûs au parasite lui-même ou à un autre microorganisme. La résistance induite est la forme de résistance la plus importante; elle a surtout été étudiée en tant que résistance locale spécifique sur des races de pathogènes et cultivars d'un hôte dont les gènes sont spécifiquement associés à des gènes de virulence/avirulence. Cette étude vise à déterminer comment le groupement de ces gènes conduit à la résistance. Les gènes d'avirulence et leurs produits sont bien connus ainsi que l'expression de la résistance par synthèse et accumulation de phytoalexines. On connaît peu les gènes de résistance et leurs produits et le processus d'induction de la résistance dû au groupement de ces produits génétiques. L'objectif final de cette recherche de pointe est d'utiliser directement l'ADN des gènes de résistance pour transformer des plantes sélectionnées sensibles en plantes résistantes. Les recherches portant sur la résistance locale non spécifique des espèces locales et cultivars qui font probablement intervenir une très grande quantité de gènes, ont été moins nombreuses. La forme de résistance la plus répandue, sans hôte (ou résistance des plantes à des microorganismes autres que leurs propres parasites), est encore moins connue. Les problèmes auxquels se trouve confrontée l'étude de la résistance locale non-spécifique et sans hôte sont immenses à l'échelle physiologique et moléculaire mais les progrès seront lents alors qu'il est urgent de les élucider au profit de la production agricole et des populations locales. Les très nombreuses recherches portant sur la "protection croisée", la résistance induite autre que celle venant du parasite, localement et systématiquement, seront évaluées ici pour permettre de mieux comprendre la résistance auto-induite et l'élaboration de nouvelles méthodes de lutte contre la maladie en rendant les plantes sensibles à l'infection.

In plant pathology, the science of plant diseases and the technology of controlling these diseases, the central problems are specificity of parasitism, resistance and susceptibility. This paper will be confined to resistance in diseases caused by microorganisms, and to induced resistance which is far more important than constitutive resistance that is not induced. Resistance to a potential parasite is induced when it depends on earlier events in a plant caused by the same parasite, or by other microorganisms. It can also be induced in other ways not to be considered.

Self-induced resistance

First, resistance induced by the parasite itself.

Race-specific resistance

This has been and still is one of the most active fields of research in plant pathology. For technical and practical reasons most of the research has been with cultivars of crop plants and races of parasites causing important diseases in which the genetics of reactions between host and parasite conform, or are assumed to conform, to the gene-for-gene hypothesis. This states that each gene for resistance in a cultivar can be matched by a gene for virulence in races to which that cultivar is susceptible. Usually, resistance is dominant and virulence is recessive. Research has been based on the following model:

		Host	
	Genotype	R_1R_1	r_1r_1
Parasite	A_1 or A_1A_1	Resistant	Susceptible
	a_1 or a_1a_1	Susceptible	Susceptible

A_1, R_1 dominant genes for avirulence/resistance

Similarly for $A_2, R_2 \dots A_n, R_n$. When races and cultivars carry two pairs of matching genes $A_1a_2 \times R_1R_1r_2r_2$ the response is resistant because A_1RR_1 is epistatic to $a_2r_2r_2$ which alone would specify susceptibility. These and other facts imply that in cultivar/race responses, resistance depends on matching of genes for resistance and avirulence. This causes something to happen which prevents or greatly decreases the growth of the parasite. The parasite does grow in the absence of this matching.

The aim of most research has been to determine how expression of an A_1 gene leads to resistance in R_1 but not in r_1 (or $R_2, r_2, R_3, r_3 \dots$ plants). The first objective has been to isolate from the A_1 parasite a substance, putatively the product of the A_1 gene, that causes effects associated with resistance in R_1 but not in r_1 plants. These effects and their consequences for the parasite are as follows:

INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

- Immediately before, during or soon after infection, damage or death of one cell or a few host cells, and little or no growth within or beyond these cells. This has long been known as the hypersensitive response (HR) a valuable term, so long as it is restricted to responses to infectious agents.
- The HR itself could explain resistance to an obligate parasite because by definition this type of parasite can continue to grow only in or in association with living, susceptible host cells.
- The HR itself will not explain resistance to a non-obligate parasite which will grow in or in association with damaged or dead host cells.
- Therefore in the HR there must also be other changes which prevent or decrease greatly growth of the parasite.
- There may be changes with similar effects in the absence of a well-defined HR.
- The changes in the two foregoing points by far the most studied are those that cause new or much increased synthesis and then accumulation of substances toxic to the parasite - phytoalexins.
- Much less studied but no doubt very important are changes leading to lignification and other effects on the structure of cells.

Almost all research so far has focused on the isolation from an A_1 parasite a substance, an elicitor, the putative product of the A_1 gene, which will cause one or more of the effects referred to above in R_1 but not in r_1 or in other plants. Almost all research on elicitors has focused on their role in the synthesis of phytoalexins and how an elicitor reacts with the product of a resistance gene to cause this synthesis. Note that reactions with other matching genes $A_2 \times R_2R_2$ and so on, also lead to the synthesis of the same phytoalexin.

There is now this difficulty that has been with us since the early work on phytoalexins. Synthesis of a phytoalexin may be induced by a wide variety of substances other than the supposed products of avirulence genes. These substances also, and somewhat confusingly, are called elicitors. They act non-specifically on all cultivars. These features imply that induction of synthesis is a two-stage process in which specific or non-specific elicitors cause host cells to produce a substance which directly, or at one or more removes, triggers synthesis presumably by derepressing one or more genes that code for enzymes in the biosynthetic pathway with the phytoalexin as the end product. This hypothetical substance has been called a constitutive or endogenous elicitor which acts as a second messenger. It is non-specific in contrast to the product of the avirulence gene which functions as a first messenger in cultivar/race interactions.

It is unfortunate that elicitor is used for both substances because they will function quite differently in host cells. Their combined action results in synthesis and accumulation of a phytoalexin, only at the site of infection, but enough to limit growth of the parasite. Note the economy of resistance induced in this way. It depends not on substances produced

constitutively as part of a normal metabolism but on substances produced very locally when and where they function usefully to limit damage caused by a parasite.

Isolation and identity of elicitors

Research has focused on race specific elicitors causing death of host cells or accumulation of phytoalexins, or both. In most of this work, the elicitors from a range of pathogens were not specific in their effects on host plants and therefore are of little consequence in specificity, although they are otherwise important because of their striking effects on plant cells, often at very low concentrations. But fortunately there are now a few diseases for which there is good evidence for race-specific elicitors.

Perhaps the best is for races of *Fulvia fulva* and tomato cultivars. Substances produced by each of various races cause necrosis only in leaves of plants resistant to the race. These substances are produced only when the parasite grows in susceptible leaves; they have not yet been produced *in vitro*. One of the substances is a small, linear peptide, the amino acids of which have been sequenced. There is similar but much less complete evidence for race-specific elicitors in a few other diseases.

Along quite different lines are the striking advances made by the use of recombinant DNA technology in a number of diseases caused by bacteria. For example, DNA corresponding to a gene in a race X controlling avirulence to a plant A has been isolated, cloned and then used to transform a virulent race Y so that it becomes avirulent on plant A. A number of avirulence genes have been expressed *in vitro*, isolated and sequenced. The products of these avirulence genes have been isolated and would be expected to have the same effects on cultivars with matching genes for resistance as do the races of pathogens from which the genes were isolated and cloned.

In the early tests, and unexpectedly, the products of the genes did not reproduce the specific effects caused by the pathogens as did, at least partially, the extracellular proteins produced in tomato leaves by *Fulvia fulva*. However, there are more recent reports of elicitors from bacteria carrying cloned avirulence genes which are cultivar-specific for hypersensitive responses. Corresponding research with fungal pathogens is less advanced because of the technical difficulties of transforming fungi, especially those that are obligate parasites. But the techniques will be developed because of the much greater importance of diseases caused by these pathogens.

Cultivar-specific resistance genes

Again, the objectives are to isolate and clone specific genes, to obtain their products and then use them with the products of matching avirulence genes to elucidate the mechanisms of race-specific resistance. At present there is little to report mainly because of the general difficulties in manipulating DNA of higher plants, the particular difficulty of identifying the lengths of DNA comprising resistance genes, and because almost nothing is known about the products of these genes. However, the cloning of resistance genes is certain to attract research on a

large scale in the years ahead because of the prospective benefits of using these genes directly to transform susceptible into resistant plants.

There can be little doubt that significant progress in elucidating induction of race-specific resistance will depend very largely on the use of recombinant DNA. But the problem is highly complex and despite the power and scope of the techniques, progress will be slow unless the resources deployed for its solution are much greater than they are at present.

Race non-specific resistance

This again relates to responses between races of a pathogen and cultivars of a host. But now the responses are not highly differential as they are in race-specific resistance. Race non-specific resistance acts against all races, sometimes at different but usually not at very different levels. Resistance rarely appears as a hypersensitive response. Instead the pathogen continues to grow but much less slowly than in susceptible plants. Most of the evidence indicates that resistance is controlled by a number of genes, probably many. I shall assume that resistance again is induced although, in fact, there is not much evidence on this point. I shall also assume that induction is controlled by gene-for-gene mechanisms because as a plant pathologist, I think of disease in terms of factors in plants each of which have to be accommodated by a potential parasite if it is to become virulent. In race-specific resistance, one factor in a race matched by one factor in a cultivar leads to a major effect recognized as high resistance. In contrast, race non-specific resistance depends on many pairs of factors, each with minor effects which add up to decrease growth of the parasite. It is difficult to see how this happens. Thus, if resistance depends on phytoalexins with the hypothesis referred to earlier of a specific first messenger followed by one or more non-specific messengers, why in race non-specific resistance are many specific first messengers required to activate the non-specific messengers.

Little as is known about the mechanisms of race-specific resistance, there is almost total ignorance about mechanisms in race non-specific resistance. Thus, it is difficult to see how recombinant DNA technology can be used to elucidate its mechanisms, or to relieve some of the problems of its use in plant breeding.

Non-host resistance

This is the resistance of plants to microorganisms other than their parasites, by far the commonest and most important type of resistance. By its nature, we know nothing about its genetic control. But we know that it may be induced and expressed as is resistance of cultivars to races of a parasite, and as hypersensitive responses associated with accumulation of phytoalexins. Indeed some of the early research on phytoalexins was based on non-host resistance. This poses many problems because in race-specific resistance matching of the product of one avirulence and one resistance gene leads to damage or death of protoplasts and synthesis of a phytoalexin. How are similar events caused in non-host resistance? If again there be a single gene pair, then where is the virulence allele, is the receptor the product of a resistance gene similar in type, is the endogenous elicitor the same, are there multitudes of

matching avirulence and resistance genes for the thousands of microorganism/non-host pairs. Such questions are readily posed but answers are difficult in genetical or functional terms for resistance induced specifically.

Seemingly to circumvent the complexities of specific induction it has been proposed that non-host resistance is induced non-specifically; the plant recognizes and then rejects "non-self" tissues. One (or a few) substances common in all parasites reacts with one (or a few) common receptors in plants to induce resistance non-specifically. A potential parasite becomes a parasite by nullifying this resistance but does so specifically, only in the plant that becomes its host. This has been called "establishing a basic compatibility" which is no more than saying that a non-parasite becomes a parasite. Later in the evolution of parasitism, race-specific resistance emerges to break this symbiosis. But this in no way illuminates the problem of how a pro-parasite becomes a parasite and the problem is no easier for less than for highly specialized parasites. For me this has for many years been the main conceptual problem in plant pathology with all the difficulties of studying it genetically and with the uncertain prospect of being able to use recombination DNA technology in probing its solution.

Resistance induced by other microorganisms

This usually is called "cross-protection" which is a poor term for the following: plant A, normally susceptible to parasite X is made resistant by inoculating it with avirulent parasite Y, closely related or otherwise. Usually, but not always, plant A has to be inoculated with Y some time before X. In most of the very many examples of this type of resistance X is placed close to Y. Some have then assumed that the first inoculation with Y causes changes in and around infected cells and it is these changes which make hitherto susceptible cells resistant to X. Such changes could be the accumulation of phytoalexins as proposed by Müller and Börger in the earliest experiments which led to the concept of phytoalexins. But, in fact, there is little evidence that resistance is thus induced. It is more likely that inoculation with Y does cause changes in cells of plant A such that they now respond to X as they did to Y. Genetically susceptible cells respond as if they were genetically resistant.

This leads to resistance induced not locally, as in the foregoing, but systematically as in the long series of striking experiments of Kuć and co-workers. Inoculation of cotyledons or lower leaves of cucurbits with a virulent parasite causes upper leaves to become remarkably resistant to the same or other virulent parasites. The parasite does not move from the first inoculated leaves and phytoalexins do not accumulate in the upper leaves. These effects have also been reported and investigated in a few other diseases, notably tobacco and *Peronospora tabacina*. Whether or not they are common remains to be determined. We have failed to get them in a number of diseases and there is also the point that if they are common in the field then why are foliar diseases so damaging in many crops, particularly when the lower parts of plants are likely to be infected as in potato blight.

In spite of much research, the mechanisms of induced systemic resistance remains unknown. What probably happens is that first infection causes changes in host cells and then the release or new production of substances that move upwards from infected leaves to other parts of plants, especially leaves. Their cells are altered so that although genetically susceptible they

now react to pathogens as if they were genetically resistant, such as they would by transfer by plant breeding of a gene for resistance to the pathogen, or transformation by the corresponding length of DNA. The implications for disease control are clear. The translocated substance is a novel type of fungicide which acts not directly against the pathogen but by making susceptible cells functionally resistant. A few commercial fungicides such as the dichlorocyclopropanes and fosetyl-A also may act in this way by "sensitizing" host cells to infection.

Induction of susceptibility:

Most research on race-specific resistance is based on specific induction of resistance through matching of host and parasite genes. In its absence the plant is susceptible. There is the alternative, less widely held view (already mentioned briefly) that induction of resistance is non-specific and that susceptibility depends on specific suppression of the induced resistance. Somewhat oddly, this suppression is often called "induction of susceptibility". There are schemes in which products of avirulence genes react with products of resistance genes to prevent binding of the non-specific elicitor. This then remains free to induce resistance. Such a model is one step less simple than the other in determining specificity. It is supported, partially at least, by reports of a few diseases in which plants with resistance genotypes become susceptible to a potentially avirulent parasite when this is inoculated near a virulent parasite inoculated some time earlier. So far as I know only local effects have been reported, the intervals between first and second inoculations are much longer and the effects are less striking than for locally induced resistance. There is also the problem that non-specific elicitors are very much more active than are the suppressors reported from *Phytophthora infestans*, the pathogen most studied in this context. On present evidence, specific induction of resistance is the more promising basis for future research on race-specific resistance.

CONCLUSIONS

Most research should continue to be on induction of resistance in race/cultivar interactions for which there are the best prospects for progress in elucidating mechanisms, and for practical benefits for plant breeding by genetic manipulation, more conventionally and through recombinant DNA and tissue culture. Also, if we do not elucidate race-specific resistance, what hope is there of more than superficial research on race non-specific resistance for long widely exploited, and for non-host resistance with its possible potential in the breeding of disease-resistant crop plants. One also hopes that much more research will be done on resistance induced by organisms other than the parasite, particularly in systemically induced resistance in which there must be translocation of a substance which makes susceptible cells respond as if they were genotypically resistant. Such a substance would indeed be a novel type of systemic fungicide.

RECENT RESEARCH INTO THE CELLULAR, MOLECULAR AND GENETICAL BASES OF COMPATIBLE HOST-FUNGUS INTERACTIONS IN (VESICULAR) ARBUSCULAR ENDOMYCORRHIZA: APPROACHES AND ADVANCES

Vivienne GIANINAZZI-PEARSON
Laboratoire de Phytoparasitologie, INRA-CNRS
Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes
INRA, BV 1540, 21034 Dijon, France

Abstract: *The growth of many agricultural, horticultural and fruit crops in soils of low fertility is dependent on (vesicular) arbuscular endomycorrhizas because of the important role they play as biofertilizers and biocontrol agents. The symbiotic nature of these endomycorrhizas implies that compatibility systems are reciprocally activated during symbiotic interactions, and their widespread occurrence throughout the plant kingdom means that these interactions must be based on widely occurring molecular mechanisms. Host factors favour fungal development prior to contact and once root infection occurs both organisms show structural and physiological adaptations which lead to morphological integration and functional compatibility between them. Morphofunctional integration reaches a maximum with the formation of fungal arbuscules in parenchyma root tissues; these are surrounded by a specialized host membrane, essential to bidirectional nutrient exchange between the endomycorrhizal associates. The complex events occurring between host and fungus with endomycorrhiza formation must involve coordinated changes in gene expression in both partners, with specific control of the host plant over fungal development. Plant gene expression during host-fungus interactions in (vesicular) arbuscular endomycorrhiza differs from that occurring in the presence of pathogens, and there is little or no activation of host defence mechanisms by endomycorrhizal fungi. However, in plants mutated for their ability to form endomycorrhizas, plant resistance reactions to the symbiotic fungi do occur. Since endomycorrhiza formation is under multiple, dominant host gene control, symbiosis-specific genes may be controlling the expression of plant defence genes in normal endomycorrhizal plants so that the symbiotic association can be established.*

Résumé: *La plupart des plantes terrestres cohabite en symbiose avec certains champignons du sol (Glomales), formant les associations endomycorhiziennes à vésicules et arbuscules. Sur les sols pauvres, la croissance de nombreuses cultures agricoles, horticoles et fruitières dépend des endomycorhizes grâce au rôle qu'elles jouent dans la nutrition minérale et la protection contre des agents pathogènes telluriques. Le caractère symbiotique des endomycorhizes VA implique que les systèmes de compatibilité réciproque soient activés pendant les interactions entre symbiotes. Le fait que ces associations se rencontrent chez un grand nombre d'espèces végétales laisse supposer que les interactions symbiotiques doivent être basées sur des mécanismes moléculaires très répandus. Des études des stades de préinfection in vitro ont montré que l'échange de signaux entre hôte et champignon stimule le contact nécessaire pour déclencher l'infection. Une fois l'infection établie, les deux symbiotes subissent d'importantes modifications qui dépendent directement du type de tissu-hôte colonisé. Des techniques ultrastructurales associées à la cytologie moléculaire ont été utilisées pour décrire les zones où les cellules fongiques et végétales sont en contact étroit à l'intérieur du tissu racinaire. L'hôte et le champignon présentent des adaptations structurales et physiologiques qui entraînent une intégration morphologique et un état de compatibilité fonctionnelle entre les deux organismes. Cette intégration morpho-fonctionnelle atteint son maximum dans les cellules du parenchyme du cortex racinaire où les champignons VA se divisent en arbuscules*

(haustoria) entourés par une membrane-hôte spécialisée. C'est aussi à ce niveau que se produit l'essentiel des échanges nutritifs entre les partenaires endomycorhiziens. La complexité des événements survenant entre hôte et champignon lors de la formation des endomycorhizes implique des changements coordonnés de l'expression des gènes chez les deux partenaires, et la plante-hôte doit nécessairement contrôler le développement fongique puisqu'il se limite spécifiquement au parenchyme cortical de la racine. Toutefois, les analyses biochimiques et moléculaires indiquent que les gènes impliqués dans les réactions de défense ne sont que peu activés au cours des interactions hôte-champignon chez les endomycorhizes VA. L'état symbiotique des tissus mycorhiziens au contraire est caractérisé par des modifications dans l'expression génique de la plante-hôte qui diffèrent de celles survenant en présence des pathogènes. Les mutants isogéniques, résistant aux champignons endomycorhiziens ont été obtenues chez les légumineuses par mutagenèse chimique. L'analyse de ces mutants a montré que la formation d'endomycorhizes VA dépendait de nombreux gènes dominants de la plante-hôte. Il est intéressant de noter que l'absence de formation des endomycorhizes chez ces mutants est liée au déclenchement localisé des réactions de défense de l'hôte lorsqu'un champignon VA entre en contact avec les racines. Il est donc possible que les gènes végétaux spécifiques à la symbiose endomycorhiziennes contrôlent l'expression des gènes de défense pour permettre l'établissement de l'association symbiotique entre les racines et les champignons VA.

Many land plants would probably not exist today without the symbiotic mycorrhizal associations that have co-evolved between their roots and certain soil fungi. Different types of mycorrhiza can be found depending on the plant and fungal taxa involved, but by far the most common type is that called (vesicular) arbuscular endomycorrhiza (Gianinazzi-Pearson 1984). It is formed by over 80% of plant species growing in a wide range of terrestrial ecosystems. The fungi involved (Glomales) therefore have a very wide host range with which they are able to establish a reciprocally compatible relationship. Consequently, plant-fungal compatibility is the rule in endomycorrhiza and plant resistance is the exception. This contrasts with most other microorganisms that infect and colonize living plant tissues and which generally show a fairly limited host range. It is essential to understand the bases of the widespread compatibility systems involved in symbiotic endomycorrhizal associations in order to use and manage them efficiently in plant production. The aim of this presentation is to discuss recent approaches and progress in research into how host plants influence fungal development during pre- and post infection phases, react at the cellular level to exploit the symbiotic infection and control fungal development and maintain it compatible with their own.

THE INFECTION PROCESS

Fungal development

The pre-infection phase: Plant-fungal interactions in endomycorrhiza are complex and one symbiont affects the behaviour of the other during the different stages of infection. *In vitro* studies of pre-infection stages have recently shown that factors stimulating spore germination and hyphal growth of (vesicular)-arbuscular endomycorrhiza fungi are specifically produced by host plants (Gianinazzi-Pearson *et al.* 1989, Paula and Siquiera 1990, Nair *et al.* 1991).

This suggests that signal exchange occurring between host and fungus before contact is important in favouring initial infection events. Many substances present in root exudates could be acting as plant signal(s). Among these, flavonoids and isoflavonoids, which affect the expression of *nod* genes in *Rhizobium* (Rolfe 1988), have been shown to mimic the stimulating effect of root exudates on fungal development *in vitro* (Table 1) and to enhance endomycorrhizal infection under conditions of low to medium inoculum potential (Siquiera 1991). Since these effects are concentration dependent, the relative presence of such molecules in root exudates may be a key factor in determining rates of contact, and consequently infection development, between endomycorrhizal symbionts.

The post-infection phase: The major effects of the host plant on fungal behaviour occur after cell contact between the symbionts and these are dependent on the type of host tissue colonized (Gianinazzi-Pearson 1984, Bonfante-Fasolo 1984). The fungus forms appressoria in contact with the root surface, from which infection hyphae develop and cross the outer cell layers inter- or intracellularly. Mycelium only proliferates when hyphae reach the parenchyma tissue where the fungus forms highly branched intracellular haustoria, arbuscules. These are only induced within living parenchymal cells of the root cortex, which means that any plant signals involved in their formation must be specific to these tissues but occur in a wide number of plants. Arbuscules are terminal structures of hyphae and although they are short-lived, they are essential for reciprocal nutrient exchange between host and fungus.

The host plant not only affects morphology but also the physiology of the endomycorrhizal fungus as it colonizes the root tissues. Alkaline phosphatase, an enzyme that is localized within the fungal vacuoles, can only be detected in the subapical part of hyphae growing from spores whilst its activity is induced throughout the active mycelium within roots of host plants showing a growth stimulation (Tisserant *et al.* submitted). This, together with previous observations (see for example Gianinazzi-Pearson and Gianinazzi 1983), suggests that this fungal enzyme activity may be a useful marker of a functional endomycorrhizal symbiosis.

Host reaction

Different types of host reaction are elicited by the symbiotic fungus and these also depend on the type of tissue that is infected (Bonfante-Fasolo 1984). The only evident reaction in the epidermis or hypodermis is the production of wall-like material around the fungus as it crosses the cells forming simple, unbranched hyphae or coils. Parenchymal cells of the root cortex, on the contrary, react strongly to fungal infection and subsequent arbuscule formation. As in the outer root tissues, host wall material is abundant around the invading hypha, but this decreases to scattered molecules as the fungus grows and divides quickly (Dexheimer *et al.* 1979). The volume of cytoplasm and number of organelles (mitochondria, plastids) increase, nuclei swell, become lobed (Toth and Miller 1984, Berta *et al.* 1990) and DAPI staining and ultrastructural analysis of plant nuclei indicate that they have increased transcriptional activity (Berta *et al.* 1990).

Despite these important changes, the host cell remains alive during the whole infection cycle and returns to its normal aspect after arbuscule senescence. The host cell encloses the fungus

with a specialized membrane that we have called the periarbuscular membrane (Gianinazzi-Pearson *et al.* 1991), and which is continuous with the peripheral plasma membrane of the cell. Although this new membrane shows a similar structural and cytochemical nature to the plasma membrane, it does possess some specific properties essential to the compatible relationship between the plant cell and the fungal symbiont (Table 2).

Of particular interest is the existence of two enzyme activities - neutral phosphatase and ATPase (Jeanmaire *et al.* 1985, Gianinazzi-Pearson *et al.* 1991). Neutral phosphatases are considered to indicate sites of glycosylation: they are active in Golgi bodies (Dauwalder *et al.* 1969) and along the plasma membrane of elongating root cells where wall precursors are being actively produced (Jeanmaire *et al.* 1985). Their preferential activation all along the periarbuscular membrane in infected parenchymal cells suggests that the host is also producing wall precursors around the growing fungus, that is even where structured host wall is not formed.

Analytical and molecular cytology has confirmed the occurrence of host wall components (pectin, cellulose) and of enhanced oligosaccharide production here (Bonfante-Fasolo *et al.* 1990, Gianinazzi-Pearson *et al.* 1990). The continual production of such molecules by the host, probably elicited by the fungus, could act as a source of nutrients to the latter, or of molecular signals essential to the symbiotic development of the endomycorrhizal association. As soon as the fungus stops growing and begins to senesce in parenchyma cells, host material accumulates again around the hyphal remains indicating that the living fungus somehow prevents polymerization of host wall precursors into a structured deposit.

Such interference by the (vesicular) arbuscular fungus of host wall-building activities creates an interface between the symbionts where barriers to nutrient exchange are reduced to a minimum. This is an essential structure to the functioning of the (vesicular) arbuscular endomycorrhizal symbiosis. Active H^+ ATPase is specifically localized by the host plant along the periarbuscular membrane of this symbiotic interface (Gianinazzi-Pearson *et al.* 1991) but, contrary to neutral phosphatase, the H^+ ATPase activity disappears with the aging of the arbuscule and senescence of the hyphae. The presence of this enzyme only around living arbuscule hyphae indicates that the periarbuscular membrane is energized and therefore capable of active uptake of nutrients, especially phosphate, that are released by the living fungus.

The infected parenchymal cells of an endomycorrhizal root therefore acquire a new function of nutrient absorption, *via* the symbiotic fungus, which in a non-mycorrhizal root is restricted to the outer cell layers. The additional acquisition of this function by the parenchymal cells of an endomycorrhizal host root not only increases the surface area for absorption but also extends the absorbing zone of the root beyond that usually limited to immediately behind the apex.

PLANT CONTROL OVER FUNGAL DEVELOPMENT

Fungal biomass can reach over 10% of the root biomass in (vesicular) arbuscular endomycorrhizal associations but, as already mentioned, fungal proliferation and activity is

kept under host control within cortical parenchyma of the root cortex, and the fungus never penetrates the central cylinder nor meristematic tissue. Plants have co-evolved systems to offset the high energy cost of such an infection by exploiting the fungus's capacity to absorb soil nutrients and transport them into the root in its hyphae, so that the overall balance is positive, as illustrated in the well-known mycorrhizal effects on plant growth. It is evident that the close morphofunctional integration between plant and fungus in endomycorrhizas resulting from cellular interactions requires finely tuned compatibility systems in both partners.

Biochemical, molecular and genetical studies of the basis of these compatibility systems have, however, been hampered by the fact that endomycorrhizal fungi are obligate biotrophs and nothing is known of their sexual life cycle. It is possible to develop experimental approaches to get around these problems and so begin to provide answers to questions like:

- Are biochemical responses, considered to be part of active plant defence, induced by endomycorrhizal fungi?
- Do specific molecular modifications occur in plants, linked to endomycorrhiza formation?
- Are specific plant genes involved in compatible interactions with endomycorrhizal fungi?

Are plant defence mechanisms activated in endomycorrhiza?

Research addressed at answering this question has shown that whatever aspect of plant defence has been studied, the level of host response to (vesicular) arbuscular fungi is very weak as compared to events when plants resist pathogens. Callose and phenolic compounds are deposited around invading pathogens (Halbrock *et al.* 1986) but neither of these have ever been observed during normal endomycorrhizal infections (Maffei *et al.* 1986).

Although root infection by endomycorrhizal fungi can elicit the production of antimicrobial substances like phytoalexins and associated flavonoids (Morandi *et al.* 1984, Morandi and Gianinazzi-Pearson 1986), which are molecules associated with the development of plant resistance to pathogens (Bailey and Mansfield 1982), these compounds accumulate in relatively low amounts and late in the infection process as compared to what happens during pathogen attacks. Hyphal growth of endomycorrhizal fungi can be stimulated by the phytoalexins glyceollin and coumestrol (Table 1), and studies with xenobiotic compounds have shown that there is no consistent relationship between the accumulation of phytoalexins in roots and endomycorrhiza development (Morandi 1989), suggesting that these molecules do not play a central role in the control of the symbiotic fungi within host tissues.

Several types of proteins, of known (enzymes) or unknown function, are synthesized or activated by the penetration of a fungal pathogen into plant tissues and are considered to be markers of the host defence reactions controlling development of the pathogen (Ward 1986, Tahiri-Alaoui *et al.* 1990). (Vesicular) arbuscular endomycorrhizal infections have been analyzed for the presence of some of these, in order to elucidate whether a plant controls the development of a mycorrhizal fungal symbiont in a similar way to that of pathogens.

Table 1. Effect of host or non-host root exudates and flavonoids or isoflavonoids on *Gigaspora margarita* spore germination and hyphal growth *in vitro* (Gianinazzi-Pearson *et al.* 1989; Gianinazzi-Pearson, Branzanti and Morandi, unpublished results)

	Relative response after 9 days (%)	
	Spore germination	Hyphal growth
Lupin root exudates	+ 6	+ 18
Clover root exudates	+ 130	+ 282
Hesperitin - 1.5 μ M	+ 17	+ 251
Naringenin - 150nM	+ 30	+ 80
Apigenin - 150nM	+ 10	+ 77
Glyceollin - 0.5 μ M	0	+ 45
Coumestrol - 50 μ M	0	+ 48
Quercitin - 1.0 μ M	- 12	+ 36

Table 2. Some characteristics of the peripheral plasma membrane and the periarbuscular membrane of parenchymal cortical cells of endomycorrhizal roots (Dexheimer *et al.* 1979; Jeanmaire *et al.* 1985; Gianinazzi-Pearson *et al.* 1990, 1991).

Reaction	Peripheral plasmalemma	Periarbuscular membrane
Phosphotungstic acid	+	+
MAC 206 (oligosaccharide)	+	++
MAC 64 (glycoprotein)	+	-
Neutral phosphatase activity	-	+
ATPase activity	-	+

Biochemical analyses of root extracts of different plants indicate that overall peroxidase activity (in vacuoles and cell walls) is enhanced in endomycorrhizal roots (Dehne and Schönbeck 1979), but when wall-bound peroxidase activities (involved in wall stiffening) are considered alone, increases can only be detected during the initial phases of infection development (Spanu and Bonfante-Fasolo 1988). This enzyme activity can be localized, using histochemical techniques, in the epidermal and hypodermal cells of endomycorrhizal roots and in the middle lamella around growing intercellular hyphae in the root cortex, but it is not

present in cells containing intracellular arbuscular hyphae (Spanu and Bonfante-Fasolo 1988, Gianinazzi 1991). In contrast to pathogen infections, peroxidases do not therefore seem to be associated with plant control over symbiotic fungal development in the root cortex, nor are they linked to arbuscule senescence and death within host cells. However, priming of these enzymes in the outer tissues of endomycorrhizal roots may contribute to the reported biocontrol effects of the symbiotic association (Bagyaraj 1984).

Total chitinase activity is also higher in (vesicular) arbuscular endomycorrhizal roots as compared to non-mycorrhizal roots (Dehne and Schönbeck 1978), but the part of the activity due to host enzymes only increases during the early stages of mycorrhiza formation (Spanu *et al.* 1989). No increases in host chitinase synthesis have been found by immunological analyses in extracts from well-infected endomycorrhizal roots (Dumas *et al.* 1989) and similar observations have been made for the production of plant glucanases (Dumas *et al.* 1990). Again this contrasts with the important accumulation of both chitinases and glucanases during plant defence responses to pathogenic fungal infection of roots (Tahiri-Alaoui *et al.* 1990).

Another group of plant proteins induced by pathogen infections, called (PR)_{b1} proteins (Gianinazzi 1984) and which have no known function, are also only produced in extremely low amounts in endomycorrhizal roots. They are not detectable by immunoanalyses, but DNA/RNA hybridisation shows that there is a weak activation of genes synthesizing mRNA for these proteins in endomycorrhizal roots, as compared to that in pathogen-infected roots (Gianinazzi-Pearson *et al.* submitted). In fact, PR_{b1} protein can be immunolocalized in parenchyma cells where arbuscules are developing, and here it is limited to the host-derived material laid down around the fungal hyphae.

All these observations suggest that (vesicular) arbuscular endomycorrhizal fungi only weakly and very locally activate host defence mechanisms. This contrasts with plant responses to pathogens, which are rapid in resistant interactions but do occur, though more slowly, during susceptible infections (Carr and Klessig 1989, Linthorst *et al.* 1991). It seems, therefore, that although the host plant must somehow limit fungal development in endomycorrhiza, the processes involved may be different from those involved in pathogen control. This could be linked to the apparent weak virulence of (vesicular) arbuscular endomycorrhizal fungi vis à vis host tissues. It is evident that such a lack of aggressiveness between host plant and endomycorrhizal fungi must be an essential factor in the establishment of the persistent, balanced symbiotic relationship between the two endomycorrhizal partners.

Are specific molecules produced by the host plant in relation to endomycorrhiza formation?

The cellular observations described previously show that roots respond strongly to an endomycorrhizal infection and this can also be seen in the important amount of protein synthesized during interactions. Both quantitative and qualitative differences can be detected in proteins from endomycorrhizal roots by electrophoretic analyses. The host plant produces a number of new proteins, which have been called endomycorrhizins (Dumas *et al.* 1989, 1990, Wyss *et al.* 1991). The function of these endomycorrhiza-specific proteins has not yet been determined but they are not serologically related to host proteins induced by pathogens

(Dumas *et al.* 1989, 1990). However, at least one of them shows a serological homology with nodulins, proteins synthesized specifically during nodule formation (Wyss *et al.* 1991).

It thus appears that specific modifications in host gene expression, producing different families of proteins, occur when roots react to different types of fungal infection and that the plant must be able to discriminate very early between a pathogenic or a symbiotic fungus. Purification of endomycorrhizins, production of specific oligonucleotide probes or antibodies to them and identification of corresponding DNA clones will open the way to studies of plant genes expressed during host-fungus interactions in (vesicular) arbuscular endomycorrhiza.

Are specific plant genes involved in endomycorrhiza formation and function?

The discovery a few years ago of isogenic plant mutants resistant to endomycorrhizal fungi, obtained by chemical mutagenesis (EMS), represented a big step forward to answering this question (Duc *et al.* 1988). Since then, such resistance has been found in mutants of two different pea varieties and in a genotype of alfalfa (Gianinazzi-Pearson *et al.* 1991, Bradbury *et al.* 1991). Two endomycorrhiza-resistant phenotypes can be distinguished: an 'early' one where fungal development is stopped after appressorium formation on the root surface and a 'late' one where it is limited to intercellular hyphae in the root cortex, without formation of arbuscules.

In each case, the resistance to endomycorrhizal fungi is found in plants that are altered for their ability to form nodules with *Rhizobium*, which suggests that there may be links between common early infection events in nodulation and endomycorrhiza infection. Genetic studies of the pea mutants have shown that several different mutated loci can be responsible for the resistant phenotype and that the inability to form (vesicular) arbuscular endomycorrhiza is a recessive, monoallelic character. This differs from the resistance obtained in plants to pathogens and which is usually a dominant, inheritable character. It also means that susceptibility to (vesicular) arbuscular endomycorrhizal fungi is normally under the control of multiple, dominant genes in host plants which no doubt explains, at least in part, the widespread occurrence of the endomycorrhizal symbiosis in nature.

The structural aspects of the plant's reaction during initial infection events at the level of appressorium formation differ greatly between 'early' mutants and the parent wild type (Gianinazzi-Pearson *et al.* 1991, Gollotte 1991). In the latter, little or no cell modifications occur when an endomycorrhizal fungus comes into contact with the surface of epidermal cells. In contrast, strong autofluorescence (suggesting the presence of phenolic substances) can be observed in epidermal walls of mutants at contact points with fungal hyphae, as these pass from one epidermal groove to another in an attempt to infect.

At the ultrastructural level, these contact points are characterized by an important deposit of dense material on the inside of the epidermal host wall. This, together with the accumulation of autofluorescing substances, recalls plant defence reactions normally observed during pathogen attack and indicates that (vesicular) arbuscular endomycorrhizal fungi do possess elicitors to induce resistance responses in plants. This hypothesis is strengthened by the observation of hypersensitive responses to endomycorrhizal fungi in non-host plants like

Salsola kali (Allen *et al.* 1989). This could mean that activation of endomycorrhiza-specific host genes through plant recognition of a symbiotic fungus normally somehow represses the expression of plant defence genes, so maintaining resistance responses at a weak level in endomycorrhizal roots. Where chemical mutagenesis has altered the function of an endomycorrhiza-specific gene, as in the 'early' mutants, there is no longer regulation of defence genes and resistance phenomena are activated.

CONCLUSION

The striking modifications occurring in the host plant during the establishment and development of (vesicular) arbuscular endomycorrhizas make this symbiosis an interesting model for analyzing the fine regulation of compatible plant-fungal interactions. However, the results obtained so far raise more questions than they answer, for example:

- What are endomycorrhiza-specific genes coding for and how are their products involved in regulation of plant-fungal interactions?
- Why are defence responses (normally) so little activated by symbiotic fungi when these fungi are able to elicit such responses, as in endomycorrhiza deficient plant mutants?
- How do so-called symbiosis genes affect defence gene expression: are intergene interactions involved and if so what are the mechanisms that are responsible?

Molecular biology techniques are going to help us answer some of these questions and so explain in molecular terms the mechanisms involved in endomycorrhiza formation and function. Furthermore, such research should lead to the definition of more appropriate markers of the functional state of the symbiosis, essential tools for ecophysiological studies and for the rational use of endomycorrhiza in agroecosystems. This will have consequences for optimizing the management of endomycorrhiza in plant production systems, and the fact that over 80% of plants are susceptible to endomycorrhizal fungi should facilitate transposal of results to a wide range of agronomic hosts.

REFERENCES

- Allen M.F., Allen E.B. and Friese C.F. (1989). Responses of the non-mycotrophic plant *Salsola kali* to invasion by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 111: 45-49.
- Bagyaraj D.J. (1984). Biological interactions with VA mycorrhizal fungi. *In: VA Mycorrhizas.* C. Ll. Powell and D.J. Bagyaraj, Eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 131-153.
- Bailey J.A. and Mansfield J.W., Eds. (1982). *Phytoalexins.* Blackie Publishers, Glasgow, 334 pp.
- Berta G., Sgorbati S., Soler V., Fusconi A., Trotta A., Citterio A., Bottone M.G., Sparvoli E. and Scannerini S. (1990). Variations in chromatin structure in host nuclei of a vesicular arbuscular mycorrhiza. *New Phytol.* 114: 199-205.
- Bonfante-Fasolo P. (1984). Anatomy and morphology. *In: VA Mycorrhizas.* C. Ll. Powell and D.J. Bagyaraj, Eds. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 5-33.

- Bonfante-Fasolo P., Vian B., Perotto S., Faccio A. and Knox J.P. (1990). Cellulose and pectin localization in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: labelling continuity between host cell wall and interfacial material. *Planta*. 180: 537-547.
- Bradbury S.M., Peterson R.L. and Bowley S.R. (1991). Interactions between three alfalfa nodulation genotypes and two *Glomus* species. *New Phytol.* 119: 115-120.
- Carr J.P. and Klessig D.F. (1989). The pathogenesis-related proteins of plants. In: *Genetic Engineering, Principles and Methods* Vol. II. Plenum Press, New York. pp. 65-109.
- Dauwalder M., Whaley W.G. and Kephart, J.E. (1969). Phosphatases and differentiation of the Golgi apparatus. *J. Cell Sci.* 4: 455-498.
- Dehne H.W. and Schönbeck F. (1978). Untersuchungen zum Einfluss der endotrophen Mykorrhiza auf Pflanzenkrankheiten. 3. Chitinase-Aktivität und Ornithinzyklus. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 85: 666-678.
- Dehne H.W. and Schönbeck F. (1979). Untersuchungen zum Einfluss der endotrophen Mykorrhiza auf Pflanzenkrankheiten. II. Phenolstoffwechsel und Lignifizierung. *Phytopath. Z.* 95: 210-216.
- Dexheimer J., Gianinazzi S. and Gianinazzi-Pearson V. (1979). Ultrastructural cytochemistry of the host-fungus interfaces in the endomycorrhizal association *Glomus mosseae*/*Allium cepa*. *Z. Pflanzenphysiol.* 92: 191-206.
- Duc G., Trouvelot A., Gianinazzi-Pearson V. and Gianinazzi S. (1989). First report of non-mycorrhizal plant mutants (Myc⁻) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant Sci.* 60: 215-222.
- Dumas E., Gianinazzi-Pearson V. and Gianinazzi S. (1989). Production of new soluble proteins during VA endomycorrhiza formation. *Agric., Ecosystems, Environ.* 29: 111-114.
- Dumas E., Tahiri-Alaoui A., Gianinazzi S. and Gianinazzi-Pearson V. (1990). Observations on modifications in gene expression with VA endomycorrhiza development in tobacco: qualitative and quantitative changes in protein profiles. In: *Endocytobiology IV*, INRA Editions, Paris. pp. 153-157.
- Gianinazzi S. (1984). Genetic and molecular aspects of resistance induced by infections or chemicals. In: *Plant Microbe Interactions, Molecular and Genetical Perspectives* Vol. 1. Macmillan Publishing Co., New York. pp. 321-342.
- Gianinazzi S. (1991). Vesicular-arbuscular (endo)mycorrhizas: Cellular, biochemical and genetic aspects. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 35: 105-119.
- Gianinazzi-Pearson V. (1984). Root symbionts and their effects on plant nutrition. *Proc. VIth International Colloquium for the Optimisation of Plant Nutrition*. AIONP/CIRAD, Vol. 5: 1487-1494.
- Gianinazzi-Pearson V. and Gianinazzi S. (1983). The physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots. *Plant and Soil* 71: 197-209.
- Gianinazzi-Pearson V., Branzanti B. and Gianinazzi S. (1989). *In vitro* enhancement of spore germination and hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* 7: 243-255.
- Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. and Brewin N.J. (1990). Immunocytochemical localisation of antigenic sites in the perisymbiotic membrane of endomycorrhiza using monoclonal antibodies reacting against the peribacteroid membranes of nodules. In: *Endocytobiology IV*, INRA Editions, Paris. pp. 127-131.
- Gianinazzi-Pearson V., Smith S.E., Gianinazzi S. and Smith F.A. (1991). Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. V. Is H⁺-ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interfaces? *New Phytologist* 117: 61-76.
- Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S., Guillemin J.P., Trouvelot A. and Duc G. (1991). Genetic and cellular analysis of resistance to vesicular arbuscular (VA) mycorrhizal fungi in pea mutants. In: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions* Vol. I. Academic publishers, Dordrecht. pp. 336-342
- Gollotte A. (1991). Relations plante-champignon endomycorhizien chez des pois mutés pour leur capacité à former des symbioses: modifications cellulaires et biochimiques. Diplôme d'Etudes Approfondies, Univeristy of Dijon, France. 22 pp.
- Halbrock K., Cuyppers B., Douglas C., Fritzeimer K.H., Hoffman H., Rohwer F., Scheel D. and Schultz W. (1986). Biochemical interactions of plants with potentially pathogenic fungi. NATO ASI Series (Springer Verlag). *Cell Biology* Vol. H4: 311-323.

- Jeanmaire C., Dexheimer J., Marx C., Gianinazzi S. and Gianinazzi-Pearson V. (1985). Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on the distribution of neutral phosphatase activities in root cortical cells. *J. Plant Physiol.* 119: 285-293.
- Linthorst H.J.M., Danhash N., Brederode F.T., Van Kan J.A.L., de Wit P.J.G.M. and Bol J.F. (1991). Tobacco and tomato PR proteins homologous to *win* and *pro-hevein* lack the "hevein" domain. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 586-592.
- Maffei M., Codignola A., Spanu P., Scannerini S. and Bonfante-Fasolo P. (1986). Costituenti fenolici in pareti cellulari di radici in piante axeniche e micorrizzate. *Gior. Bot. Ital.* 120, 22.
- Morandi D. (1989). Effect of xenobiotics on endomycorrhizal infection and isoflavonoid accumulation in soybean roots. *Plant Physiol. Biochem.* 27: 697-701.
- Morandi D. and Gianinazzi-Pearson V. (1986). Influence of mycorrhizal infection and phosphate nutrition on secondary metabolite contents of soybean roots. In: *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. INRA Editions, Paris. pp. 787-791.
- Morandi D., Bailey J.A. and Gianinazzi-Pearson V. (1984). Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Physiol. Plant Pathol.* 24: 357-364.
- Nair M.G., Safir G.R. and Siqueira J.O. (1991). Isolation and identification of vesicular arbuscular mycorrhiza stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 434-439.
- Paula M.A. and Siqueira J.O. (1990). Stimulation of hyphal growth of the VA mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* by suspension-cultured *Pueraria phaseoloides* cells and cell products. *New Phytol.* 115: 69-75.
- Rolfe, B.G. (1988). Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation. *Biofactors* 1: 3-10.
- Siqueira J.O. (1991). Fisiologia e bioquímica de micorrizas vesículo-arbusculares: algunes aspectos da relação fungo-planta e absorção de fósforo. IV Reuniao Brasileira Sobre Micorrizas, Mendes, Brasil, 105-131.
- Spanu P. and Bonfante-Fasolo P. (1988). Cell-wall bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. *New Phytol.* 109: 119-124.
- Spanu P., Boller T., Ludwig A., Wiemken A., Faccio A. and Bonfante-Fasolo P. (1989). Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. *Planta* 177: 447-455.
- Tahiri-Alaoui A., Dumas E. and Gianinazzi S. (1990). Detection of PR-b proteins in tobacco roots infected with *Chalara elegans*. *Plant Mol. Biol.* 14: 869-871.
- Toth R. and Miller R.M. (1984). Dynamics of arbuscule development and degeneration in a *Zea mays* mycorrhiza. *Amer. J. Bot.* 71: 449-460.
- Ward, E.W.B. (1986). Biochemical mechanisms involved in resistance of plants to fungi. NATO ASI Series (Springer Verlag). *Cell biology* Vol. H1: 107-131.
- Wyss P., Mellor R.B. and Wiemken A. (1990). Vesicular-arbuscular mycorrhizas of wild-type soybean and non-nodulating mutants with *Glomus mosseae* contain symbiosis-specific polypeptides (mycorrhizins), immunologically cross-reactive with nodulins. *Planta* 182: 22-26.

REPONSES DES PLANTES A L'AGRESSION PARASITAIRE

Jean-Paul GEIGER

ORSTOM, Laboratoire de Phytopathologie
B.P. 5045 3400 Montpellier Cedex 1 France

Résumé: Chez la plante - tout comme chez les autres organismes vivants - la "maladie" est un événement exceptionnel, soit parce que l'agent potentiellement infectieux est incapable d'attaquer physiquement ou chimiquement les barrières préformées de la plante, soit que à une étape donnée de la pathogénèse, l'agent est reconnu comme agresseur et déclenche chez son hôte une réaction suffisamment forte pour le neutraliser.

La réaction des plantes est complexe; elle concerne des molécules résultant directement du métabolisme primaire - telles que les PR-protéines, des enzymes lytiques, des polypeptides capables d'inhiber l'activité des enzymes excrétées, in vivo, par l'agent pathogène ou encore des protéines modifiant la composition de la paroi cellulaire de la plante; elle concerne également des produits du métabolisme secondaire: polymères (lignine, subérine, callose) impliqués dans l'édification de barrières mécaniques ainsi qu'une grande variété de molécules organiques à effet antibiotique (phytoalexines) ou "imprégnant" les parois.

Il convient d'être très prudent avant d'affirmer qu'une modification du métabolisme de la plante est réellement assimilable à une réaction de défense et donc qu'elle conditionne ou, au minimum, qu'elle module la pathogénèse. Plusieurs critères sont à examiner, tels que:

- *la cinétique d'apparition et de développement de la réaction: dans le cas d'une résistance induite le délai séparant l'attaque initiale de la mise en place des réactions est un facteur primordial; la plante (individu, cultivar ou variété) a d'autant plus de "chance" d'échapper au développement de l'infection que ce délai est plus court. Il peut être apprécié soit par dosage direct de la molécule étudiée (chimique ou enzymatique,... selon le cas), soit par estimation de l'apparition de mRNA lorsque les sondes adéquates sont disponibles;*
- *la localisation de la réaction: cette dernière, pour être efficace, doit se situer au niveau des points d'infection ou à proximité immédiate des agents pathogènes. Des techniques modernes, immunocytochimie dans le cas de molécules immunogènes, ou hybridation in situ, permettent de mener cette investigation au niveau non plus du tissu, mais de la cellule. Par ailleurs, la précision de cette recherche conduit à une meilleure estimation de la concentration réelle des molécules étudiées dans l'environnement immédiat du parasite;*
- *les caractéristiques physico-chimiques de la molécule elle-même (solubilité en milieu aqueux, par exemple).*

In fine, la démonstration de l'implication réelle d'une molécule dans la pathogénèse passe par la voie génétique; c'est cette approche qui a fourni la preuve définitive du rôle de la pisatine en tant que facteur de résistance du pois vis à vis de parasites tels que Fusarium solani.

Si l'identification des molécules impliquées dans la résistance des plantes est toujours activement en cours, un autre aspect se développe depuis plusieurs années, relatif aux premières étapes, cruciales, de la pathogénèse: étape de la reconnaissance du pathogène par la plante, étape de transmission des signaux de cellule à cellule et, enfin, étape d'élicitation des mécanismes de défense d'une part (côté plante) et du "système d'agression" d'autre part

(côté parasite). Le développement du processus pathogénique est le résultat d'interactions complexes entre les deux protagonistes - plante et agent pathogène. La non-reconnaissance, par la plante, de l'agent pathogène en tant qu'agresseur - soit dès l'instant où le contact s'établit, soit dès la pénétration dans la plante - conduit au développement de l'infection. La reconnaissance (interaction positive entre le produit d'un gène de résistance et le produit d'un gène d'avirulence) conduit à l'élicitation de réactions de défense qui, si elles sont efficaces, aboutit à l'élimination de l'agent pathogène ou à son confinement. Ce schéma est le plus simple possible; le plus souvent il s'établit une succession d'actions et de réactions, la réponse de l'hôte induisant, chez le parasite, de nouvelles armes (enzymes de détoxification, suppresseurs de reconnaissance...) qui, elles-mêmes, élicitent de nouvelles réactions de défense. On assiste ainsi à un véritable "Kriegspiel" (war game) entre les protagonistes où le vainqueur sera: le plus rapide et/ou le plus puissant et/ou le plus subtil (dans la mesure où il disposera d'un plus large éventail d'armes ou de contre-mesures de défense) et/ou, degré de complexité supplémentaire, dans la mesure où il se trouvera dans l'environnement le plus favorable à la manifestation de ses potentialités, l'expression des gènes étant modulée par des facteurs de ce type (température, par exemple).

Abstract: *Illness is exceptional in plants, either because the potential pathogen cannot vanquish the plant's existing physical or chemical barriers or because at some stage of the pathogenesis, it is identified as an aggressor, which triggers a sufficiently strong neutralizing reaction in the host.*

Plant reactions involve the expression of proteins, such as the PR-proteins, lytic enzymes, polypeptide hormones capable of inhibiting the activity of the enzymes excreted in vivo by the parasite or some other proteins that alter the composition of the plant cell walls. It also concerns products from the secondary metabolism: polymers (lignin, suberin, callose) that contribute to the production of mechanical barriers, and a large variety of organic molecules that have an antibiotic effect (photoalexins) or that impregnate the cell walls.

Great caution is advised before asserting that a change in the plant metabolism can be considered to be a defence reaction, able to condition or at least modulate pathogenesis. Several criteria need to be considered e.g.:

- *the kinetics of the appearance and development of the reaction: in the case of induced resistance the time between the initial attack and the actual reaction is vital. The plant (individual, cultivar or variety) has a better chance of "escaping" infection if the reaction triggering time is shorter. It can be evaluated by direct measurement of the selected molecule, or in some cases by estimating the production of mRNA, if suitable probes are available;*
- *location of reaction: to be maximally effective, the reaction should be localized at the points of infection or near the pathogenic agents. Modern techniques, immunocytochemistry in the case of immunogenic molecules, or in situ hybridization now make it possible to investigate these phenomena at the cell level and allow a more accurate estimate of the real concentration of the relevant molecules in the parasite's immediate environment;*

- *physico-chemical characteristics of the molecule itself (solubility in a liquid medium for instance).*

Furthermore, the great precision of these methods lead to a better understanding of the molecular basis of pathogenesis. Nevertheless the genetic approach (classical or molecular) is the only one that can conclusively demonstrate the genuine involvement of a molecule in pathogenesis. This method was used to assess the importance of pisatine in the resistance of pea genotypes against attack by Fusarium solani.

Identifying molecules of importance to plant resistance is actively underway, but there is another aspect that has been under study for several years: the first, all-important phases of pathogenesis, the phases during which the plant "recognizes the pathogen, transmits signals from cell to cell, and finally activates its defence mechanisms, while the parasite activates its 'system of aggression'". The development of the pathogenic process is the result of complicated interactions between the two protagonists, the plant and the pathogen. If the plant does not recognize the pathogen as an aggressor, at the moment of contact or penetration into the plant, the infection will develop. Recognition (positive interaction between the product of a resistance gene and the product of an avirulence gene) leads to activation of defence reactions which, if they are effective, will manage to eliminate or confine the pathogen. This is the simplest pathway. More often that not, there is a succession of actions and reactions. The response of the host activates new "weapons" in the parasite (detoxification enzymes, recognition suppressors, etc.) which in turn trigger new defence reactions. The protagonists play a veritable war game, with the winner being the fastest and/or the mightiest, and/or the subtlest (if he has a large choice of weapons or counter-defence) and/or the one benefiting from the most favourable environment for the expression of the resistance gene.

PLANT DEFENCE SYSTEMS AGAINST INVADING PATHOGENS

Dirk INZE and Marc VAN MONTAGU
Laboratorium voor Genetica, Universiteit Ghent
B-9000 Gent Belgium

Abstract: *Plants have highly efficient defence mechanisms against invading viruses, bacteria, fungi and even nematodes. The defence reaction is characterized by a rapid and localized cell death (hypersensitive response), the production of so-called pathogenesis-related (PR) proteins such as $\beta(1,3)$ -glucanases and chitinases, the synthesis of antimicrobial compounds, phytoalexins, and the reinforcement of the cell wall resulting from an induced lignin biosynthesis and the formation of hydroxyproline-rich glycoproteins (e.g. extensin) and glycine-rich proteins. It is very important to understand the molecular mechanisms that regulate the expression of the defence genes upon infection. To this end, we have cloned and characterized several genes encoding PR proteins, an extensin, an O-methyltransferase with a key role in lignin biosynthesis, and several superoxide dismutases which are thought to play a role in limiting the hypersensitive reaction to a restricted area. The expression of these genes has been analyzed by the use of promoter/ β -glucuronidase gene fusions in transgenic plants. It was found that most of these genes are not only induced by infection but that they are also expressed during specific stages of development and in response to other stress conditions. To achieve a better understanding of the role of $\beta(1,3)$ -glucanases and superoxide dismutases in the defence reactions, we have generated transgenic tobacco plants which overproduce these proteins to high levels. The results suggest that it will only be possible to engineer full resistance to pathogens when we are capable of controlling the expression of the whole, coordinated defence system. It is therefore important to characterize transacting factors which play a key role in the regulation of pathogen-induced gene expression.*

Résumé: *Les plantes ont des mécanismes de défense très efficaces contre l'invasion des virus, bactéries, champignons et même nématodes. La réaction de défense se manifeste par une nécrose rapide et localisée de la cellule (réaction d'hypersensibilité), la production de PR-protéines telles que les $\beta(1,3)$ -glucanases et chitinases, la synthèse de composés antimicrobiens, (phytoalexines), le renforcement de la paroi cellulaire par suite à une biosynthèse induite de la lignine, et la formation de glycoprotéines riches en hydroxyprolines (par ex. extensine) et de protéines riches en glycine. Il est important de comprendre les mécanismes moléculaires qui ont joué un rôle dans la régulation de l'expression des gènes de défense lors de l'infection. A cet effet, nous avons cloné et caractérisé plusieurs gènes en codant des PR-protéines, une extensine, une O-méthyltransferase ayant un rôle clé dans la biosynthèse de la lignine, et plusieurs dismutases superoxydases dont la fonction serait de limiter, pense-t-on, la réaction d'hypersensibilité à une zone restreinte. L'expression de ces gènes a été analysée par fusions des gènes régulateurs/ β -glucuronidase dans des plantes transgéniques. On a constaté que la plupart de ces gènes ne sont pas seulement induits par infection mais qu'ils s'expriment aussi à des stades spécifiques de développement et en réponse à d'autres conditions de stress. Pour mieux comprendre le rôle des $\beta(1,3)$ -glucanases et des dismutases superoxydases dans les réactions de défense, nous avons utilisé des plants de tabac transgéniques qui fabriquent ces protéines en excès. D'après les résultats obtenus, il apparaît qu'il ne sera pas possible de sélectionner une résistance complète aux pathogènes tant qu'on ne saura pas contrôler l'ensemble de tout le système de défense. Il est donc important de caractériser les facteurs agissant en trans sur l'ADN (transacting factors) qui jouent un rôle clé dans la régulation de l'expression des gènes induits par pathogènes.*

LES SIGNAUX SYMBIOTIQUES CHEZ *RHIZOBIUM MELILOTI*

Charles ROSENBERG

Laboratoire de Biologie Moléculaire
des Relations Plantes-Microorganismes

CNRS-INRA BP 27

31326 Castanet Tolosan Cedex, France

Résumé: *Les Rhizobium sont des bactéries du sol qui induisent spécifiquement sur leurs Légumineuses-hôtes la formation de nodules racinaires, au sein desquels ils réduisent l'azote atmosphérique. L'analyse génétique a permis d'identifier chez Rhizobium meliloti une vingtaine de gènes nod qui sont impliquées dans la reconnaissance spécifique de la plante, l'infection et la nodulation.*

Ces gènes se répartissent en trois classes: (1) les gènes nod communs, qui sont présents et équivalents du point de vue fonctionnel chez les différents espèces de Rhizobium. (2) Les gènes nod spécifiques, qui déterminent le spectre d'hôte de chaque espèce de Rhizobium. (3) Les gènes nod régulateurs, qui activent l'expression des gènes nod communs et spécifiques en présence de composés de type flavonoïdes, présents dans les exsudats racinaires des Légumineuses-hôtes. En combinant des approches génétique, moléculaire, cytologique et biochimique, il a été possible de montrer que ces gènes nod participent à la production de signaux diffusibles, dont la structure a été déterminée. Il s'agit d'oligomères de N-acétyl-D-glucosamine, acylés et sulfatés.

Ces composés lipo-oligosaccharidiques présentent une activité biologique spécifique de l'espèce de Rhizobium dont ils proviennent. Ainsi, les signaux produits par Rhizobium meliloti induisent, en absence de bactéries, des déformations de poils, des divisions cellulaires du cortex racinaire, et la formation de véritables nodules sur la luzerne, plante-hôte de R. meliloti, mais pas sur des Légumineuses qui ne sont pas nodulées par cette bactérie.

Il a été montré que la spécificité de ces signaux vis-à-vis de la luzerne dépend essentiellement des trois gènes de spécificité d'hôte nodH et nodPQ, dont le rôle consiste à ajouter un groupement sulfate sur le squelette oligosaccharidique. Les relations structure-fonction de ces signaux symbiotiques, ainsi que le rôle individuel des différents gènes nod dans leur production sont actuellement à l'étude.

Abstract: *Rhizobium are soil bacteria that induce the formation of nodules on the roots of specific leguminous hosts in which they reduce atmospheric nitrogen. In Rhizobium meliloti, genetic analysis has allowed about 20 nod genes that are involved in plant recognition, nodulation and infection to be identified.*

These genes fall into three categories: (1) the common nod genes, which are present and functionally equivalent in all Rhizobium species, (2) the specific nod genes which determine the range of possible host plants for each Rhizobium species, and (3) regulatory nod genes which activate the expression of the common and specific nod genes in the presence of flavonoid type compounds found in root exudates of legume host plants. A combination of genetic, molecular, cytological and biochemical approaches has shown that nod genes

participate in the production of diffusible signals which are composed of acylated and sulfated oligomers of N-acetyl-D-glucosamine.

The biological activity of these lip-oligosaccharidic compounds is specific to the Rhizobium species from which they are derived. Thus, the signals produced by R. meliloti induce, in the absence of bacteria, root hair deformations, division of cortical cells, and the formation of genuine nodules on alfalfa, the host plant for R. meliloti, but do not affect other legumes, which are not nodulated by this Rhizobium species.

The specificity of R. meliloti signals depends essentially on three specific nod genes, nodH and nodPQ, whose role is to add a sulfate group to the oligosaccharidic skeleton. The structure-function relationship of these symbiotic signals and the role of each nod gene in producing these signals is currently being studied.

CYTOCHIMIE DES POURRIDIES DE L'HEVEA

M. NICOLE*, N. BENHAMOU**, H. CHAMBERLAND*,

J.P. GEIGER*** et G.B. OUELLETTE*

* ORSTOM/Forêts Canada, 1055 du PEPS,

Sainte Foy, G1V 4C7, Québec, Canada

** Université Laval, FSAA, Département de Phytologie,

Sainte Foy, G1K 7P4, Québec Canada

*** ORSTOM, Laboratoire de Phytopathologie, BP 5045,

34000 Montpellier, France

Resumé: *Rigidoporus lignosus*, champignon basidiomycète agent du pourridié blanc, dispose d'enzymes impliquées dans la pourriture des racines d'*Hevea brasiliensis*. Les dégâts causés aux tissus de la plante se traduisent par une altération des parois des cellules. Une étude cytochimique a été menée récemment dans le but de compléter nos connaissances des mécanismes de ces maladies. L'utilisation de sondes moléculaires permet ainsi de mieux appréhender le rôle des enzymes fongiques dans la dégradation du bois et celui de la paroi fongique dans l'interaction arbre-champignon. Une exoglucanase conjuguée à l'or colloïdal permet la localisation des liaisons β -1-4-D glucanes des extrémités non réductrices de la cellulose. Son application aux coupes ultrafines de racines d'*Hévéa* infectés a montré que la cellulose est dégradée dès la pénétration des hyphes dans la plante, quelle que soit la nature des tissus colonisés par le champignon. Ces résultats suggèrent que les cellulases de *R. lignosus* jouent un rôle essentiel dans l'initiation de l'infection; elles interviendraient en outre au début de la dégradation des parois cellulaires lignifiées. Les laccases, polyphénols oxydases sécrétées par le parasite, sont impliquées dans la dégradation de la lignine. Le marquage immunocytochimique de ces enzymes dans le bois infecté a révélé que les laccases de *R. lignosus* ne se localisent ni dans le bois apparemment sain, ni dans les parois très dégradées. En revanche, elles pénètrent toutes les parois cellulaires de même que la lamelle moyenne en cours de pourrissement. Ceci suggère que la contribution de ces glycoprotéines à la dégradation de la lignine est limitée dans le temps mais non dans l'espace. Une lectine de blé (WGA) reconnaît spécifiquement la glucosamine, monomère constitutif de la chitine des parois fongiques. Le traitement de coupes par cette lectine, suivi de l'ovomucoïde-or, a montré que la chitine fongique est modifiée lorsque les hyphes pénètrent les parois des cellules hôtes et ce, vraisemblablement pour faciliter la sécrétion des enzymes de dégradation. Une altération de la chitine a également été observée durant la colonisation des racines. Cette altération se traduit, dans les cellules hôtes, par la libération d'oligosaccharides de chitine, éliciteurs potentiels de certaines réactions de défense de l'arbre à l'agression parasitaire.

Abstract: *Rigidosporus lignosus*, a basidiomycete fungus that causes white root rot, has enzymes that contribute to root rot in *Hevea brasiliensis*. Damage done to plant tissue leads to the deterioration of the cell walls. A cytochemical study was recently carried out to generate information on the mechanisms of this disease. Molecular probes can be used to better understand the role of fungal enzymes in the deterioration of wood and the fungal wall during tree-fungus interaction. Exoglucanase together with colloidal gold can be used to locate the β -1-4-D glucan bonds in the unaffected ends of the fiber. Applying it to ultrathin cuttings of the infected rubber plant root shows that the cellulose is decomposed as soon as the hyphae penetrates the plant, regardless of the nature of the tissue colonized by the fungus. These results suggest that the cellulase of *R. lignosis* plays an essential role in initiating infection. Furthermore, it also has an effect at the beginning of the degradation of the

lignified cell walls. The laccase, polyphenol oxydase secreted by the parasites are involved in the lignin degradation. Immunocytochemical marking of this infected wood shows that the laccase of R. lignosus does not settle in apparently healthy wood, nor in excessively damaged walls. On the other hand, it penetrates all cell walls and the middle lamella during rot development. This suggests that the contribution of glycoproteins to the degradation of the lignin is limited in time, but not in space. A wheat lectin (WGA) specifically recognizes the glucosamine, the monomer that builds up in the chitin of the fungal walls. Cutting this lectin and the ovomucoid gold has shown that fungal chitin is modified when the hyphae penetrates the walls of the host cells, and that it very probably occurs to facilitate the secretion of the degradation enzymes. Chitin degradation was also observed during root colonization. In the host cells, this leads to the release of chitin oligosaccharides that potentially elicit certain defense reactions in trees subjected to heavy parasite attack.

Rigidoporus lignosus, champignon basidiomycète agent du pourridié blanc, est responsable de la pourriture blanche des racines d'*Hevea brasiliensis* (Nandris *et al.* 1987), euphorbiacée cultivée pour sa production de latex. Les recherches antérieures sur les interactions hôtes-parasites (IHP), conduites tant au plan biochimique qu'à l'échelle cellulaire, ont mis en exergue certains mécanismes de l'agression des racines, de même que plusieurs réponses des arbres à l'infection.

Les hyphes mycéliennes pénètrent par les ouvertures naturelles de la racine, les blessures ou après digestion des parois cellulaires de l'assise peridermique (Nicole *et al.* 1986c, Nicole *et al.* 1987). La progression des hyphes dans les tissus racinaires se traduit par la dégradation des différents constituants des parois tels la subérine, la cellulose et la lignine (Nicole and Benhamou 1991a, Nicole *et al.* 1982, Nicole *et al.* 1987). L'altération de ces polymères résulte de l'activité d'enzymes fongiques extracellulaires (glycosidases et certaines oxydases) dont le rôle dans le processus de pourrissement est déterminant (Geiger *et al.* 1986a, Geiger *et al.* 1986b, Geiger *et al.* 1986d). L'aboutissement de la maladie conduit à l'arrêt de la production de latex (Nicole *et al.* 1982, Nicole *et al.* 1986b), économiquement préjudiciable aux plantations villageoises et industrielles.

Parmi les réactions de défense du système racinaire à l'infection, les barrières élaborées au niveau histologique (hyperplasie, néogénèse tissulaire, stimulation des cambiums...) et à l'échelle de la cellule (hypertrophie, épaissements pariétaux, subérification et lignification des parois, dépôts de callose...), de même que la stimulation d'une activité peroxydasique et la mise en place d'une lignine de défense constituent les réponses les plus significatives (Geiger *et al.* 1989, Nicole *et al.* 1986a, Nicole *et al.* 1992).

L'apparition récente des techniques de marquages à l'or colloïdal a ouvert de nouvelles perspectives dans l'étude, *in planta*, des IHP (Bendayan 1984, Benhamou 1989, Herman 1988, McFadden 1991) autorisant la localisation spécifique d'une, ou plusieurs, molécules à l'échelle de la cellule. Ces sondes moléculaires, appliquées au couple Hévéa-*R. lignosus*, ont permis une meilleure compréhension des mécanismes de la biodégradation du bois (Nicole and Benhamou 1991a, Nicole *et al.* 1992), du comportement de la paroi fongique durant l'infection (Nicole and Benhamou 1991b) et du rôle potentiel de certaines molécules dans la mise en place des réactions de l'arbre (Nicole and Benhamou 1991b). Cet article constitue une

synthèse des données acquises au cours de l'étude cytochimique des pourridés de l'Hévéa. Il concerne particulièrement (i) la dégradation de la cellulose (ii) la localisation de la chitine de la paroi de *R. lignosus* durant la colonisation du système racinaire et (iii) l'immunolocalisation d'une laccase fongique impliquée dans la biodégradation du bois.

MATERIEL ET METHODES

- **Infections artificielles des jeunes plants d'Hévéa:** Des plants d'Hévéa âgés de six mois environ ont été infectés par une souche de *R. lignosus* selon la méthode décrite par Nandris *et al.* (1983).

- **Purification de la laccase fongique:** La laccase L1 de *R. lignosus* a été produite *in vitro* et purifiée selon le protocole décrit par Geiger *et al.* (1986c). La pureté de l'enzyme a été vérifiée en électrophorèse sur gel d'acrylamide (Geiger *et al.* 1986c).

- **Observations ultrastructurales:** Des fragments de racines saines ou infectées artificiellement, prélevées à des temps variables, ont été préparés pour l'observation en microscopie électronique à transmission (MET) selon le protocole rapporté par Nicole *et al.* (1987). Les coupes ultrafines, contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb, ont été observées au microscope Jeol 1200X (Département de Phytologie, Université de Laval). Des blocs de bois stériles,ensemencés par *R. lignosus* (Geiger *et al.* 1986d) afin de localiser la production des laccases, ont été préparés comme précédemment décrit pour l'observation en MET.

- **Techniques cytochimiques**

- a. **Mise en évidence de la cellulose des parois des cellules hôtes:** Une exoglucanase conjuguée à l'or colloïdal se fixe spécifiquement sur les liaisons β -(1,4)-D glucanes des extrémités non réductrices de la cellulose (Berg 1988, Nicole and Benhamou 1991b). Cette sonde permet la localisation de ce polymère dans les racines d'Hévéa sains ou infectés.

- b. **Immunolocalisation d'une laccase de *R. lignosus*:** Des anticorps polyclonaux, réalisés contre la laccase L1 purifié de *R. lignosus*, ont été utilisés pour la mise en évidence des sites antigéniques de cette glyco-protéine dans le bois de bouleau infecté. Les conditions de marquage, fondées sur l'utilisation d'anticorps primaires partiellement purifiés et d'un anticorps secondaire conjugué à l'or colloïdal, permettent ainsi de localiser l'enzyme au cours de la biodégradation de cellules végétales lignifiées (Nicole *et al.* 1992).

- c. **Mise en évidence de la chitine des parois de *R. lignosus*:** Une lectine de blé (WGA) reconnaît spécifiquement les liaisons β -(1,4) glucosamine, monomère constitutif de la chitine. Le traitement de coupes par cette lectine, suivi de l'ovomucoïde-or, permet la visualisation de la chitine des parois fongiques selon une technique décrit par Nicole et Benhamou (1991b).

- d. **Contrôles de la spécificité des sondes moléculaires:** Afin de vérifier la spécificité des sondes utilisées dans le cadre de cette étude, plusieurs contrôles ont été mis en oeuvre parmi lesquels (Benhamou 1989, Berge 1988, Herman 1988): une pré-incubation des sondes avec

leur substrats respectifs avant leur utilisation dans le processus de marquage, le remplacement des sondes par une sonde différente ne présentant pas d'affinité pour la molécule recherchée, l'incubation des coupes dans l'or colloïdal seul.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'approche cytochimique de la dégradation de la cellulose a révélé que ce polymère est dégradée dans les tissus racinaires de l'Hévéa dès les premiers stades de la pénétration des hyphes dans la plante. Les parois des cellules de l'assise péridermique présentent des figures d'érosion particulièrement marquées aux sites de pénétration des hyphes. Dans le jeune liège, les parois se composent de deux couches distinctes, l'une subérifiée et l'autre cellulosique. Soumise à l'action du parasite, cette dernière montre sans ambiguïté une altération profonde associée à une modification ultrastructurale de sa texture. De telles perturbations pariétales interviennent également dans le phloème, bien que la présence des hyphes y ait rarement été observée (Nicole *et al.* 1982, Nicole *et al.* 1986b).

Les résultats les plus caractéristiques, résultant de l'étude cytochimique de la dégradation de la cellulose, ont été acquis après examen des tissus lignifiés endommagés. Le marquage à l'or révèle l'existence de zones totalement dépourvues de particules d'or expliquant (i) une dégradation partielle de la cellulose (destruction des extrémités non réductrices) ou (ii) une digestion complète de la cellulose laissant de ce fait apparaître d'autres composés pariétaux tels les hémicelluloses et/ou la lignine. Après analyse, il apparaît que la cellulose serait le premier polymère du bois à être dégradé par *R. lignosus*, facilitant ainsi l'accès à la lignine aux enzymes impliquées dans sa dégradation (i.e. laccases et Mn-peroxydase dépendante) (Geiger *et al.* 1986a, Geiger *et al.* 1986d). Les cellulases de *R. lignosus* (Geiger *et al.* 1986b, Geiger *et al.* 1986d, Nicole and Benhamou 1991a), très actives durant l'infection du système racinaire de l'Hévéa, se révéleraient donc être des enzymes essentielles à colonisation des tissus et la dégradation des parois ligno-cellulosiques.

Parmi les enzymes impliquées dans la dégradation du bois, les laccases jouent un rôle important dans les modifications de la lignine, comme rapporté par Geiger *et al.* (1986a) dans le cas d'une laccase de *R. lignosus*. Les techniques d'immuno-localisation, appliquées au bois infecté, ont précisé la distribution de cette enzyme durant les mécanismes de pourrissement (Nicole *et al.* 1992). Il apparaît ainsi que la laccase, cytoplasmique d'abord, est ensuite localisée dans l'espace périplasmique du champignon et dans sa paroi, avant d'être excrétée dans les cellules hôtes.

L'enzyme est localisée soit au contact, soit à une certaine distance du champignon. Elle semble cependant incapable de diffuser dans le bois apparemment sain, probablement en raison d'un environnement stérique défavorable à son transport, ou de l'inaccessibilité chimique de son substrat. Dans des parois en cours de dégradation, l'enzyme est distribuée dans tous les types pariétaux, indépendamment de leur constitution. En revanche, les parois montrant un stade avancé de pourrissement contiennent peu ou pas d'enzyme, suggérant l'absence, ou le masquage, de son substrat.

Enfin, il est fréquent de constater la localisation de molécules de laccase sur les microfibrilles des matrices fongiques extracellulaires. Cette observation soulève de fait la question du transport des enzymes extracellulaires du parasite vers leur substrat spécifique durant l'altération des composés parétaux de la plante.

Les modifications ultrastructurales du champignon au cours de la pathogénèse se traduisent non seulement par une désorganisation plus ou moins apparente du cytoplasme de certains hyphes mais aussi, et surtout, par une dégradation de leurs parois. Afin de mieux apprécier les perturbations que subit cette paroi durant la colonisation des tissus racinaires, une lectine de blé a été utilisée pour localiser spécifiquement la glucosamine acétylée, monomère constitutif de la chitine des parois des champignons.

Quelle que soit la nature des tissus infectés (cellulosique, subérifiée ou lignifiée), la pénétration des parois des cellules hôtes par les hyphes mycéliens induit une modification de la chitine fongique dans les portions de filaments localisées dans la paroi hôte. La chitine est soit dégradée soit modifiée, ou masquée, de telle manière à être inaccessible à la lectine. De tels changements dans la conformation de la paroi du champignon ne sont vraisemblablement pas étrangers à sa localisation intrapariétale où le parasite sécrète un grand nombre d'enzymes responsables de la dégradation des polymères végétaux.

Dans cette optique, *R. lignosus* disposerait d'un, ou plusieurs, mécanisme(s) lui permettant de moduler l'organisation de sa paroi en fonction de son environnement soit en modifiant la constitution de la chitine pariétale, soit en modifiant les proportions des composantes de sa paroi (chitine et glucanes). Par ailleurs, l'examen minutieux des coupes ultra-fines a révélé, dans le cytoplasme des cellules hôtes, de nombreuses particules d'or au voisinage des hyphes endommagés.

Ce marquage suggère fortement la présence d'oligomères de chitine dont l'origine est probablement attribuable à l'action hydrolytique d'endochitinases de l'Hévéa (Nicole and Benhamou 1991b, Nicole *et al.* 1992). Ces oligosaccharides, connus pour leur pouvoir éliciteur de certaines réactions de défense des plantes, induisent dans le système racinaire de l'Hévéa, des mécanismes de lignification réactionnelle ainsi que la stimulation du cambium subéro-phelloidermique et des dépôts de callose le long des parois du phloème (Nicole *et al.* 1991).

La démarche expérimentale rapportée dans cette article est fondée sur l'étude cytochimique ultrastructurale des pourritures racinaires de l'Hévéa causée par *R. lignosus*. Elle vérifie les hypothèses précédentes concernant la biodégradation des polymères des ligneux (Geiger *et al.* 1986a, Geiger *et al.* 1986b, Geiger *et al.* 1986d, Nicole *et al.* 1982, Nicole *et al.* 1986c, Nicole *et al.* 1987, Nicole *et al.* 1986b, Nicole *et al.* 1982) et précise, en outre, certains mécanismes de la pathogénèse de ces maladies (Geiger *et al.* 1989, Nicole *et al.* 1986a, Nicole *et al.* 1992, Nicole *et al.* 1991).

La cellulose est dégradée dès les premières étapes de la colonisation des tissus racinaires; dans le xylème, l'altération de ce polymère crée des voies d'accès à la lignine pour les oxydases du champignon. Parmi elles, la laccase s'avère présente au cours de la dégradation du bois, à l'exception des étapes initiale et ultime. Enfin, la paroi de *R. lignosus* subit deux

contraintes, l'une liée à l'excrétion active des enzymes impliquées dans le pourrissement des racines, l'autre liée à l'action des chitinases de l'arbre. Dans les deux cas, la chitine pariétale du parasite apparaît considérablement modifiée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bendayan M. (1984). Enzyme-gold electron microscopic cytochemistry: a new affinity approach for the ultrastructural localization of macromolecules. *Journal of Electron Microscope Techniques* 1: 349-372.
- Benhamou N. (1989). Preparation and applications of lectin-gold complexes. In: *Colloidal gold: principles, methods and applications*. Vol. 1. Ed. Hayat, Academic Press. pp. 95-143.
- Berg R.H. (1988). Enzyme-gold affinity labelling of cellulose. *Journal of Electron Microscope Techniques* 8: 371-379.
- Herman E.M. (1988). Immunocytochemical localization of macromolecules with the electron microscope. *Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology* 39: 139-155.
- McFadden G.I. (1991). *In situ* hybridization techniques: molecular cytology goes ultrastructural. In: *Electron microscopy of plant cells*. Hall and Hawes, Eds. Academic Press. pp. 219-255.
- Geiger J.P., Huguenin B., Nicole M. and Nandris D. (1986a). Laccases of *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*. II. Effects of *R. lignosus* laccase L1 on thioglycolic lignin of Hevea. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 13: 97-111.
- Geiger J.P., Nicole M., Nandris D. and Rio B. (1986b). Root rot diseases of *Hevea brasiliensis*. I. Physiological and biochemical aspects of root aggression. *European journal of Forest Pathology* 16: 22-36.
- Geiger J.P., Rio B., Nandris D. and Nicole M. (1986c). Laccases of *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*. I. Purification and some physico-chemical properties. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 12: 121-134.
- Geiger J.P., Rio B., Nicole M., and Nandris D. (1986d). Biodegradation of *Hevea brasiliensis* wood by *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*. *European Journal of Forest Pathology* 16: 147-159.
- Geiger J.P., Rio B., Nicole M. and Nandris D. (1989). Peroxidase production in tissues of the rubber tree following infection by root rot fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34: 241-256.
- Nandris D., Nicole M., et Geiger J.P. (1983). Infections artificielles de jeunes plants d'*Hevea brasiliensis* par *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius*. *European Journal of Forest Pathology* 13: 65-76.
- Nandris D., Nicole M., and Geiger J.P. (1987). Root rot diseases of rubber-tree. *Plant Disease* 71: 298-306.
- Nicole M. and Benhamou N. (1991a). Cytochemical aspects of cellulose breakdown during the infection process of rubber tree roots infected by *Rigidoporus lignosus*. *Phytopathology* 81: 1412-1420.
- Nicole M. and Benhamou N. (1991b). Ultrastructural localization of chitin in cell walls of *Rigidoporus lignosus*, the white root rot fungus of rubber trees. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39: 415-432.
- Nicole M., Chamberland H., Geiger J.P., Lecours N., Valero J., Rio B. and Ouellette G.B. (1992). Immunocytochemical localization of laccase L1 in wood decayed by *Rigidoporus lignosus*. *Applied and Environmental Microbiology* 58.
- Nicole M., Geiger J.P. et Nandris D. (1982). Aspects ultrastructuraux de la dégradation du phloème d'*Hevea brasiliensis* par *Rigidoporus lignosus*. *Compte-rendus de l'Académie des Sciences*, Paris, Série III, 471-476.
- Nicole M., Geiger J.P. and Nandris D. (1986a). Root rot diseases of *Hevea brasiliensis*. II. Some host reactions. *European Journal of Forest Pathology* 16: 37-55.
- Nicole M., Geiger J.P. and Nandris D. (1986b). Ultrastructure of laticifer modifications in *Hevea brasiliensis* infected with root rot fungi. *Journal of Phytopathology* 116: 259-268.

- Nicole M., Geiger J.P. and Nandris D. (1986c). Penetration and degradation of suberized cells of *Hevea brasiliensis* infected with root rot fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 28: 181-185.
- Nicole M., Geiger J.P. et Nandris D. (1987). Ultrastructural aspects of rubber tree root rot diseases. *European Journal of Forest Pathology* 17: 1-10.
- Nicole M., Nandris D. et Geiger J.P. (1982). Interactions hôte-parasites entre *Hevea brasiliensis* et les agents de la pourriture racinaire *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius*: étude physiopathologique comparée. *Phytopathologische Zeitschrift* 105: 311-326.
- Nicole M., Toppan A., Geiger J.P., Roby D., Rio B, and Nandris D. (1991). Defense responses of *Hevea brasiliensis* to elicitors from root rot fungi. *Canadian Journal of Botany* 69: 1819-1824.
- Nicole M., Geiger J.P. and Nandris D. (1992). Mechanisms of defense of angiosperm roots to fungal invasion. In: *Defense mechanisms of woody plants against fungi*. R.A. Blanchette and A.R. Biggs, Eds. Springer Verlag, New York, Heidelberg. pp. 181-206.

LA STEMPHYLIOSE DE *SOLANUM AETHIOPICUM* L. GR. KUMBA CAUSEE PAR *STEMPHYLIUM SOLANI* WEBER

Maymouna SY NDIR et Amadou Tidiane BA

Département de Biologie Végétale Faculté des Sciences et Techniques
Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal

Résumé: *Solanum aethiopicum* Linné gr. Kumba ou "Jaxatu" (en Ouoloff) est une solanacée largement cultivée et consommée en Afrique notamment au Sénégal. L'extension de sa culture est surtout limitée par diverses maladies en particulier par une stemphyliose affectant d'abord les feuilles et causée par un ascomycète *Stemphylium solani* Weber. La maladie se manifeste par des taches foliaires qui évoluent vite en nécroses et la feuille tombe après fanaison. Des inoculations expérimentales suivies d'une étude histologique ont permis de mieux comprendre certains aspects de la nature de l'interaction hôte-parasite. Les filaments mycéliens issus de la germination des spores pénètrent à l'intérieur de l'hôte surtout par les stomates mais ils peuvent parfois pénétrer entre les cellules épidermiques après avoir traversé la cuticule. Trente-six heures après inoculation, la pénétration de la hyphe mycélienne est suivie de la formation d'une hyphe globuleuse appelée hyphe primaire dans la cavité sous stomatique. Ce hyphe primaire en se ramifiant donne des hyphes secondaires entre les cellules autour du site d'infection entraînant une brunissement de cette zone. Dans les stades ultérieures de l'infection, après nécrose complète des zones affectées le mycélium réapparaît en surface pour émettre des spores. Les feuilles sont alors recouvertes de nombreuses taches limitées par une marge noire et entourées d'un halo chlorotique. Elles jaunissent et tombent. Cette perte de feuilles affecte en conséquence la qualité et la production des fruits. Des tests d'inoculation à partir d'extraits concentrés d'une culture du champignon en milieu liquide (stemtoxin) ont donné des symptômes identiques à ceux obtenus avec un inoculum à base de spores, ce qui suggère l'intervention d'une toxine dans l'activité pathogène du champignon sur son hôte.

Abstract: *Solanum aethiopicum* Linné gr. Kumba, or "Jaxatu" in woloff, is a solanaceae that is widely cultivated and consumed throughout Africa, especially in Senegal. Its cultivation is limited however, due to various diseases, particularly a stemphylium that affects the leaves first and is caused by an Ascomycete *Stemphylium solani* Weber. The disease is manifested by leaf spots which develop quickly into necroses, and the leaf falls off after wilting. Experimental inoculation followed by a histological study have enabled certain aspects of the host-parasite interaction to be understood. Mycelian filaments resulting from spore germination penetrate the inside of the host, especially by way of the stomata, but they sometimes penetrate between the cells of the epidermis after having traversed the cuticle. Thirty six hours after inoculation, the penetration of the mycelian hypha is followed by the formation of a globulous hypha, called the primary hypha, in the sub-stomatic cavity. This primary hypha branches out, producing secondary hyphae between the cells around the site of infection, causing the area to turn brown. In later stages of infection, after the complete necrosis of the affected areas, the mycelium reappears on the surface and emits spores. The leaves are then covered with numerous spots with a black border, surrounded by a chlorotic halo. They turn yellow and fall off. This loss of leaves consequently affects fruit quality and production. Inoculation tests with concentrated extracts of a fungus culture in a liquid medium (stemtoxin) resulted in symptoms identical to those obtained with a spore-based inoculum, which implies the effect of a toxin in the pathogenic activity of the fungus on its host.

Solanum aethiopicum Linné, groupe Kumba ou "Jaxatu" (en Ouoloff) est une solanacée originaire du Brésil mais largement cultivée et consommée comme légume en Afrique, notamment au Sénégal. L'extension de sa culture et l'intensification de la production sont limitées par diverses maladies en particulier une Stemphyliose causée par un ascomycète *Stemphylium solani* Weber (Weber 1930).

Les travaux sur cette solanacée tropicale sont relativement limités et peu de chercheurs continuent encore à essayer de trouver les moyens pour éradiquer les facteurs limitants que constituent ces maladies. Dans cette perspective deux aspects constituent des données de base qu'il est utile de connaître avant de pouvoir envisager une ou des méthodes de lutte rationnelle; il s'agit de la biologie du champignon et des interactions hôte-parasite. La présente étude porte sur les interactions hôte-parasite dans le cas de la variété sensible "soxna" (sélectionnée par le CDH) et de *Stemphyllium solani*.

Les aspects de l'interaction hôte-parasite abordés dans cette étude concernent: la pénétration foliaire, l'évolution du champignon dans l'hôte et les conséquences morphologiques et physiologiques induites par le champignon dans le végétal.

MATERIEL ET METHODES

L'hôte

Solanum aethiopicum gr. Kumba est une solanacée de type aubergine locale cultivée au Sénégal d'où son nom d'aubergine amère. C'est une plante herbacée à port érigé de taille variant entre 40 et 50 cm suivant la variété et les conditions de culture. Les feuilles larges et sinuées sont plus ou moins anthocyanées, les tiges peuvent l'être également. Les fruits sont des baies pluriloculées vertes au début et rouges à maturité.

Le parasite

Stemphylium solani Weber est un champignon imparfait Ascomycète hypomycète. Il a été décrit pour la première fois par Weber en 1930 sur la tomate. Il a été fréquemment isolé à partir des solanacées des pays chauds et des légumineuses (Weber 1930, Graham 1960). Il a été décrit sous sa forme conidienne ou imparfaite, la forme parfaite ou *Pleospora* n'a pas été signalée (Simmons 1969, 1986, 1989).

Préparation de l'hôte pour les inoculations

Pour les tests *in situ* des plants de deux mois ont été utilisés. Pour les tests *in vitro* les feuilles de ces plants sont détachées et placées dans des boîtes de Pétri sur fond de papier filtre humide.

Préparation de l'inoculum

A partir des nécroses foliaires prélevées en champ, les techniques de micromanipulation ont permis d'obtenir un isolat monospore. Cet isolat est cultivé en boîte de Pétri sur milieu V₈ agar à pH₇. Les cultures sont incubées à 25°C sous lumière intermittente. Une suspension de spores dans de l'eau distillée stérile est préparée à partir des cultures de 10 jours, elle est filtrée à travers quatre épaisseurs de compresses et titrée 5.10⁴ spores/ml.

TECHNIQUE D'INOCULATION ET PREPARATION DES TISSUS DE L'HOTE POUR LA MICROSCOPIE

Inoculation

Aussi bien pour les plantes entières que pour les feuilles détachées, l'inoculation se fait par pulvérisation de la surface des feuilles avec la suspension de spores. Un film plastique permet de créer l'humidité nécessaire à la germination des spores (Laterrot 1983, Borges 1975). Le matériel inoculé est incubé à 25°C sous photopériode 12h/12h. Des prélèvements sont effectués à 12h - 24h - 36h - 48h - 72h, quatre jours et cinq jours après inoculation et préparés en vue des observations microscopiques.

Microscopie photonique

Pour la microscopie photonique, les feuilles sont fixées dans un mélange alcool absolu-acide acétique, éclaircies au lactophénol, colorées au bleu coton-lactophénol, décolorées à l'acide lactique et montées au lactophénol (Pierre and Millar 1965).

Préparation du filtrat de culture de Stemphylium sur le milieu "stemtoxin"

Le milieu stemtoxin (annex 1, Barash 1975) version DK Heiny, 1989 est réparti dans les erlenmeyers à fond large à raison de 400 ml par flacon, stérilisé à 120°C pendant 20 minutes puisensemencés stérilement avec 1 ml de suspension de spores titrée 5.10⁵ spores/ml. Les cultures sont incubées à 25°C sous lumière intermittente 12h - 12h pendant 21 jours, filtrées à travers plusieurs épaisseurs de compresses puis sur papier filtre Whatman no. 1. Le filtrat est concentrée 15 fois à l'évaporateur rotatif à 45°-50°C. Un témoin est réalisé avec un milieu nonensemencé traité comme précédemment (Borges 1976).

Inoculation de l'hôte avec le filtrat

Elle est faite sur des feuilles détachées placées dans des boîtes de Pétri sur fond de papier filtre humide. Avec une fine aiguille quelques piqûres sont faites à la surface de la feuille avant le dépôt d'une gouttelette de filtrat. Les boîtes sont recouvertes pour éviter l'évaporation (Borges 1976).

LEGENDE DE LA PLANCHE 1

Figure 1. Des spores de l'inoculum ont donné des structures comparables aux conidiophores qui émettent des spores à leur tour (x 200).

Figure 2. Une conidie a émis trois tubes de germination, l'une d'elle en direction d'un stomate (x 450).

Figure 3. Un tube de germination pénètre par un stomate (x 300).

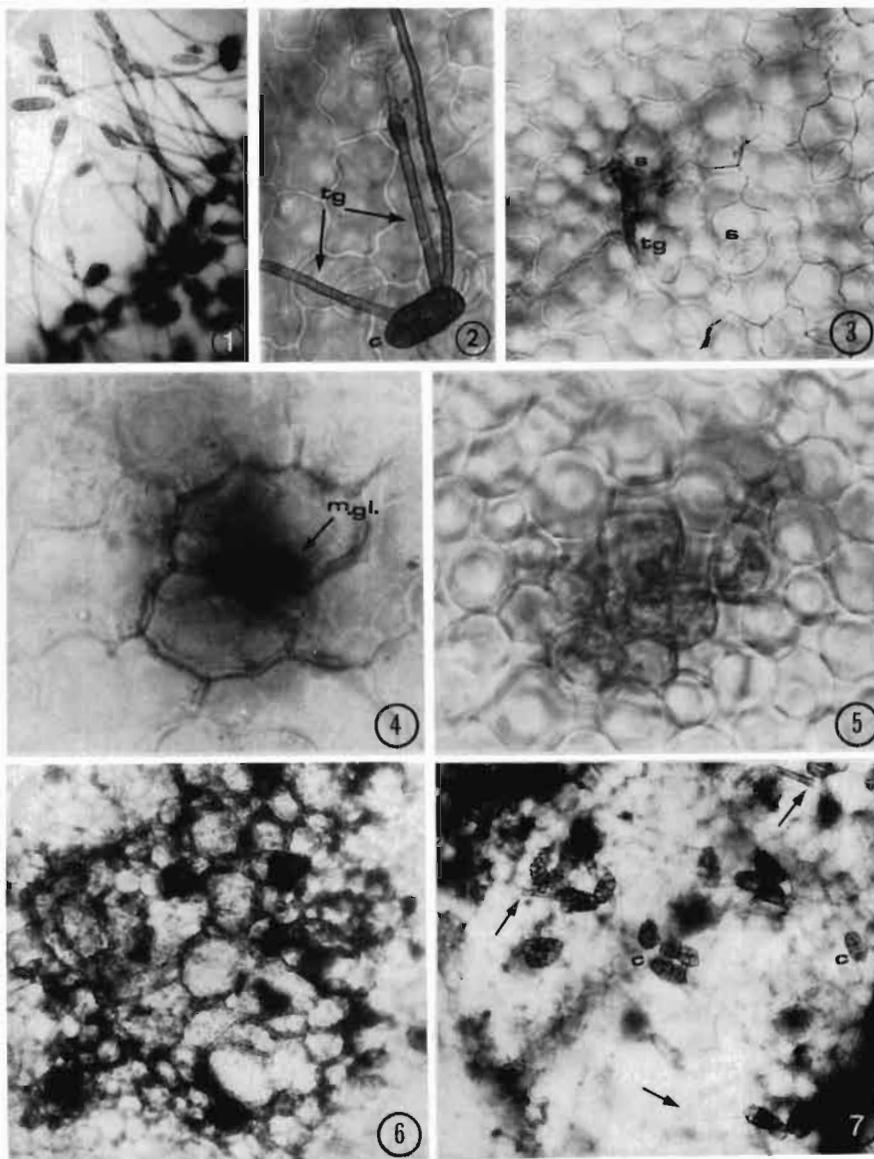
Figure 4. Hyphe primaire globuleuse dans la cavité sous stomatique (x 660).

Figure 5. Hyphe secondaire ramifiée entre quelques cellules (x 600).

Figure 6. Brunissement intercellulaire et cellulaire (x 300).

Figure 7. Filaments mycéliens (Flèches) réapparus en surface et ayant sporulé (x 300).

C. = Conidie; m.gl. = Mycélicum globuleux; S. = Stomate; T.g. = Tube de germination



RESULTATS

Inoculation avec une suspension de spores

Germination des spores: A partir de 12 heures, les spores ou conidies commencent à germer émettant des tubes à partir d'une ou plusieurs cellules d'une conidie (Fig. 2, pl. 1). Vingt-quatre heures après l'inoculation, 95% des conidies ont déjà germé, les tubes de germination sont rectilignes au départ puis se ramifient et parcourent l'épiderme en suivant les contours des cellules. Très souvent, les conidies donnent *in vivo* des structures comparables aux conidiophores et produisent rapidement des spores, comme cela a été observée dans le cas *Stemphylium botryosum* sur la luzerne (Pierre 1965) (Fig. 1 pl 1)

La pénétration: Elle est effective en 24 heures et se fait essentiellement par les stomates (Fig. 3, pl. 1) mais quelques rares fois entre les cellules épidermiques.

Développement du parasite dans l'hôte: Après un traitement approprié et coloration au bleu coton les filaments mycéliens du champignon sont visibles dans les tissus de l'hôte. Le tube de germination ou mycélium une fois dans le stomate s'élargit et donne une hyphe globuleuse appelée hyphe ou mycélium primaire, il remplit la cavité sous stomatique environ 36 heures après inoculation (Fig. 4, pl. 1). Quarante-huit heures après l'inoculation une deuxième hyphe dite hyphe ou mycélium secondaire se développe à partir du mycélium ou hyphe primaire en se ramifiant dans toutes les directions entre les cellules du parenchyme palissadique de la feuille comme pour atteindre le maximum de surface (Fig. 5, pl. 1). Il se produit un brunissement intercellulaire puis cellulaire (Fig. 6, pl. 1) 96 heures après inoculation. A ce stade de l'infection, après nécrose complète des zones affectées, des hyphes émergent à nouveau à la surface foliaire et sporulent (Fig. 7, pl. 1).

Développement des symptômes: Les symptômes deviennent macroscopiquement évidents sur les feuilles à partir de 96 heures sous forme de petites taches vert-pâle. Une zone nécrotique brun foncé se développe au centre de ces taches. Les petites taches confluent et un halo chlorotique entoure les taches. Les feuilles couvertes de nécroses jaunissent et tombent. La floraison de la plante ainsi effeuillée est complètement perturbée par rapport à des témoins. Lorsque l'infection survient à la période de la floraison-fructification, les bourgeons n'évoluent pas, les fruits déjà formés se rabougrissent et tombent souvent avant d'avoir atteint leur taille normale.

Inoculation avec le filtrat de culture

Le brunissement des cellules au voisinage immédiate du point de pénétration et la chlorose autour des nécroses indiquent que *Stemphylium solani* produit des substances toxiques qui agissent à distance. C'est ainsi que nous envisageons de rechercher ces substances toxiques en culture sur milieu liquide. La même remarque a été faite par Clerivet (1990) dans le couple *Stemphylium floridanum* - *Solanum gilo*. L'application du filtrat de culture de *Stemphylium solani* sur les feuilles de "Soxna" produit des symptômes identiques à ceux observés en champ et sur les feuilles inoculées avec un inoculum à base de spores. Vingt-quatre heures, 72 h et 96 h après l'inoculation par le filtrat de culture de *Stemphylium solani* les symptômes sont les mêmes que par infestation directe.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La stemphylllose du "Jaxatu" paraît très répandue au Sénégal et continue de constituer un facteur limitant de la production de cette plante maraîchère. La lutte contre la maladie est contrariée par le fait que les conditions optimales pour la culture du "Jaxatu" (température et humidité relative élevées) sont les mêmes pour le développement du champignon. Il sera donc important de bien connaître la biologie du champignon pour agir sur les portions les plus sensibles de son cycle. Par ailleurs, les réactions de l'hôte c'est à dire finalement les interactions avec le champignon devraient être mieux connues pour en renforcer les aspects qui améliorent sa résistance.

Cette contribution a permis: d'identifier les voies de pénétration du champignon dans son hôte (stomate et épiderme), de suivre le développement du pathogène pendant les premiers stades de l'infestation (jusqu'à 96 heures) et de démontrer l'intervention de toxines dans l'actions du pathogène. Ces aspects devront être pris en compte dans toute stratégie de lutte contre cette mycose car en effet toutes les variétés de "Jaxatu" que nous avons jusque là testé se sont révélées sensibles. A côté, il devrait aussi être envisagé une amélioration génétique du "Jaxatu" par hybridation avec l'aubergine douce *Solanum melongena* qui elle est résistante à *Stemphylium solani*. Nos travaux sont orientés maintenant dans cette direction.

ANNEXE

Stemtoxin (Version D.K. Heiny)

Sucrose:	26,14 g/litre
Ca (NO ₃) ₂ ·4H ₂ O:	3,138 g/litre
KNO ₃ :	0,419 g/litre

	Solution mère	Volume à ajouter au milieu
KCl	0,06487 g/ml	1 ml/litre
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,29580 g/ml	2,5 ml/litre
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,01932 g/ml	1 ml/litre
Na ₂ SO ₄	0,19890 g/ml	1 ml/litre
S _c Cl ₃ 6H ₂ O	0,00200 g/ml	1 ml/litre
Mn SO ₄ H ₂ O	0,00507 g/ml	1 ml/litre
Zn SO ₄ 7H ₂ O	0,00250 g/ml	1 ml/litre
H ₃ BO ₃	0,00136 g/ml	1 ml/litre
KI	0,00700 g/ml	1 ml/litre
Thiamine	0,00500 g/ml	1 ml/litre
Pyridoxine	0,00500 g/ml	1 ml/litre
d-Biotin (vit H)	0,00500 g/ml	10 ml/litre

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Barash I., Karr A.L. and Strobel G.A. (1975). Isolation and characterization of *Stemphylium*, a chromome glucoside from *Stemphylium botryosum*. *Plant Physiology* 55. pp. 646-651.
- Borges O.L., Stanford E.H. and Webster R.H. (1975). The host-pathogen interaction of Alfalfa and *Stemphylium botryosum*. *Cytology and histology*. Vol. 66. pp. 749-753.
- Clerivet A. (1990). Interaction hôte-parasite (*Stemphylium Floridanum*, Hannon et Weber - *Solanum Gilo Raddli*). Aspects symptomatologiques ultrastructuraux et biochimiques. Thèse de Doctorat - Spécialité: Physiologie et biologie des organismes et des populations - Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc.
- Cowling W.A. and Gilchrist D.G. (1982). Expression of pathogen virulence and host resistance during infection of Alfalfa with *Stemphylium botryosum*. *Cytology and histology*. Vol. 72(1): 36-42.
- Falloon P.G. and Grogan R.G. (1987). Etiology and Epidemiology of *Stemphylium* leaf spot and Purple spot of Asparagus in California. *Etiology*. Vol. 77(3): 407-413.
- Graham J.H. and Zeiders K.E. (1960). Pathogenicity and morphology of some leguminous and related species of *Stemphylium*. *Phytopath.* Vol. 50. pp. 757-760.
- Heiny D.K. and Gilchrist D.G. (1989). Isolation and partial characterization of polypeptides associated with phytotoxin in culture of the cool temperature biotope of *Stemphylium botryosum* pathogenic on Alfalfa. *Physiological and Molecular. Plant Pathology* 34. pp. 483-505.
- Heiny D.K. and Gilchrist D.G. (1989). Enzyme-linked immunosorbent assay immunoblot detection and antibody neutralization of *Stemphylium botryosum* phytotoxin. *Physiological and Molecular. Plant Pathology* 35. pp. 430-451.
- Laterrot H. et Blancard D. (1983). Criblage d'une série de lignées et d'hybrides F₁ de tomate pour la résistance à la stemphyliose. *Phytopath. medit.* 22. pp. 188-193.
- Pierre R.E. and Millar R.L. (1965). Histology of pathogen - suscept relationship of *Stemphylium botryosum* and Alfalfa. *Phytopathology* vol. 55. pp. 909-914.
- Simmons E.G. (1969). Perfect states of *Stemphylium*. *Mycologia* 61. pp. 1-26.
- Simmons E.G. (1986). Perfect states of *Stemphylium* II. *Sydowia* 38: pp. 284-293.
- Simmons E.G. (1989). Perfect states of *Stemphylium* III. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 49. pp. 305-307.
- Weber G.F. (1930). Gray leaf spot of tomato caused by *Stemphylium solani* sp. nov. *Phytopathology* Vol. 20 pp. 513-518.

ETUDE STRUCTURALE DES SITES DE NODULATION ET INDUCTION DES NODULES CAULINAIRES CHEZ *SESBANIA PUBESCENS*

K. TOMEKPE*, A.S. TRAORE*, S. NDIAYE*,
M.M. SPENCER BARRETO** et C. DETREZ*

*Laboratoire de Microbiologie des Sols ORSTOM B.P. 1386 Dakar Sénégal

**Université Cheikh Anta Diop - Faculté des Sciences
Département de Biologie Végétale Dakar Sénégal

Résumé: *Sesbania pubescens* est une légumineuse annuelle voisine de *Sesbania rostrata* qui se rencontre généralement sur les sols temporairement inondés de l'Afrique de l'Ouest. Des sites de nodulation préformés ont été mis en évidence sur sa tige et ses branches. Ces sites prennent naissance à l'aisselle des cotylédons et des feuilles. Comme chez la plupart des légumineuses à nodules de tige, les sites de nodulation caulinaire de *S. pubescens* se développent en racines lorsque les tiges sont immergées dans l'eau. L'étude anatomique des sites de nodulation caulinaire de *S. pubescens* a montré qu'ils sont constitués d'une ébauche racinaire qui émerge des cellules corticales. Contrairement à l'espèce *S. rostrata* dont le site comporte une ébauche racinaire qui perce l'épiderme de la tige, l'ébauche racinaire du site de *S. pubescens* est protégée par une assise de cellules épidermiques. Comme chez *Neptunia oleracea*, l'infection expérimentale a montré que l'immersion des tiges est une condition préalable à l'induction des nodules caulinaires chez *S. pubescens*; ces nodules se forment tout au long des tiges à l'aisselle des racines adventives dont la croissance a été stimulée par l'immersion des sites.

Abstract: *Sesbania pubescens* is an annual legume related to *Sesbania rostrata*. It is often found in the temporarily flooded soils of West Africa. Preformed nodulation sites and caulinary nodules were observed on the stem and branches. These sites, far fewer in number than on *S. rostrata*, are generally distributed along the stem, especially at the leaf axils. As in most stem-nodulating legumes, the nodulation sites are composed of root primordia which develop as roots when the stems are immersed. Experimental infections have demonstrated that submerging the stem in water is a precondition to the induction of caulinary nodules in *S. pubescens*, like in *Neptunia oleracea*, but the latter only forms nodules at the node while *S. pubescens* can form nodules all along the stem. The experimental infection also showed that the caulinary nodules in *S. pubescens* were only formed at the base of the adventitious roots that developed from the primordia roots. A study of the structure of latent root primordia and the various stages in the development of the caulinary nodule in *S. pubescens* is also presented.

Une des caractéristiques communes des légumineuses à nodules de tige est la présence de sites de nodulation prédéterminés sur leur tige. Ces sites qui sont constitués d'un primordium de racine adventive évoluent en racine lorsque les tiges sont immergées et se développent en nodules fixateurs d'azote lorsqu'ils sont infectés par des *Rhizobium* spécifiques.

Suivant le niveau de développement de ces sites, on distingue trois types de légumineuses à nodules caulinaires (Alazard and Duhoux 1988, Dreyfus *et al.* 1984): le type *Sesbania rostrata* ou *Aeschynomene afraspera* avec un site constitué d'une ébauche racinaire qui perce l'épiderme de la tige, *Aeschynomene elaphroxylon* ou *Neptunia oleracea* avec une ébauche racinaire enfoncée dans les tissus corticaux de la tige, un type intermédiaire entre les deux

premiers où l'ébauche racinaire est recouverte par une à quelques assises de cellules épidermiques. Chez les plantes du type *Sesbania rostrata*, l'infection des sites par des *Rhizobium* se fait facilement par les sillons occasionnés pendant la percée de l'épiderme par l'ébauche racinaire. Dans les autres cas, l'infection n'est spontanée; elle nécessite une immersion préalable des tiges dans l'eau.

Alors que le genre *Aeschynomene* comprend de nombreuses espèces à nodules de tige, *Sesbania rostrata* et *Neptunia oleracea* sont les seuls représentants connus de leur genre, capables de former des nodules caulinaires. Cependant nous avons récemment découvert dans le genre *Sesbania*, qu'une autre espèce, en l'occurrence *Sesbania pubescens* est également capable de former des nodules caulinaires. Il s'agit d'une espèce annuelle voisine de *Sesbania rostrata*. Comme cette dernière, elle pousse spontanément dans les sols temporairement inondés de l'Afrique de l'Ouest.

Contrairement à *S. rostrata* dont la croissance est très rapide et qui peut atteindre une hauteur de 2,5 à 3 mètres en deux mois, *S. pubescens* produit de nombreuses ramifications dès la base de la tige et atteint 1,5 à 2 mètres dans les meilleures conditions de culture. L'objet de cet article est l'étude de la structure des sites de nodulation caulinaire et de leur développement en racines adventives et en nodules fixateurs d'azote.

Localisation des sites de nodulation

Les premiers sites sont précoces et apparaissent à la base des cotylédons. Ils se prolongent ensuite du bas vers le haut en suivant deux génératrices parallèles à l'axe vertical de la tige; ces génératrices s'arrêtent juste au dessous de la première feuille. Les génératrices suivantes naissent à l'aisselle des feuilles et s'interrompent lorsqu'elles atteignent la feuille suivante. La répartition des sites sur la tige est, de ce fait, alterne comme celle des feuilles. A l'opposé, les sites de *Sesbania rostrata* sont disposés suivant trois à quatre génératrices qui partent des cotylédons et se prolongent jusqu'à l'extrémité apicale de la plante.

Structure des sites non infectés

Le site de nodulation est constitué d'un dôme épidermique plus ou moins proéminent suivant sa localisation, les sites les plus âgés, c'est à dire ceux situés à l'aisselle des cotylédons, et des feuilles étant les plus proéminents. La coupe longitudinale du site mature présente au microscope photonique, une ébauche racinaire qui émerge de la zone corticale (Fig. 1). L'apex de cette ébauche est constitué d'une coiffe et d'un méristème racinaire protégé par une assise de cellules épidermiques.

A l'opposé, l'ébauche racinaire du site mature de la tige de *Sesbania rostrata* perce le dôme épidermique en provoquant une déchirure de l'épiderme; il se trouve ainsi exposé aux facteurs externes en l'occurrence les *Azorhizobium* (Tsien and Dreyfus 1981, Duhoux et Dreyfus 1982). La partie basale de l'ébauche racinaire est constituée d'un cylindre central qui se raccorde à la vascularisation de la tige.

Figure 1. (a) Vue générale: morphologie de la tige et des mamelons caulinaires de l'aisselle des feuilles cotylédonnaires sur une jeune plante de *S. pubescens* (25 jours) de culture hydroponique (vue grossie 5 fois). (b) Observation en Microscopie Photonique (MPh) après fixation au Navashine et coloration au Bleu de toluidine d'une coupe longitudinale de mamelon caulinaire de l'aisselle des cotylédons. Barre: _____ 12.5 μm . (c) CL de mamelon caulinaire type de *S. rostrata*.

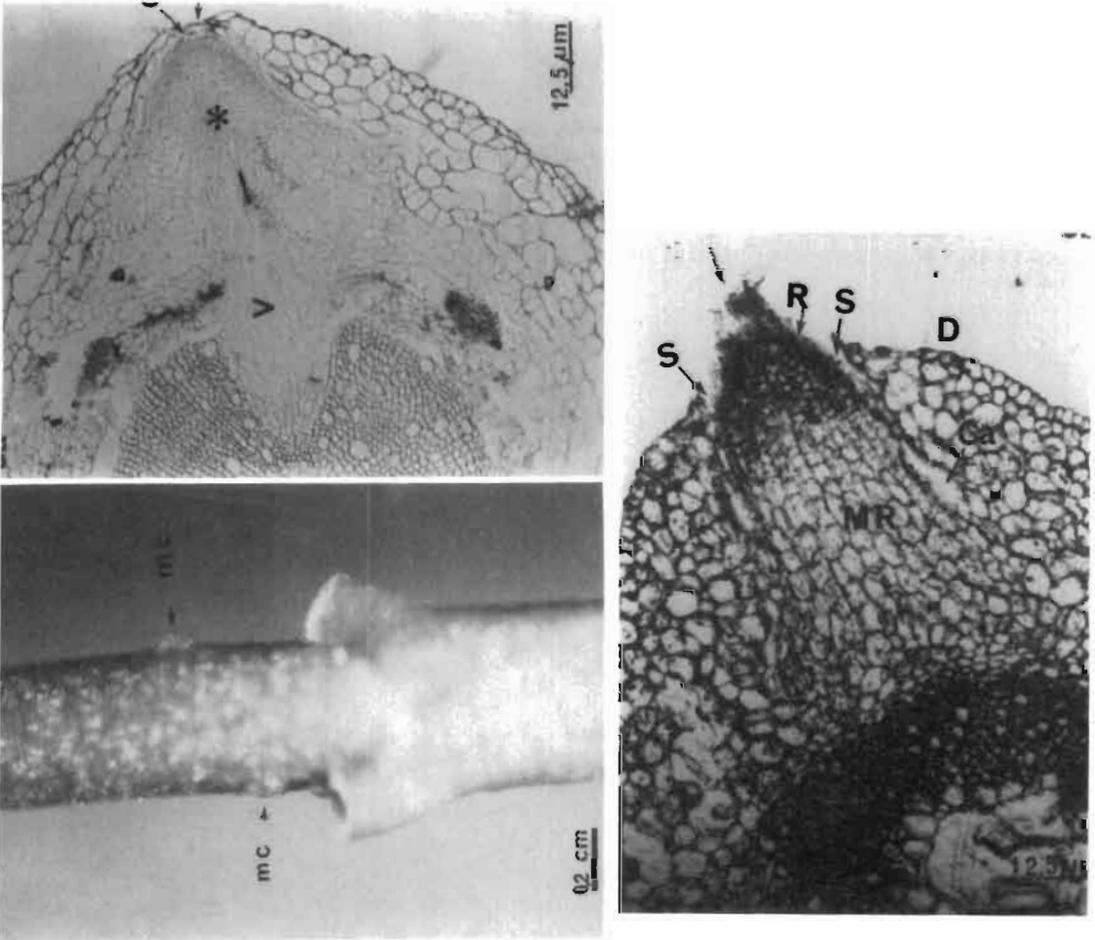
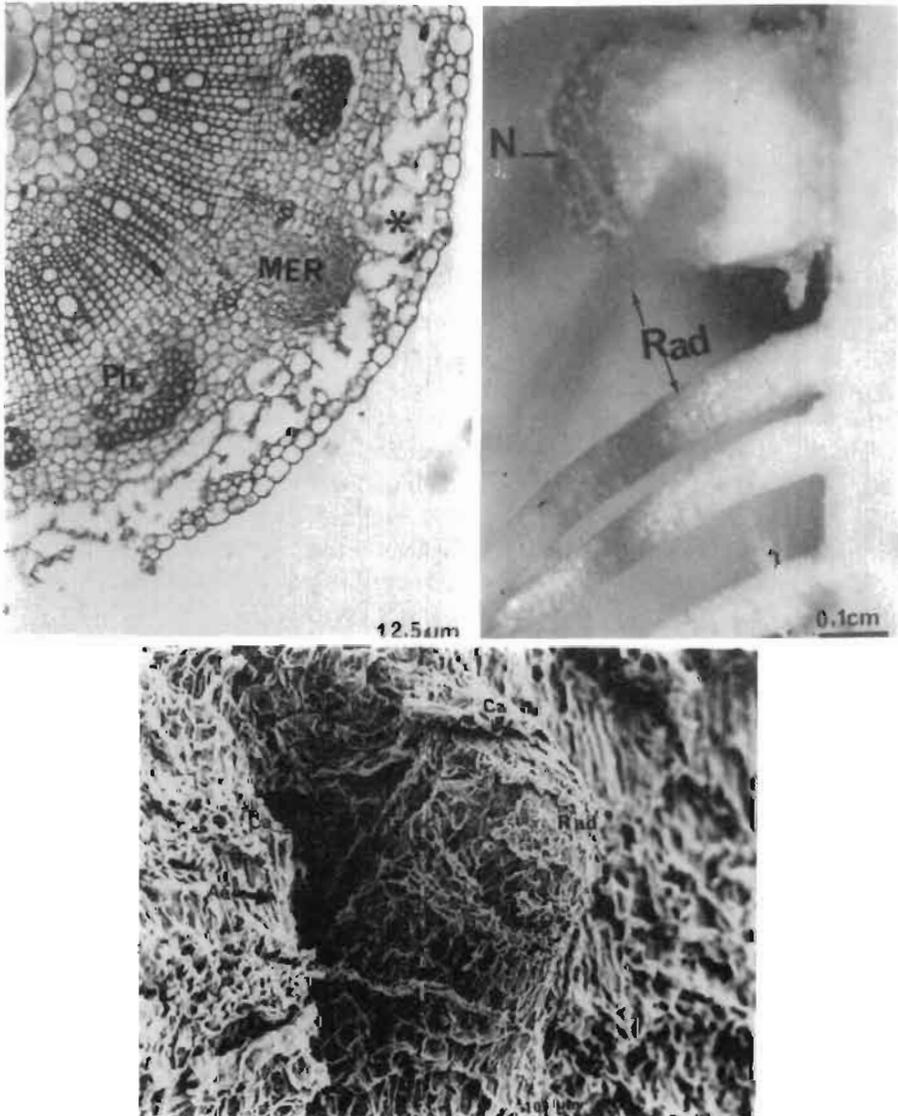


Figure 2. (a) La coupe (du niveau 3 ci-contre) révèle la structure du méristème de l'ébauche racinaire en cours d'évolution (MER). Ph l phloème (tissu de la tige). Aérenchyme (Aé;*), se forme sous les assises de cellules corticales et de l'épiderme; la flèche indique une brèche ouverte dans l'épiderme de la tige. (b) Nodule mature de 19 jours chez *S. pubescens*. (c) Observations de relief des modifications anatomiques induites par l'eau (24 heures) sur le mamelon caulinaire type de *S. pubescens*. Au centre est visible l'extrusion de la racine; de part et d'autre, la brèche ouverte dans l'épiderme de la tige (petite flèche; la grande flèche indique la cavité annulaire).



Evolution du site de nodulation caulinaire non infecté

Lorsqu'on immerge un segment caulinaire d'une plante de *S. pubescens*, la plupart des primordia racinaires ou sites de nodulation donnent naissance à une racine adventive qui se ramifie. Les premières racines adventives apparaissent dès 24 heures après l'immersion. Leur croissance, relativement lente pendant les premiers jours d'immersion s'accélère après une semaine, la longueur des racines atteignant quelques fois 10 cm au bout de deux semaines. La vitesse d'émission de ces racines est plus grande à l'aisselle des cotylédons et des feuilles et diminue au fur et à mesure qu'on s'en éloigne.

L'apparition des racines adventives s'accompagne généralement d'une rupture de l'épiderme au niveau du primordium racinaire. Cette rupture se prolonge le long des génératrices et favorise le développement de l'aérenchyme. Tissu spongieux d'aspect blanchâtre, l'aérenchyme est constitué de cellules turgescentes issues du tissu cortical (Metcalfé 1931). Les nombreux chercheurs qui ont décrit ce phénomène, pensent que la fonction de l'aérenchyme est de fournir l'oxygène pour la respiration des tissus en immersion. On peut raisonnablement ajouter à cette fonction celle du transport de l'azote atmosphérique jusqu'au nodules formés sur les racines et les tiges en immersion.

Infection du site de nodulation et formation des nodules

Lorsqu'on inocule avec un *Rhizobium* spécifique un segment caulinaire immergé, on induit un méristème nodulaire qui s'accroît progressivement pour donner un jeune nodule plus ou moins sphérique au bout de 10 jours à deux semaines. Ces jeunes nodules sont enfouis sous l'aérenchyme et n'émergent nettement de ce tissu qu'à partir de la troisième semaine. A ce stade, ils sont verdâtres et leur diamètre varie de 2 à 3 mm. Au bout de trois à quatre semaines après l'inoculation, les nodules atteignent un diamètre de 4-5 mm (Fig. 2). A ce stade, ils se présentent comme de gros renflements ovoïdes à l'aisselle de longues racines adventives ramifiées qui portent de nombreux petits nodules.

La coupe longitudinale d'un site infecté depuis quatre ou cinq jours montre que le méristème nodulaire se différencie à la base de l'ébauche racinaire, dans le cortex interne. La coupe transversale du jeune nodule montre une organisation interne constitué d'un tissu central composé de nombreuses cellules méristématiques. Ce tissu est entouré d'un parenchyme cortical chlorophyllien recouvert à la périphérie par un périoderme. Dans le nodule mature, le tissu central est envahi par les bactéroïdes. Le nombre de nodules caulinaires varie avec les souches de *Rhizobium* et la date d'inoculation. Il est plus élevé lorsque l'inoculation est effectuée pendant les trois premiers jours d'immersion des tiges. Tous les sites de nodulation n'évoluent pas en nodules; en moyenne, 60 à 70% des sites donnent naissance à des nodules après environ un mois d'immersion.

CONCLUSION

L'étude de la structure du site de nodulation caulinaire de *S. pubescens* a permis de montrer que son ébauche racinaire est protégé par une assise de cellules épidermiques et se trouve

ainsi inaccessible aux *Rhizobium*. De ce fait, l'immersion des tiges entraînant la rupture de l'épiderme est nécessaire pour obtenir l'infection par les *Rhizobium*. Nous pouvons néanmoins considérer qu'il existe maintenant dans le genre *Sesbania*, deux espèces à nodules caulinaires correspondant à deux types de sites: le type *rostrata* avec un site bien développé dont l'ébauche racinaire perce l'épiderme de la tige, et le type *pubescens* dont le site, moins développé, possède une ébauche racinaire recouverte par une assise de cellules épidermiques.

Chez *S. rostrata*, on peut induire le méristème nodulaire seul alors que chez *S. pubescens*, cette induction doit être absolument précédée par l'activation du méristème radiculaire. Le potentiel de nodulation de *S. pubescens* en conditions d'immersion est considérable, dans la mesure où cette plante est également capable de former des nodules fixateurs d'azote sur les racines adventives et leurs nombreuses ramifications. De ce fait, *S. pubescens* constitue comme *S. rostrata*, un candidat potentiel de choix pour son utilisation comme engrais vert en riziculture irriguée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alazard D. and Duhoux E. (1988). Diversity of stem nodulation sites in *Aeschynomene* spp. *J. Plant Physiol.* Vol. 132. pp. 123-125.
- Dreyfus B.L., Alazard D. and Dommergues Y.D. (1984). In: *Current perspectives in microbial ecology*. American Society for Microbiology, Washington D.C. pp. 161-169.
- Duhoux E. et Dreyfus G.L. (1982). Nature des sites d'infection par le *Rhizobium* de la tige de la légumineuse, *Sesbania rostrata* Brem. *C.R. Acad. Sci. Paris* 294: 407-411.
- Metcalf C.R. (1931). The "aerencyhma" of *Sesbania* and *Neptunia*. *Kew Bulletin of Miscellaneous Information. 1931.* pp. 151-154.
- Tsien H.C., Dreyfus B.L. and Schmidt E.L. (1983). Initial stages in the morphogenesis of the nitrogen-fixing stem nodules of *Sesbania rostrata*. *J. Bacteriol.* 156: 888-897.

LES PEROXYDASES DU PALMIER DATTIER ET LEUR ROLE POSSIBLE DANS LA RESISTANCE A LA MALADIE DU BAYOUD

Mohammed BAAZIZ

Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire des Plantes
Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, B.P. S 15 Marrakech, Maroc

Résumé: Les peroxydases (EC 1.11.1.7), oxydo-réductases utilisant le peroxyde d'hydrogène dans l'oxydation des phénols, sont très représentées chez le palmier dattier, *Phoenix dactylifera* L. Le taux de leur activité enzymatique, ainsi que leurs propriétés physico-chimiques varient en fonction des cultivars de cette espèce. L'aspect qualitatif, étudié par électrophorèse sur gel de polyacrylamide suivie d'une révélation *in situ*, montre l'abondance d'isoformes acides. Les isoperoxydases basiques sont moins représentées chez les cultivars adultes, comparativement aux jeunes plants issus de graines. Les peroxydases du palmier dattier peuvent être présentes sous formes solubles et liée aux parois, de façon ionique ou covalente. Cette dernière forme est négligeable chez les cultivars adultes. La coexistence d'une activité polyphénoloxydase associée aux peroxydases fait augmenter le pouvoir oxydatif de ces enzymes au niveau du palmier dattier. Les cultivars de palmier dattier très sensibles à la fusariose vasculaire à *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Bayoud) sont, d'origine, d'un taux peroxydasique faible, par rapport aux cultivars résistants. Cette situation est vérifiée chez les plantes issues de graines où, en plus, la réponse à l'infection se traduit par l'augmentation des activités peroxydasiques et polyphénoloxydasiques. De ce fait, le mécanisme de résistance du palmier dattier à la maladie du Bayoud semble impliquer l'activation de la lignification et la production de quinones toxiques pour le champignon.

Abstract: Peroxidases (EC.1.11.1.7), oxido-reductases that involve hydrogen peroxide in the oxidation of phenols are widely represented in the date palm tree, *Phoenix dactylifera* L. Their enzymatic activity and their physico-chemical properties vary according to species cultivars. Quality parameters are studied by electrophoresis on polyacrylamide gel, and then developed *in situ*. There is an abundance of acid isoforms. Basic isoperoxidases are less common in adult cultivars than in young seedborn plants. The peroxidases in date palms can be found in soluble form, attached to the plant walls, or in ionic or covalent form. The covalent form is negligible in adult cultivars. Coexistence of polyphenoloxidase activities and peroxidases increases the oxidative capacity of the enzymes in date palms. Date palm cultivars that are highly sensitive to vascular fusariosis (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* [Bayoud]) at the offset have a peroxidasic rate that is low in comparison with the resistant cultivars. This has been confirmed in seedborn plants, whose response to infection, moreover, is an increase in peroxidasic and polyphenoloxidasic activity. For this reason, to resist the Bayoud diseases, the date palm apparently requires active lignification and production of quinones that are toxic for the fungus.

Le palmier dattier, (*Phoenix dactylifera* L.) est une espèce végétale pérenne de grande importance dans l'économie de plusieurs pays de la zone sèche. L'avenir de la production dattière du Maghreb et l'existence même des palmeraies, dépend de la résolution du problème capital constitué par la fusariose vasculaire à *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, appelée "Bayoud" (Pereau-Leroy 1958, Saaidi 1979). L'agent causal du Bayoud est un champignon, constitué d'un mycélium hyalin et cloisonné, de microconidies globuleuses et fréquentes, de macroconidies pédiformes et de chlamydospores sphériques pouvant subsister dans le sol

plusieurs années (Bulit *et al.* 1967). La propagation traditionnelle, par rejets, du palmier dattier joue un rôle important dans la contamination des sols. Les symptômes externes les plus caractéristiques de la fusariose du palmier dattier correspondent à un dessèchement des folioles, de bas en haut et un repliement vers le rachis.

La lutte la plus recommandée contre la maladie du Bayoud est celle qui suit l'approche génétique, visant la culture de cultivars résistants, même sur des sols contaminés par le champignon. Seuls six cultivars se sont avérés très résistants parmi une centaine au Maroc. L'orientation de la sélection de plants de palmier dattier résistants à la maladie du Bayoud reste liée à la connaissance des mécanismes de résistance à cette fusariose. L'objet de ce travail est de participer à la recherche de critères biochimiques de la résistance du palmier dattier au Bayoud. La précocité de leur apparition chez les jeunes plantes constituera un facteur important dans la reconstitution rapide des palmeraies détruites.

Les peroxydases, oxydoréductases utilisant le peroxyde d'hydrogène dans l'oxydation des phénols, ont été étudiées pour plusieurs maladies de plantes, causées par des virus, des bactéries ou des champignons (Lagrimini and Rothstein 1987; Ye, Pan and Kuc 1990). Elles catalysent la polymérisation des précurseurs immédiats des lignines et jouent, ainsi, un rôle primordial dans la défense des plantes aux attaques parasitaires (Vance, Kirk and Sherwood 1980). L'étude des peroxydases en relation avec la résistance au Bayoud des différentes variétés de palmier dattier, n'a débuté que récemment (Baaziz et Saaidi 1988, Baaziz 1989, Baaziz *et al.* 1990). Les cultivars connus au champs par leur très faible sensibilité au Bayoud, sont caractérisés par des taux faibles de peroxydases. Le but de ce travail consiste à trouver d'autres données permettant de démontrer l'implication possible des peroxydases dans le mécanisme de résistance du palmier dattier à la fusariose vasculaire à *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal

Des folioles sont prélevées dans la couronne moyenne de 29 cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), du même âge (plantation de 1964) et poussant à Zagora (Sud du Maroc). La résistance à la maladie du Bayoud des cultivars; cv. Admou (ADM), cv. Aguellid (AGL), cv. Ahardane (AHD), cv. Aissa-Youb (AIB), cv. Azigzao (AZO), cv. Bel-Hazit (BAZ), cv. Bou-Cerdoun (BCD), cv. Bou-Feggous (BFG), cv. Bou-Feggous ou Moussa (BFGM), cv. Bou-Ijjou (BIJ), cv. Bou-Ittob (BIT), cv. Bou-Slikhène (BSL), cv. Bou-Skri (BSK), cv. Bou-Sthammi Blanche (BSTB), cv. Bou-Sthammi Noire (BSTN), cv. Bou-Temda (BTD), cv. Bou-Zeggar (BZG), cv. Hafs (HFS), cv. Haoua (HOA), cv. Iklane (IKL), cv. Jihel (JHL), cv. Mah-Lbaid (MLB), cv. Mest-Ali (MST), cv. Mekt (MKT), cv. Oum-N'hal (OMH), cv. Outoukdim (OTK), cv. Race-Lahmar (RLM), cv. Sair-Layalet (SLY) et cv. Tadment (TDMT), a été évaluée au champ, par Saaidi (1979). Les cultivars BFGM, BSTB, BSTN, IKL, TDMT et SLY sont très résistants au Bayoud. Les cultivars AIB, BAZ, BSL et MLB sont assez résistants. Les cultivars BCD, BTD, BZG, OTK et RLM sont considérés comme peu résistants. Les cultivars AZO, ADM, BIJ, BIT, JHL, MST et OMH sont assez

sensibles, alors que les cultivars AGL, BFG, BSK, HFS, HOA, MKT et AHD sont très sensibles.

Le deuxième type de matériel végétal correspond à de jeunes plants issus de graines de palmier dattier. Les techniques de mise en germination des graines et leur repiquage sur un mélange de sable et de terre (2 volumes: 1 volume) sont décrites par Baaziz (1990). Les feuilles et les racines de deux lots de plants de palmier dattier (stade 2 feuilles), provenant de la germination de 300 graines, chacun, sont utilisées dans cette étude. Les deux lots correspondent à deux croisements dont les cultivars (pieds femelles) sont cv. Bou-Sthammi Noire (BSTN, résistant) et cv. Bou-Skri (BSK, sensible). La résistance (R) ou la sensibilité (S) des géniteurs mâles est évaluée dans le sol contaminé de Zagora. Les deux lots de plants sont identifiés par les références:

BSTN (R) x Mâle P 4 (R) : lot 1

BSK (S) x Mâle (S) : lot 2

Infestation expérimentale des plants

Les plants issus de semis correspondant à chaque croisement, sont répartis, au hasard dans les bacs à raison de 200 plants (50 plants par bac) destinés à l'infestation par *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, agent causal de la maladie du Bayoud, et 100 plants (50 plants par bac) témoins, où la suspension de champignon, servant pour l'infestation est remplacée par l'eau. L'inoculum est constitué d'une solution de $1,3 \times 10^6$ spores par ml d'une souche de *Fusarium oxysporum* FOA 133. Les plants de palmier dattier au stade 2 feuilles sont partiellement découverts et arrosés avec 1,8 litres de la solution d'inoculation par bac de 23 cm de hauteur et 54 cm de diamètre rempli au 2/3 avec un mélange de terre et de sable.

Echantillonnage et préparation des extraits

Neuf échantillonnages sont effectués suivant le nombre de jours (J) avant et après l'infestation des plantes. Ils sont successivement J0, J5, J10, J15, J21, J37, J47 et J70. A chaque échantillonnage, neuf plantes infestées et six plantes témoins sont numérotées. Un morceau de feuille de 4,5 cm de long ($0,23 \pm 0,01$ g) est prélevé au niveau de la première feuille de chaque plante. Douze prélèvements (six sur plants infestés et six sur plant témoins) de 0,23 g de racines sont effectués aux jours après infestation, J6, J30 et J47. Deux méthodes principales d'extraction des peroxydases ont été utilisées dans cette étude. L'une prévoit un traitement préalable du matériel végétal par l'acétone. Il en résulte une poudre (poudre à l'acétone) (Baaziz et Saaidi 1988). L'autre méthode consiste à épuiser progressivement le matériel de toutes les peroxydases susceptibles d'être présentes sous des formes solubles ou liées aux parois cellulaires. Dans ce dernier cas, le matériel végétal est broyé dans un mortier maintenu dans la glace, en présence d'un tampon Tris-Hcl 5 mM (pH 7,2), contenant du saccharose 0,25 M et $MgCl_2$ 1 mM. Le broyage est facilité par addition du sable (Merck). L'extrait obtenu est centrifugé à 6000 g pendant sept minutes. Le surnageant constitue la

fraction soluble S_1 . Le culot est repris dans le tampon Tris-HCl, 5mM (pH 7,2), contenant Triton x-100 1% (v/v). Après agitation le contenu est centrifugé comme précédemment.

Deux extractions successives sont effectuées. Le culot qui en résulte est lavé avec du tampon. Le résidu se trouve, ainsi, épuisé en activité peroxydasique soluble. Le résidu d'extraction est repris, dans une deuxième étape, dans le tampon Tris-HCl 5 mM (pH 7,2), contenant du NaCl 1 M. Quatre extractions successives sont effectuées comme précédemment. Les surnageants obtenus constituent les fractions ioniques I_1 I_4 . Dans une dernière étape, le résidu est repris dans du tampon acétate 0,1 M (pH 5,0), contenant la pectinase (2 unités.ml⁻¹) et la cellulase (2 unités.ml⁻¹).

Après agitation, l'extrait est incubé une nuit à la température du laboratoire. Le surnageant obtenu après centrifugation, constitue la fraction covalente C_1 . Les extraits bruts obtenus S_1 , I_1 et C_1 sont partiellement purifiés sur colonne de Sephadex G-25 (Pharmacia), préalablement équilibrée avec le tampon Tris-HCl 5 mM (pH 7,2). Trois extraits S, I et C, correspondant sont obtenus.

Détermination des activités enzymatiques

L'activité des peroxydases est évaluée en présence de plusieurs substrats et du peroxyde d'hydrogène. Les substrats constitués par le gaiacol, l'eugénol, l'acide férulique et l'acide chlorogénique, sont utilisés suivant la méthode décrite dans Baaziz 1990. L'activité des polyphénoloxydases est déterminée en utilisant comme substrat, du catéchol de concentration 10 mM, préparé dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M (pH 6,0). Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Lowry (1951).

L'unité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme qui entraîne une variation de la densité optique (DO) égale à 0,1 pendant 1 min. dans le cas des peroxydases. Elle est égale à la quantité d'enzyme qui implique une variation de DO égale à 0,01 par min. pour les polyphénoloxydases.

Electrophorèse et isoélectrofocalisation sur gel de polyacrylamide

Deux méthodes de séparation électrophorétique sont utilisées; l'électrophorèse selon le système de Davis (1964) et selon la technique de Laemmli (1970). L'isoélectrofocalisation est réalisée horizontalement sur des gels plats de 1 millimètre d'épaisseur, constitués de polyacrylamide 5% et d'ampholytes (pH 3,0-10,0) 2%. La révélation des peroxydases est effectuée en présence du peroxyde d'hydrogène et de la benzidine (Baaziz 1990).

Les polyphénoloxydases sont révélées en présence de deux o-diphénols; le catéchol 10 mM et la DL-dihydroxyphénylalanine (DL-Dopa) 5 mM préparés dans du tampon acétate 0,1 M (pH 5,0) et solubilisés par chauffage à 45°C. Les protéines sont colorées par le bleu brillant de coomassie (R 250) à 0,1% dans une solution méthanol-eau-acide acétique (5:5:1, par volume). La décoloration est faite dans une solution d'acide acétique 7%.

RESULTATS

Les taux des peroxydases foliaires extraites à partir de poudres à l'acétone, sont déterminés au cours des mois de décembre et avril, chez trois groupes de cultivars de palmier dattier différents par leur niveau de résistance au Bayoud. Le premier groupe est constitué de cultivars très sensibles qui sont BSK, BFG et JHL. Le deuxième groupe comprend deux cultivars assez résistants: BZG et BSL. Le troisième groupe est constitué des cultivars les plus résistants au Bayoud. Il s'agit de BSTN, IKL, TDMT, BFGM, SLY et BSTB. La figure 1 montre les résultats obtenus dans chaque cas.

D'une façon générale, l'activité des peroxydases (unités.g⁻¹ matière fraîche) enregistrée au mois d'avril est relativement faible par rapport à celle obtenue au mois de décembre. Elle montre une diminution respective d'environ 30% et 28% pour les cultivars assez résistants et très résistants. Cependant une légère augmentation de l'activité enzymatique des cultivars très sensibles est observée lorsqu'on passe de décembre à avril. D'autre part, les cultivars très sensibles à la fusariose présentent toujours une activité peroxydasique plus faible par rapport aux cultivars assez résistants, et ceux de résistance maximale. Cette différence est beaucoup plus nette au mois de décembre. Ainsi, le taux de peroxydases des cultivars sensibles ne représente qu'environ ¼ et ½ du taux moyen, enregistré pour les cultivars restants, durant les mois de décembre et avril, respectivement. Le cultivar SLY, très résistant au Bayoud, constitue une exception. En effet, son taux faible en peroxydase le rapprocherait des cultivars plus sensibles.

Dans le but d'étudier le degré de liaison des peroxydases du palmier dattier avec les différents constituants cellulaires, la technique de solubilisation progressive de ces enzymes a été utilisée pour leur extraction à partir de huit cultivars; IKL, SLY, AZO, BSL, OTK, BFG, JHL et BSK. Deux substrats reconnus par les peroxydases de folioles du palmier dattier, sont utilisés dans cette étude. Ils sont le Gaiacol, à l'origine de l'activité gaiacol-oxydase (G-oxydase), et l'acide férulique, à l'origine de l'activité acide férulique-oxydase (F-oxydase). Les résultats sont reportés dans le tableau 1.

Les pourcentages des activités des fractions solubles, ioniques et covalentes sont exprimés en fonction de l'activité totale calculée en ajoutant les activités respectives de ces trois fractions; S, I et C. Pour l'activité G-oxydase, la fraction soluble (S) prédomine. Elle est supérieure à 90% de l'activité totale chez tous les cultivars adultes. La fraction ionique (I) ne dépasse guère 10% de l'activité totale. La fraction covalente (C) est négligeable pour tous les cultivars. Elle est inférieure à 2% de l'activité totale G-oxydase, la fraction soluble représente en moyenne 76% de l'activité totale chez l'ensemble des cultivars.

L'activité de la fraction ionique varie entre 9% et 20% de l'activité totale chez tous les cultivars, à l'exception de BSK où elle est d'environ 28%. La fraction covalente ne dépasse pas 10%. La répartition de l'activité F-oxydase suivant les fractions S, I et C, est différente de celle de l'activité G-oxydase. En plus des différences entre les activités spécifiques (plus élevées chez les fractions ioniques pour l'activité F-oxydase, et inversement pour l'activité G-oxydase), le rapport des deux activités (G/F) traduit une certaine divergence dans la répartition des deux activités.

Les symptômes externes du Bayoud sur les jeunes plants de palmier dattier au stade deux feuilles, consistent à un enroulement des feuilles suivi d'une perte de la coloration verte naturelle. La plante devient cassante et pendante. Le degré d'attaque des deux lots de plants par le champignon est représenté sous forme de nombre de plants morts en fonction des jours après infestation (Figure 2).

Tableau 1. Activité des peroxydases, G-oxydase (G-oxy.) et F-oxydase (F-oxyd.) solubles (S), ioniques (I) et covalentes (C) extraites des feuilles de différents cultivars de palmier dattier

Cultivar	Proteines (mg.g ⁻¹ M.F)	Activité des peroxydases Δ DO.min ⁻¹ . ⁻¹ M.F.		Unités.mg ⁻¹ prot.		Rapport G/F	
		G-oxy.	F-oxy.	G-oxy.	F-oxy.		
	S	35,25	100,50(95%)	12,43(72%)	28,50	03,53	8,08
IKL	I	03,25	003,75(04%)	03,40(20%)	11,54	10,47	1,10
	C	/	001,04(01%)	01,32*08%)	/	/	0,78
	S	47,00	089,15(93%)	15,00(74%)	19,00	03,19	5,94
SLY	I	01,87	005,10(05%)	03,89(19%)	27,22	20,74	1,31
	C	/	001,56(02%)	01,39(07%)	/	/	1,12
	S	27,00	126,44(98%)	23,67(84%)	46,93	08,79	5,34
AZO	I	03,71	001,87(01%)	03,33(12%)	05,05	08,98	0,56
	C	/	000,83(01%)	01,25(04%)	/	/	0,66
	S	49,16	144,45(94%)	21,87(76%)	29,38	04,45	6,60
BSL	I	04,41	006,35(04%)	05,14(18%)	14,38	11,63	1,23
	C	/	002,18(01%)	01,80(06%)	/	/	1,21
	S	22,35	086,65(97%)	12,30(78%)	38,76	05,50	7,04
OTK	I	03,08	001,56(02%)	02,43(16%)	05,07	07,88	0,64
	C	/	000,83(01%)	00,97(06%)	/	/	0,85
	S	14,65	040,51(97%)	10,27(86%)	27,66	07,01	3,94
BFG	I	01,64	000,73(02%)	01,04(09%)	04,87	06,33	0,70
	C	/	000,52(01%)	00,62(05%)	/	/	0,84
	S	31,10	048,43(92%)	15,76(73%)	15,57	05,07	3,07
JHL	I	03,46	003,12(06%)	04,30(20%)	09,03	12,45	0,72
	C	/	000,83(02%)	01,53(07%)	/	/	0,54
	S	36,50	061,03(92%)	07,70(63%)	16,71	02,11	7,92
BSK	I	02,58	004,16(06%)	03,47(28%)	16,13	13,44	1,20
	C	/	001,04(02%)	01,04(09%)	/	/	1,00

Les premiers symptômes apparaissent à partir de 28 jours après infestation. Entre le premier et le deuxième mois après infestation le lot 1 de plants de palmier dattier (BSTN X Mâle P4 [R]) présente plus de mortalité que le lot 2 de plants dérivant de parents sensibles au Bayoud. Cependant, la mortalité des plants du lot 1, de parents résistants, devient, dès le troisième mois après infestation, inférieure à celle des plants du lot 2. Ces dernières plants présentent une durée de mortalité très supérieure à celle du lot 1. Cet intervalle de temps représente la période au delà de laquelle la mortalité des plants s'arrête. La variation de l'activité peroxydasique (G-oxydase), extraite des feuilles à partir de poudres à l'acétone, a été suivie parallèlement avec l'évaluation de la mortalité des plantes en fonction du temps après infestation.

La figure 3 permet de démontrer que l'infestation des plantes des deux lots entraîne dans chaque cas, une augmentation des activités peroxydasiques (unités.mg⁻¹ protéines) par rapport à celles des témoins du même jour après infestation. Le début de ce changement d'activité se situe à 10 jours après infestation. L'augmentation du taux des peroxydases par rapport aux témoins est plus accentuée chez les plants du lot 1, comparativement aux plants du lot 2. Ainsi, 10 jours après infestation, l'activité enzymatique des plantes infestées du lot 1 est environ 1,7 fois celle des plants témoins. L'augmentation de l'activité enzymatique, par rapport aux témoins, est enregistrée au cours du premier mois, exactement aux jours 10 et 15 pour les lots 1 et 2, respectivement.

La répartition des trois fractions (S, I et C) des peroxydases extraites par solubilisation progressive, ainsi que leur évolution après infestation, sont déterminées pour trois dates correspondant aux jours 6, 30 et 47 après infestation (J6, J30 et J47). Le pourcentage d'augmentation des activités peroxydasiques à un jour déterminé après infestation, est calculé par rapport aux témoins du même jour. La figure 4 donne un aperçu général sur la variation des activités enzymatiques, en excès, enregistrées pour J6, J30 et J47. Dès le sixième jour après infestation, les plants de palmier dattier représentant le lot 1 ont montré une augmentation des activités F-oxydase au niveau des racines et des feuilles. Seules les racines des plants du lot 2 ont montré une légère augmentation de cette activité (sous forme soluble) par rapport aux témoins. Dans ce dernier cas, une variation dans le même sens a été enregistrée pour l'activité G-oxydase. L'augmentation de l'activité F-oxydase chez les plants infestés du lot 1, concerne toutes les formes des peroxydases (liées et solubles). Elle est moins importante, sous sa forme soluble, au niveau des racines des plants du lot 2. A 30 jours après infestation, durée moyenne nécessaire pour l'apparition des symptômes externes du Bayoud, les racines des plants du lot 1 ne montrant, cette fois-ci, qu'une légère augmentation de l'activité F-oxydase, sous ses trois formes (S, I et C). L'abondance de l'activité G-oxydase à J47 est également notée au niveau des racines des plants du lot 1. D'une façon générale, l'augmentation des activités enzymatiques, au niveau des racines, est perceptible au niveau des feuilles.

Les polyphénoloxydases sont déterminées au niveau de toutes les fractions enzymatiques obtenues par la méthode d'extraction par solubilisation progressive. L'évolution de cette activité a été suivie en fonction des jours après infestation des jeunes plants de palmier dattier (lots 1 et 2). A 30 jours après infestation, l'augmentation de l'activité des polyphénoloxydases (unités.g⁻¹ matière fraîche) est plus marquée au niveau des racines des plants du lot 1 (Tableau 2). Elle implique l'ensemble des fractions et en priorité les fractions S et I. Les

racines des plantes du lot 2 ne montrent qu'une faible augmentation concernant les fractions I et C seulement. Contrairement au lot 1, le lot 2 présente, au même jour après infestation (J30), une augmentation générale de l'activité polyphénoloxydasique au niveau des feuilles, cette fois-ci.

La séparation des peroxydases par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, permet, après élimination de celui-ci, de révéler par la benzidine, six zones d'activités notées; A₁, A₂, A₃, A₄, A₅ et A₆ (Figure 5). Les peroxydases de la zone d'activité A₁ sont constamment présentes chez le palmier dattier. Celles de la zone A₄ sont très représentées dans les racines et les feuilles de jeunes plants issus de semis, ainsi que dans les racines des cultivars adultes. Cependant, leur activité est faible, voire même absente, dans les folioles de certaines variétés. Les peroxydases de la zone d'activité A₆ sont spécifiques des racines. L'isoenzyme A₃ (Zone A₃) est rarement présente. La zone A₂ ne contient, en général, que des bandes d'activité moins consistantes et variables. Les spectres des peroxydases de différents cultivars de palmier dattier, ne présentent aucune différence qualitative nette. La zone A₄ montre le maximum de bandes révélées.

Tableau 2. Variation de l'activité des polyphénoloxydases des fractions solubles (S), ioniques (I) et covalentes (C) obtenue 30 jours après infestation par l'agent causal du Bayoud, chez de jeunes plants de palmier dattier infestés et témoins (non infestés)

^a Pourcentage d'augmentation ou de diminution de l'activité enzymatique calculé par référence au témoin. ^b Les chiffres entre parenthèses indiquent le pourcentage d'activité totale.

		Polyphénoloxydases (unités. g ⁻¹ poids frais)		Variation ^a
		Témoin ^b	Expérimental ^b	(%)
Lot 1				
	S	25,0 (16,6)	16,6 (13,3)	- 33,3
Feuilles	I	100,0 (66,7)	83,3 (66,7)	- 16,6
	C	25,0 (16,7)	25,0 (20,0)	0,0
	S	325,0 (39,0)	891,6 (53,5)	+ 174,3
Racines	I	175,0 (21,0)	400,0 (24,0)	+ 128,6
	C	333,3 (40,0)	375,0 (22,5)	+ 12,5
Lot 2				
	S	41,6 (28,3)	58,3 (26,9)	+ 40,0
Feuilles	I	100,0 (57,1)	108,3 (50,0)	+ 8,3
	C	33,3 (19,0)	50,0 (23,1)	+ 50,0
	S	575,0 (46,9)	400,0 (33,3)	- 30,4
Racines	I	266,6 (21,8)	283,3 (23,6)	+ 6,2
	C	383,3 (31,3)	516,6 (43,1)	+ 34,8

Après infestation des deux lots de plants de palmier dattier, par *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, l'aspect qualitatif des peroxydases ne montre pas de changement apparent par rapport aux plants témoins (non infestés). La séparation, sur le même type de gel, des polyphénoloxydases des jeunes plants a permis de mettre en évidence 3 groupes d'isoformes, notés; I, II et III (Figure 6). Le groupe I d'isoformes de polyphénoloxydases comigre avec les isoperoxydases les plus mobiles de la zone d'activité A₄. Il est généralement composé de deux formes chez les racines, et d'une seule chez les feuilles (fraction I) où il est l'unique constituant du spectre. Les isoformes du groupe II comigrent avec les formes de peroxydases les plus mobiles de la zone A₅. Quant au groupe III, qui est constitué de trois isoformes, il migre entre les zones d'activité peroxydasique A₅ et A₆. Les polyphénoloxydases sont plus représentées au niveau des racines. On note, cependant, la disparition des groupes I et II au niveau des fractions ioniques. Les enzymes des plants infestés n'ont montré aucune différence qualitative par rapport aux témoins.

La séparation des peroxydases du palmier dattier par isoélectrofocalisation est réalisée sur un gradient de pH allant du pH 3,0 au pH 10,0. Les enzymes obtenues par extraction à partir des poudres à l'acétone montrent deux groupes de formes moléculaires, de points isoélectriques (PI) très différents (Figure 7). Le premier groupe, de PI acide (5,5 environ), est constitué de peroxydases toujours actives et bien conservées dans les extraits bruts des plants de palmier dattier. Les bandes d'activité, apparemment doubles, sont généralement diffuses. Le deuxième groupe de formes moléculaires de peroxydase rassemble les isoformes de PI basique (10,0 environ). Sa présence ou son absence dépend de la nature des plantes. Ainsi, il est moins fréquent, voire même absent, chez les cultivars adultes. S'il est présent, ce groupe de peroxydases basiques comportera une ou deux bandes d'activité.

L'infestation des jeunes plants de palmier dattier appartenant aux lots 1 et 2 n'entraîne pas de changements qualitatifs par rapport aux témoins. Cependant, une différence, sur l'aspect qualitatif, a été notée. Elle concerne les peroxydases de point isoélectrique basique et migrant complètement vers la cathode.

En effet, dès le cinquième jour après infestation (J5), les plantes du lot 1 montrent une augmentation de l'activité enzymatique d'au moins une des deux isoperoxydases basiques. Cette augmentation de l'activité n'est perceptible pour les plants du lot 2, qu'à partir du jour 30 après infestation (J30). Elle devient moindre à partir de ce dernier jour, chez les plantes du lot 1; alors qu'elle est maintenue à 9 jours après infestation chez les plants du lot 2.

DISCUSSION

Les peroxydases (EC 1.11.1.7) sont très représentées chez le palmier dattier, *Phoenix dactylifera* L. Leur extraction par solubilisation progressive, n'a permis d'obtenir chez les cultivars adultes, qu'un faible taux de fractions ioniques et covalentes de ces enzymes. Malgré leur faible représentativité, ces fractions ont tendance à plus reconnaître l'acide férulique. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus chez le lupin (*Lupinus albus* L.) par Ros Barcelo *et al.* (1987) où l'absence des peroxydases liées de façon covalente aux parois a été remarquée.

Le taux des peroxydases foliaires a été déterminé chez plusieurs cultivars différents par leur degré de résistance à la maladie du Bayoud. Dans cette étude, nous ne pouvons discuter nos résultats qu'en fonction de cultivars de palmier dattier dont la résistance au Bayoud a été évaluée sur le terrain, il y a longtemps (Saïdi 1979). En effet, l'évolution de cette trachéomycose est très lente. Un délai d'environ six ans après infestation, est nécessaire pour obtenir une réponse nette sur le degré de résistance d'un cultivar déterminé.

L'évaluation des taux de peroxydases des folioles de différents cultivars de palmier dattier a permis de montrer l'existence d'une corrélation de la sensibilité au Bayoud d'une part, avec les taux faibles de peroxydases, d'autre part. Aussi, les cultivars de palmier dattier qui possèdent une capacité de production intense de rejets (Pereau-Leroy 1958, Saïdi 1979) ne contiennent que de faibles activités (unités.g⁻¹ matière fraîche). C'est le cas, par exemple, des cultivars BFG, JHL et BIJ.

Une corrélation entre un haut niveau de peroxydases et la résistance des plantes aux infections par des agents pathogènes a été établie par plusieurs auteurs. Ainsi, Patykowski *et al.* (1988) ont montré que les cultivars de blé résistants à l'infection par *Erysiphe graminis* sont d'origine, plus riches en peroxydase que les cultivars sensibles. De plus, l'infestation des plantes résistantes s'accompagne, cinq jours après, d'une augmentation rapide des peroxydases soluble et ionique. D'autre part, le processus de croissance et de développement des plantes, englobant la production de rejets chez le palmier dattier, est sans doute, lié à l'acide indole acétique (AIA), principale hormone de croissance qui agirait, à son tour, sur le taux des peroxydases, provoquant sa diminution (Jones 1986, Sirju-Charran 1986).

La disparité des activités peroxydasiques en fonction des cultivars, peut être due à la synthèse de nouvelles peroxydases, ou simplement à l'activation ou l'inhibition de leurs formes déjà préexistantes suite à la présence de plusieurs substances, notamment les phénols (Greppin *et al.* 1986). L'ensemble des cultivars de palmier dattier, *Phoenix dactylifera* L., montre la présence chez cette espèce, d'une isoperoxydase (A₁) stable, très conservée et apparemment double. Sa migration anodique, en électrophorèse sur gel de polyacrylamide, est caractérisée par une mobilité relative faible (Baaziz 1989). L'électrophorèse en présence de SDS, permet la révélation d'autres isoperoxydases, en particulier les isoformes de la zone A₄. Il ne semble pas y avoir une relation entre la résistance au Bayoud et un type particulier de spectre isoenzymatique. Toutefois, les isoformes de la zone A₁ sont plus actives chez les cultivars résistants ou de résistance moyenne.

Après infestation expérimentale de jeunes plants de palmier dattier, le suivi de la mortalité en fonction du temps, a permis de constater deux types d'évolution de l'apparition des symptômes externes du Bayoud. Ainsi, une mortalité précoce, mais de courte durée, a été observée pour le lot 1 de plants provenant de parents résistants à la maladie, tandis qu'une mortalité de longue durée a été constatée pour le lot 2 de jeunes plants de parents sensibles. Par conséquent, le lot 2 est considéré, dans cette étude, comme sensible à la fusariose.

Lorsqu'on compare les réactions des deux lots de plants, on constate une grande réactivité des plants du lot 1. Celle-ci concerne l'importance et la précocité de la réponse à l'infection. Ainsi, les plants résistants montrent une augmentation intense et générale de l'activité F-

oxydase au niveau des racines. L'augmentation de cette activité est ressentie, le même jour, au niveau des fractions S et I des feuilles.

C'est au niveau des feuilles également, que l'activité des peroxydases de PI basique, testées cinq jours après infestation, devient plus importante. Le fait que les augmentations précoces des peroxydases soient de nature F-oxydase, conforte l'hypothèse de la stimulation d'une activité lignifiante chez les plants infestés du lot 1. En effet, le produit d'oxydation de l'acide férulique (acide diférulique) a été trouvé chez plusieurs monocotylédones (Markwalder and Neukom 1976, Harris and Hartley 1980). L'acide férulique joue le rôle d'intermédiaire de rigidification des parois cellulaires par les peroxydases (Fry 1986).

La stimulation de l'activité peroxydasique peut être obtenue chez les plants de palmier dattier résistants et sensibles au Bayoud. La différence réside dans la précocité et l'importance de la réponse à l'infection. Comme dans le cas des cultivars adultes, les changements quantitatifs des activités peroxydasiques chez les jeunes plants, ne paraissent pas liés à l'apparition ou la disparition de nouvelles isoformes.

L'augmentation des activités peroxydasiques peut être associée avec la stimulation des polyphénoloxydases. Les plants de palmier dattier relativement résistants répondent les premiers et de façon plus intense. Ces résultats confirment les observations faites pour la fusariose de la tomate par Retig (1974). Cet auteur a montré que l'inoculation de la tomate par *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* fait augmenter l'activité des peroxydases 24 heures et 47 heures après inoculation des plantes résistantes et sensibles, respectivement.

Une stimulation des polyphénoloxydases a été également obtenue chez les plantes résistantes. Il a été suggéré que les deux activités enzymatiques produisent, par oxydation, des composés phénoliques, des substances inhibitrices du développement de l'agent pathogène. L'association des peroxydases et des polyphénoloxydases peut être vérifiée qualitativement chez les plants de palmier dattier.

Elle est plus importante au niveau des fractions solubles des racines où l'on note une comigration électrophorétique des polyphénoloxydases I et II avec les peroxydases A₄ et A₅, respectivement. Seules les polyphénoloxydases du groupe III paraissent non qualitativement associées aux peroxydases.

D'autres investigations sont nécessaires pour préciser la séparation ou la coïncidence des sites actifs correspondant aux activités peroxydasique et polyphénoloxydasique. Pour le chêne (*Quercus robur*), les deux activités enzymatiques sont portées par un seul centre catalytique (Stich and Ebermann 1987). La production de quinones toxiques pour l'agent causal du Bayoud semble être vérifiée chez le palmier dattier. Ce résultat est à rapprocher des travaux de Assef (1986), selon lesquels les extraits racinaires des cultivars résistants au Bayoud montrent une inhibition de la croissance du champignon. D'une façon générale, les réactions à l'infestation des jeunes plants de palmier dattier sont en priorité d'ordre quantitatif. Elles impliqueraient une lignification intense et une production de quinones toxiques pour le champignon.

Figure 1. Taux de peroxydases foliaires évalués aux mois de décembre et avril chez différents cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.); 1, BSK; 2, BFG; 3, JHL; 4, BZG; 5, BSL; 6 BSTN; 7, IKL; 8, TDMT; 9, BFGM; 10, SLY et 11, BSTB

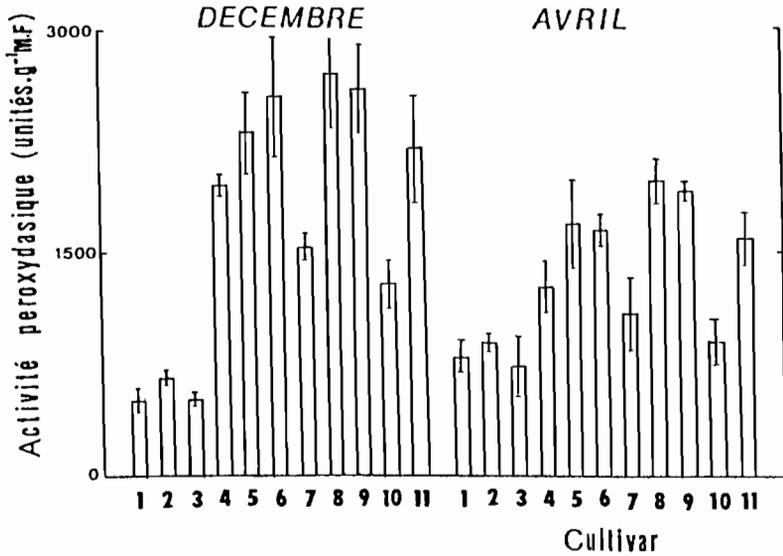


Figure 2. Evolution de la mortalité (plants morts) en fonction du temps, de 2 lots de plants de palmier dattier issus de graines (lot 1: BSTN x Mâle P4 [R] et lot 2: BSK x Mâle [S]) infestés par l'agent causal du Bayoud (souche 133). Le point 0 correspond au jour de l'infestation.

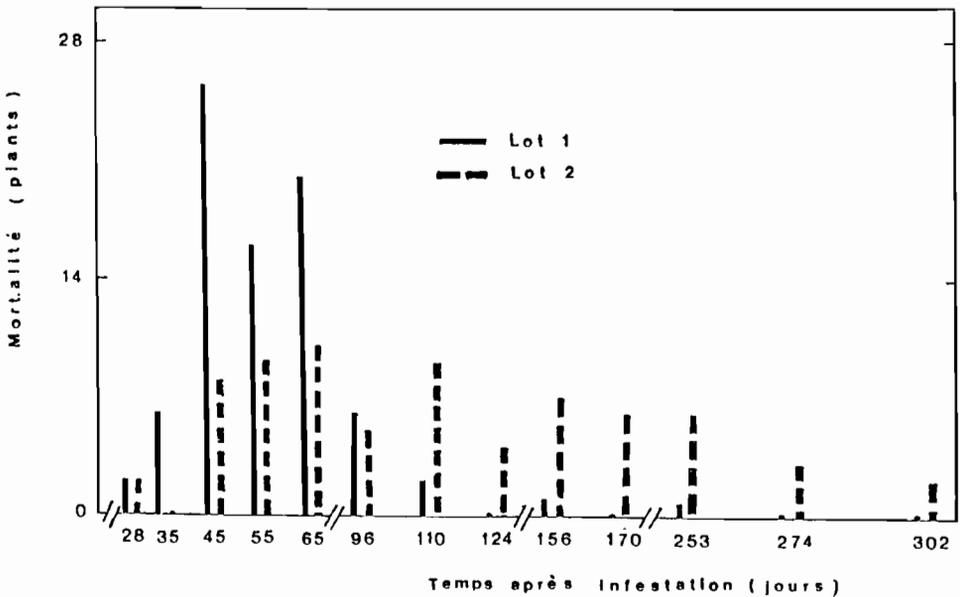


Figure 3. Evolution des activités peroxydasiques (G-oxydases) de feuilles, en fonction du temps après infestation des plants de palmier dattier du lot 1 (●--●) et du lot 2 (■--■) par l'agent causal du Bayoud, comparée aux cas des plants témoins (non infestés) du lot 1 (○-○) et du lot 2 (□---□).

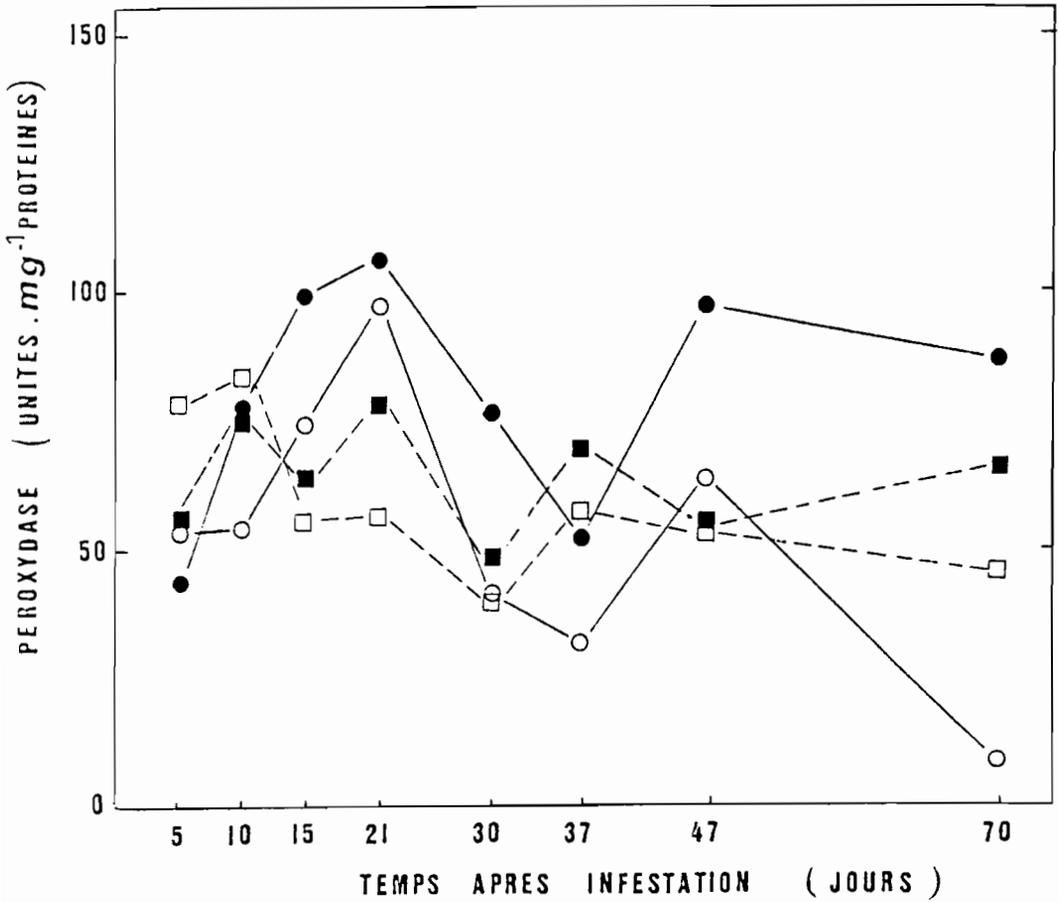


Figure 4. Taux d'augmentation des activités peroxydasiques G-oxydases (G) et F-oxydases (F) au niveau des fractions solubles (S), ioniques (I) et covalentes (C) obtenues à partir des plants de palmier dattier du lot 1 (—) et du lot 2 (-----) préalablement infestés par l'agent causal du Bayoud. Le pourcentage d'augmentation est calculé par référence aux plants témoins (non infestés) du même lot.

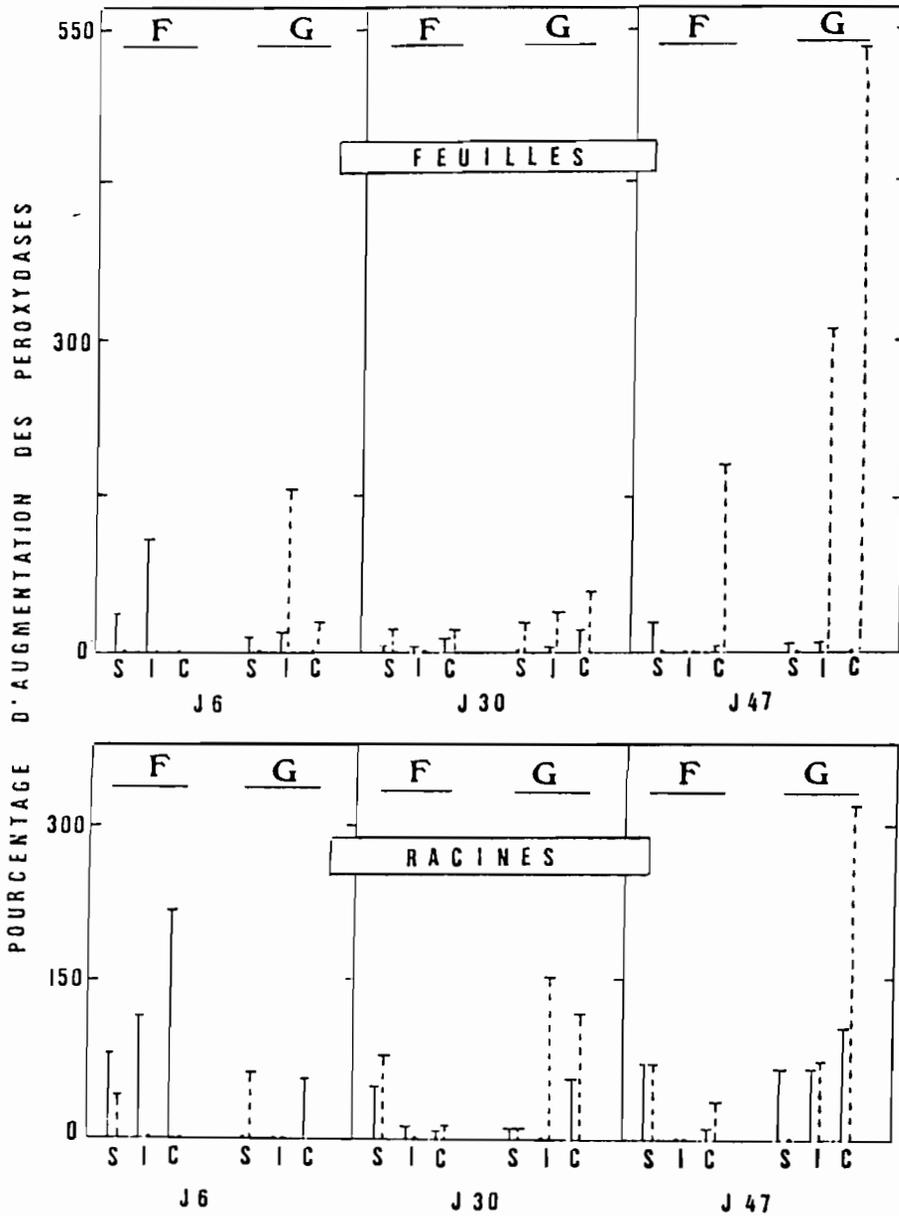


Figure 5. Séparation électrophorétique, en présence de SDS, des peroxydases anodiques d'extraits bruts des feuilles (1,2,3,4) et des racines (1',2',3',4') des cultivars de palmier dattier, par ordre croissant des chiffres; BFG, JHL, BSTN et IKL, comparée à celle des fractions de peroxydases; 5, foliaires solubles; 7, foliaires ioniques; 6, racinaires solubles et 8, racinaires ioniques, obtenues à partir de plants issus de semis.

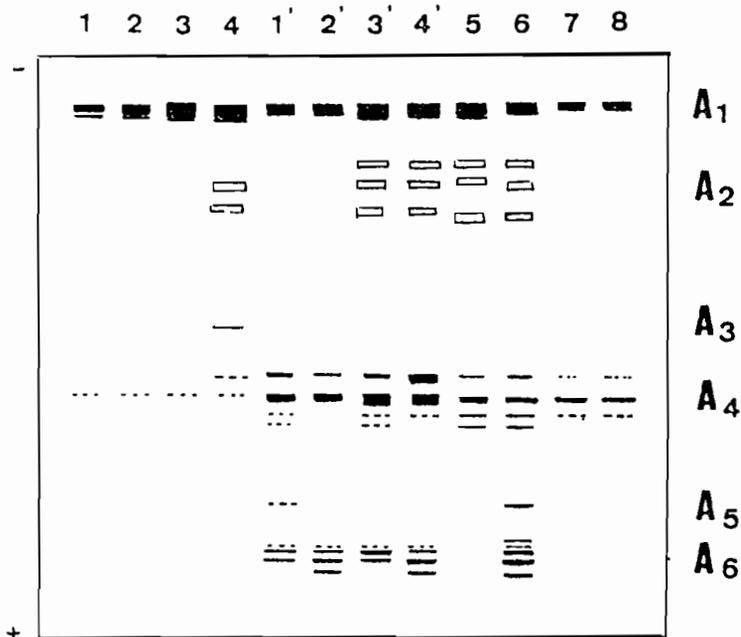


Figure 6. Zymogramme des polyphénoxydases obtenu après électrophorèse sur gel de polyacrylamide (système de LAEMMLI), d'extraits actifs des fractions solubles (S) et ioniques (I) de feuilles (F) et de racines (R) de jeunes plants de palmier dattier (lots 1 et 2) infestés (E) par l'agent causal du Bayoud et u'ayant pas subi d'infestation (T). Les flèches indiquent la position des isoperoxydases, A₄, A₅ et A₆.

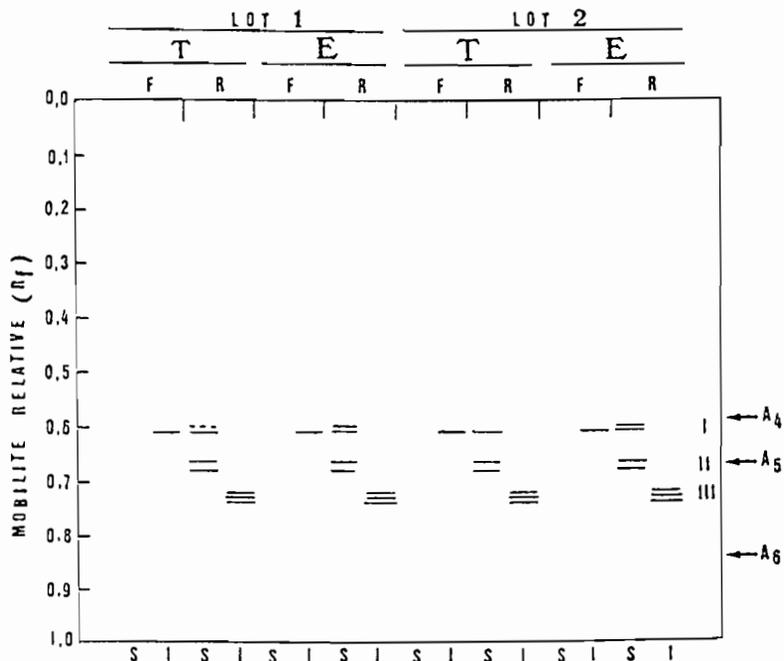
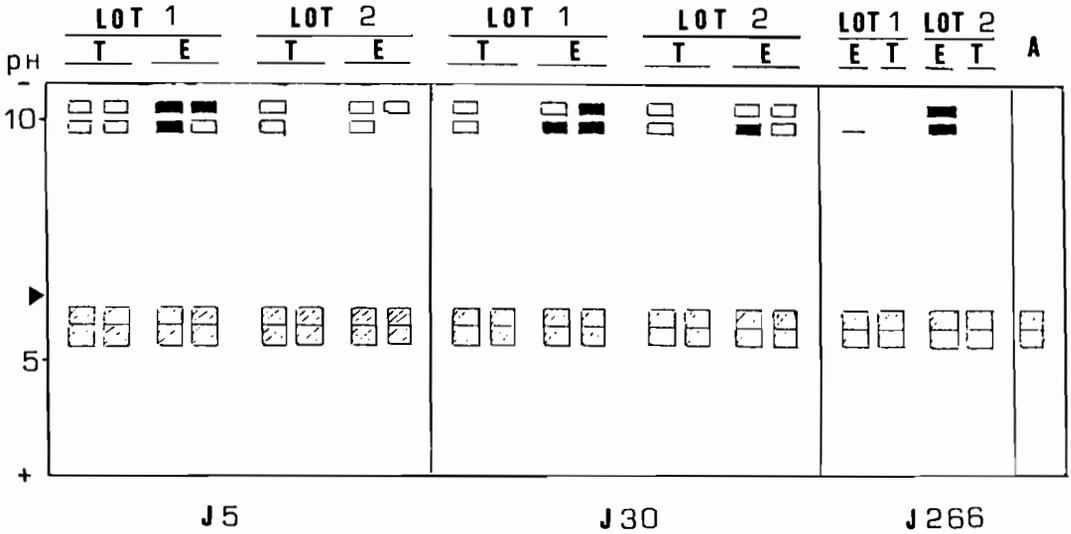


Figure 7. Séparation par isoélectrofocalisation (pH 3-10) sur gel de polyacrylamide des peroxydases de feuilles de jeunes plants de palmier dattier (lots 1 et 2) comparée à celle des cultivars adultes (A). Les extraits actifs obtenus par extraction à partir de poudres à l'acétone appartiennent aux plants infestés (E) par l'agent causal du Bayoud non infestés (T), pris 5,30 et 266 jours après infestation. La flèche indique la position des dépôts.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Assef G.M., Assari K. and Vincent E.J. (1986). Occurrence of an antifungal principle in the root extract of a Bayoud-resistant date palm cultivar. *Neth. J. Pl. Path.* 92: 43-47.
- Baaziz M. and Saaidi M. (1988). Preliminary identification of date palm cultivars by esterase isoenzymes and peroxidase activities. *Can. J. Bot.* 66: 89-93.
- Baaziz M. (1989). The activity and preliminary characterization of peroxidases in leaves of cultivars of date palm, *Phoenix dactylifera* L. *New Phytol.* 111: 403-411.
- Baaziz M., Brakez Z., Bendiab K. and Macheix J.J. (1990). Peroxidase and polyphenol oxidase activities in seedlings of date palm *Phoenix dactylifera* L.: Relationship with resistance to Bayoud disease. 8th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union 28 October-3 November, Agadir, Morocco.
- Baaziz M. (1990). Contribution à l'étude des peroxydases du palmier dattier, *Phoenix dactylifera* L.: Relation avec la résistance de la plante à la maladie du Bayoud, fusariose vasculaire à *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. Thèse de Doctorat d'Etat. Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc.

- Bulit J., Louvet J., Bouhot D. et Toutain G. (1967). Travaux sur les fusarioses. I - Travaux sur le Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier en Afrique du Nord. *Ann. Epiphyties* 18: 213-239.
- Davis B.J. (1964). Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121: 404-427.
- Fry S.C. (1986). Polymer-bound phenols as natural substrates of peroxidases. In: *Molecular and physiological aspects of plant peroxidases*. H. Greppin, C. Penel, Th. Gaspar Eds. Université de Genève. pp. 169-182.
- Greppin H., Penel C. and Gaspari T. (1986). *Molecular and physiological aspects of plant peroxidases*. Université de Genève.
- Harris P.J. and Hartley R.D. (1980). Phenolic constituents of the cell walls of Monocotyledons. *Biochem. Syst. Ecol.* 8: 153-160.
- Jones R.L. (1986). Gibberellic acid and auxin influence the secretion of peroxidase. In: *Molecular and physiological aspects of plant peroxidases*. H. Greppin, C. Penel, Th. Gaspar Eds. Université de Genève. pp. 295-308.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lagrimini L.M. and Rothstein S. (1987). Tissue-specificity of tobacco peroxidase isoenzymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* 84:438-442.
- Markwalder H.V. and Neukom H. (1976). Diferulic acid as a possible crosslink in hemicellulose from wheat germ. *Phytochem.* 15: 836-837.
- Patykowski J., Urbanek H., and Kaczorowska T. (1988). Peroxidase activity in leaves of wheat cultivars differing in resistance to *Erysiphe graminis*. *DC. J. Phytopathol.* 122: 126-134.
- Pereau-Leroy P. (1958). *Le palmier dattier au Maroc*. Ministère de l'Agriculture, Service de la Recherche Agronomique, Maroc et l'Institut Français de Recherche Fruitière Outre-Mer, Institut des Fruits et Agrumes Coloniaux.
- Retig N. (1974). Changes in peroxidase and polyphenol oxidase associated with natural and induced resistance of tomato to *Fusarium wilt*. *Physiol. Plant Pathol.* 4: 145-150.
- Ros Barcelo A., Munoz R. and Sabater F. (1987). Lupin peroxidases. I. Isolation and characterization of cell wall-bound isoperoxidase activity. *Physiol. Plantarum* 71: 448-454.
- Saaidi M. (1979). Contribution à la lutte contre le Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier. Thèse de Doctorat d'Université, Université de Dijon.
- Sirju-Charran G. (1986). Role of peroxidase in the physiology of tuberization in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). In: *Molecular and physiological aspects of plant peroxidases*. H. Greppin, C. Penel, Th. Gaspar Eds. Université de Genève. pp. 375-378.
- Stich K. and Ebermann R. (1987). Oak peroxidase: relationship with polyphenol oxidase. *Holzforschung* 41: 19-21.
- Vance C.P., Kirk T.K. and Sherwood R.T. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18: 259-288.
- Ye, X.S. Pan, S.Q. and Kuc J. (1990). Activity, isozyme pattern and cellular localization of peroxidase as related to systemic resistance of tobacco to Blue mold (*Peronospora tabacina*) and to tobacco mosaic virus. *Phytopathol.* 80: 1295-1299.

EFFET D'UNE SOUCHE AVIRULENTE DE *FUSARIUM OXYSPORUM* SUR L'EXPRESSION DE LA FUSARIOSE ET SUR LES PROPRIETES FONGITOXIQUES DES EXTRAITS RACINAIRES DE PALMIER A HUILE

S. DIABATE*, P. LEDEME*, H. DE FRANQUEVILLE* et B. KOUAME**

*IDEFOR - Département des Plantes Oléagineuses

Laboratoire de Phytopathologie BP 8 Dabou Côte d'Ivoire

**Directeur du Département des Plantes Oléagineuses de l'IDEFOR

01 BP 1001 Abidjan 01 Côte d'Ivoire

Résumé: D'importantes réactions physiologiques sont mises en évidence au niveau des racines des plantules de palmier à huile inoculées par le *Fusarium oxysporum* dès la première semaine d'incubation; des composés phénoliques plus ou moins toxiques envers le pathogène s'y accumulent. Ce phénomène est également constaté dans le cas de l'inoculation d'une souche avirulente. L'évolution des teneurs de ces composés en réponse à l'inoculation permet en outre de distinguer le comportement d'un croisement tolérant de celui d'un croisement sensible entre trois et huit jours d'incubation.

Abstract: The root physiology of oil palm plantlets changed considerably the first few weeks after being inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaedis*, their root physiology changed considerably. There was an accumulation of phenolic compounds that are more or less toxic for the pathogen. The same phenomenon was observed when an avirulent strain of *Fusarium oxysporum* is used as prevention. Flow evolution of these phenolic compounds during the experiment made it possible to distinguish between the reactions of a tolerant cross and a susceptible cross within eight days following the parasite attack.

Décrite pour la première fois en 1946 par Wardlaw, la fusariose vasculaire est la maladie la plus grave du palmier à huile en Afrique Tropicale. Elle est provoquée par un champignon d'origine tellurique, *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaedis*, et a occasionné en Côte d'Ivoire la perte de plusieurs centaines d'hectares de palmeraies dans la zone de la savane de Dabou (Renard *et al.* 1972), avant d'apparaître dans les plantations installées sur d'anciennes zones forestières (de Franqueville 1991).

Maladie de l'âge adulte, en extension sur savane ou sur forêt, elle s'exprime en replantation dès la première année de culture pour se stabiliser progressivement à partir de quatre à cinq ans (Renard et Quillec 1983). Bien que les composantes de l'environnement et les techniques culturales agissent sur l'expression des symptômes et l'intensité des dégâts (Renard et de Franqueville 1991), la recherche de matériel végétal tolérant, assurée par des tests d'inoculation de l'agent pathogène en préépinière, constitue la seule voie qui permette de lutter contre la maladie (Renard *et al.* 1980). La gamme de tolérance ainsi mise en évidence a permis de mettre en place avec succès un programme de replantation dans une zone à haut risque de fusariose (de Franqueville et Renard 1990).

La tolérance à la fusariose, telle qu'elle s'exprime à la suite d'inoculations en préépinière, semble s'accompagner dès les premiers jours qui suivent l'infection, de l'accumulation au niveau racinaire de substances phénoliques plus ou moins toxiques envers le pathogène (Taquet 1985, Diabate *et al.* 1990). Cette réaction de défense est stimulée par l'inoculation préalable d'une souche avirulente de *Fusarium oxysporum* (Taquet *et al.* 1985) et il nous a paru

intéressant dans cette note de comparer d'une part l'évolution de la fongitoxicité, d'autre part l'évolution des teneurs phénoliques d'extraits racinaires de croisements tolérant ou sensible à la fusariose, préinoculés ou non par une souche avirulente.

MATERIEL ET METHODES

Préparation de l'inoculum

Les souches pathogènes (M 179) et avirulentes (R 168) sont conservées en cultures monospores: la première a été isolée de tissus de palmier malade et la seconde de racines de palmier sain. Dans le cadre des essais décrits dans cette note, elles ont été cultivées pendant cinq jours en agitation orbitale (100 T/mn) puis huit jours en boîtes de Roux dans 100 ml d'un milieu précédemment décrit (Renard *et al.* 1972). L'inoculum ainsi recueilli, dilué 40 fois, permet d'obtenir une suspension comptant en moyenne $2,5 \times 10^5$ spores par ml de milieu.

Inoculation

Vingt ml d'inoculum (virulent ou non), soit en moyenne 5×10^6 spores, ont été versés autour du collet de plantules de palmier à huile, préalablement dégagé pour mettre à nu les jeunes racines. Les plants, au stade deux feuilles, appartiennent à deux croisements, l'un connu pour sa tolérance (L564D x L498P), l'autre pour sa sensibilité à la fusariose (L238T x L404D). Les différents traitements expérimentaux sont consignés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Traitements expérimentaux

Traitements	To	To + 10 jours
A-Non Inoculé	eau	-
B-Souche avirulente	R 168	-
C-Souche pathogène	M 179	-
D-Prémunition	R 168	M 179
E-Souche Pathogène	-	M 179

Le traitement A constitue le témoin de référence pour les objets B et C. Il consiste à verser 20 ml d'eau autour du collet, sans application de l'inoculum. Le traitement E constitue le témoin pour l'objet D. L'étude porte sur quatre blocs expérimentaux. Les diverses analyses sont réalisées sur quatre plants par croisement, par stade de prélèvement et par répétition.

L'incidence de la fusariose a été observée régulièrement, à la faveur des différents prélèvements. Huit prélèvements ont été effectués: un jour, trois jours, huit jours, 15 jours,

30 jours, 60 jours, 90 jours et 120 jours après la date d'inoculation du M 179 (T0 + 10 jours).

Techniques d'extraction et d'analyse

Pour la préparation des extraits bruts, les racines sont découpées finement pour constituer un échantillon homogène équivalent à 20 g de poids de tissus frais. Elles sont ensuite broyées dans un volume de 100 ml d'éthanol. Après une diffusion de 24 heures à l'obscurité, les jus de broyage sont filtrés, évaporés à sec sous vide et repris dans un volume de 4 ml d'éthanol. Le dosage des composés phénoliques totaux dans les racines est effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu à équivalence de poids de tissus frais. Pour le test de fongitoxicité *in vitro*, les propriétés toxiques d'extraits bruts racinaires à équivalence de phénols totaux sont appréciées, en milieu liquide, sur des germinations de spores du *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaedis*. La durée d'incubation est de 15 heures à la température de 27°C. L'inhibition de la germination est exprimée en pourcentage et correspond au rapport:

$$\frac{\text{germination témoin} - \text{germination motif}}{\text{germination témoin}}$$

RESULTATS - DISCUSSION

Le tableau 2 résume les pourcentages cumulés de fusariose constatés au cours des quatre mois d'incubation de la maladie.

Tableau 2. Pourcentages cumulés de fusariose à quatre mois d'incubation

	Inoc. M 179 (T0)	Inoc. R 168	Inoc. R 168 + M 179	Inoc. M 179 (T0 + 10J)
L564D x L498P	12,5	0	0	7,5
L238T x L404D	47,5	0	2,5	14,2

Le comportement relatif des deux croisements confirme la tolérance de l'un et la sensibilité de l'autre. L'effet de la souche R 168 est également confirmé puisque sa préinoculation fait passer le pourcentage de plants fusariés de 7,5% à 0% chez le croisement tolérant et de 14,2% à 2,5% chez le croisement sensible.

Fongitoxicité des extraits bruts

Les Figures 1 à 10 décrivent l'évolution de l'effet fongitoxique des extraits racinaires en fonction du matériel végétal et des différents traitements. Ces résultats indiquent que:

- L'inoculation de la souche pathogène M 179 (T0) augmente la fongitoxicité du matériel végétal, que celui-ci soit tolérant ou sensible (Figures 1 et 2). La figure 3 montre que la fongitoxicité des extraits, qui est la même chez les tolérants et les sensibles dans les trois jours suivant l'inoculation, augmente brusquement entre trois et huit jours chez les tolérants alors qu'elle reste stable chez les sensibles. La fongitoxicité des tolérants demeure supérieure à celle des sensibles au cours des deux mois qui suivent l'inoculation.

- L'inoculation de la seule souche avirulente augmente également les propriétés fongitoxiques du matériel végétal, que celui-ci soit tolérant (Fig. 4) ou sensible (Fig. 5). L'inoculation d'une souche avirulente à un croisement sensible amène le pouvoir fongitoxique de celui-ci au même niveau que celui d'un croisement tolérant contaminé par une souche pathogène (Fig. 6). La figure 7 résume le comportement du croisement sensible en fonction du traitement subi et indique que la réaction du palmier à la souche R 168 se manifeste entre trois et huit jours d'incubation. La diminution de la fongitoxicité entre un et trois jours se retrouve aussi bien chez les inoculés que chez les non inoculés: la forte toxicité enregistrée à un jour pourrait donc être consécutive aux blessures infligées lors du dégagement du collet.

- L'effet des souches R 168+M 179 est observé dans l'analyse des objets D et E. La figure 8 montre que les propriétés fongitoxiques du croisement tolérant sont très élevées, qu'il y ait ou non préinoculation. Le phénomène est moins marqué chez le croisement sensible (Fig. 9), notamment en raison de la faible toxicité de départ du croisement sensible inoculé par la souche pathogène M 179 (T0+10j).

En résumé, cette étude des propriétés fongitoxiques montre l'existence de deux réponses à l'inoculation. La première réponse se manifeste un jour après l'inoculation du champignon et est indépendante du degré de tolérance du croisement. Elle peut être interprétée comme une réaction à la blessure des racines provoquée par le dégagement du collet. La deuxième réponse qui se manifeste plus tardivement, entre trois et huit jours après l'inoculation, est au contraire liée à la tolérance de l'hôte et reflète l'efficacité des mécanismes de défense des plantules. Ces deux réponses se produisent aussi bien en réaction à l'inoculation d'une souche avirulente qu'à l'inoculation d'une souche virulente.

Evolution des teneurs en composés phénoliques totaux

La figure 11 montre que les teneurs totales en phénols augmentent entre trois et huit jours chez un croisement tolérant alors qu'elles demeurent à un niveau beaucoup plus faible chez le croisement sensible. Les Figures 12 et 13 indiquent que les teneurs en phénols restent stables entre trois et huit jours chez les croisements non inoculés, qu'ils soient sensibles ou tolérants. Les variations observées au cours de cette période paraissent donc dues à l'effet du parasite. La figure 14 montre un effet important de la souche R 168 entre trois et huit jours chez le croisement tolérant. L'évolution des teneurs en phénols chez le croisement sensible, pendant cette période, est la même, que les plantules soient inoculées ou non par les souches R 168+M 179 (Fig. 15). On assiste donc à un phénomène analogue à celui mis en évidence par la mesure des propriétés fongitoxiques des différents extraits bruts: baisse des teneurs entre un et trois jours et réaction à l'inoculation en fonction du degré de tolérance

stables entre trois et huit jours chez les croisements non inoculés, qu'ils soient sensibles ou tolérants.

Les variations observées au cours de cette période paraissent donc dues à l'effet du parasite. La figure 14 montre un effet important de la souche R 168 entre trois et huit jours chez le croisement tolérant. L'évolution des teneurs en phénols chez le croisement sensible, pendant cette période, est la même, que les plantules soient inoculées ou non par les souches R 168 + M 179 (Fig. 15).

On assiste donc à un phénomène analogue à celui mis en évidence par la mesure des propriétés fongitoxiques des différents extraits bruts: baisse des teneurs entre un et trois jours et réaction à l'inoculation en fonction du degré de tolérance entre trois et huit jours. Cette constatation confirme le lien étroit qui existe entre les composés phénoliques et les propriétés fongitoxiques des extraits racinaires.

CONCLUSION

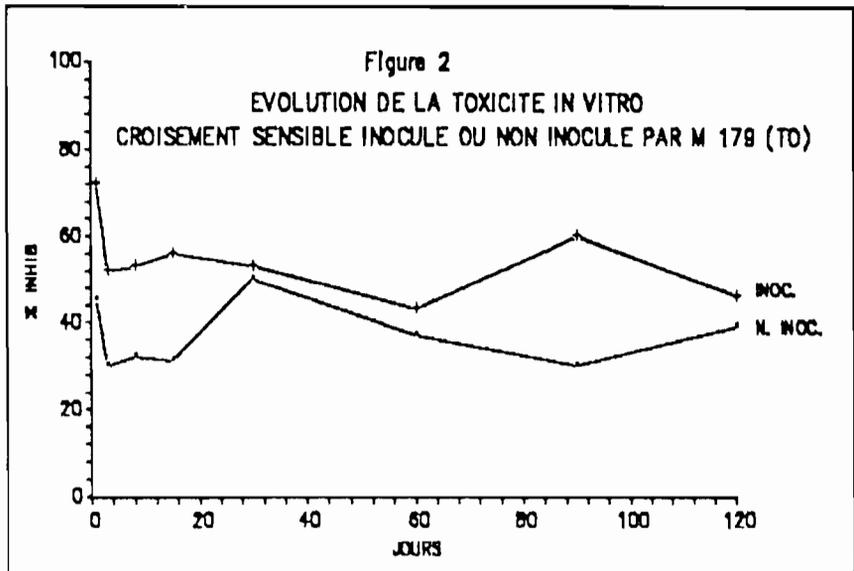
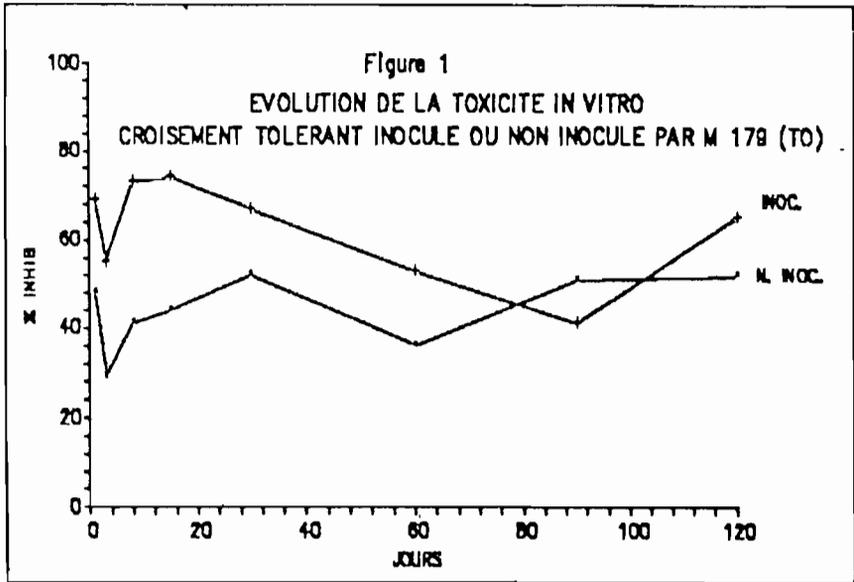
L'évolution du pouvoir fongitoxique d'extraits racinaires de plantules de palmier à huile, consécutivement à l'inoculation de l'agent pathogène varie en fonction du degré de tolérance à la maladie du matériel végétal. Les différences s'observent principalement entre trois et huit jours d'incubation. La préinoculation d'une souche avirulente de *Fusarium oxysporum* à un croisement sensible permet de réduire les dommages engendrés par l'inoculation du parasite en augmentant les propriétés fongitoxiques de ce croisement jusqu'à les amener au niveau de celles d'un croisement tolérant.

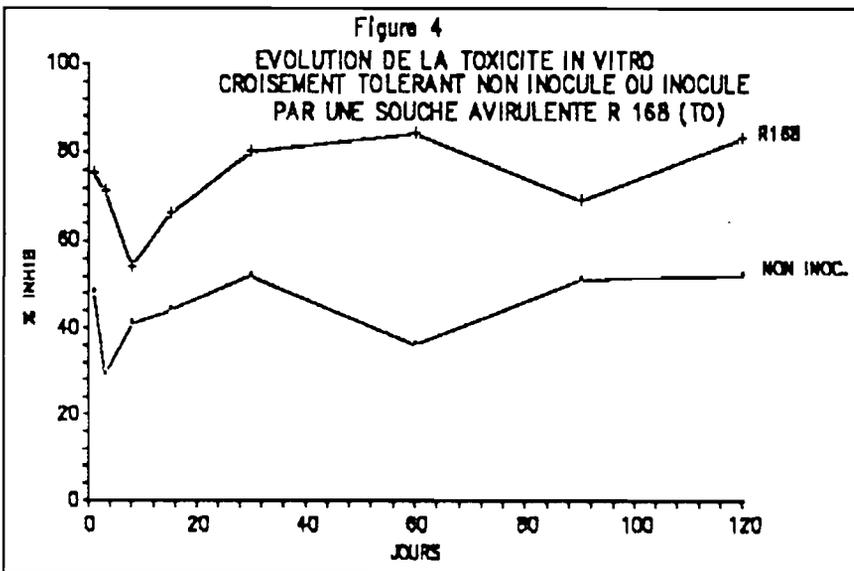
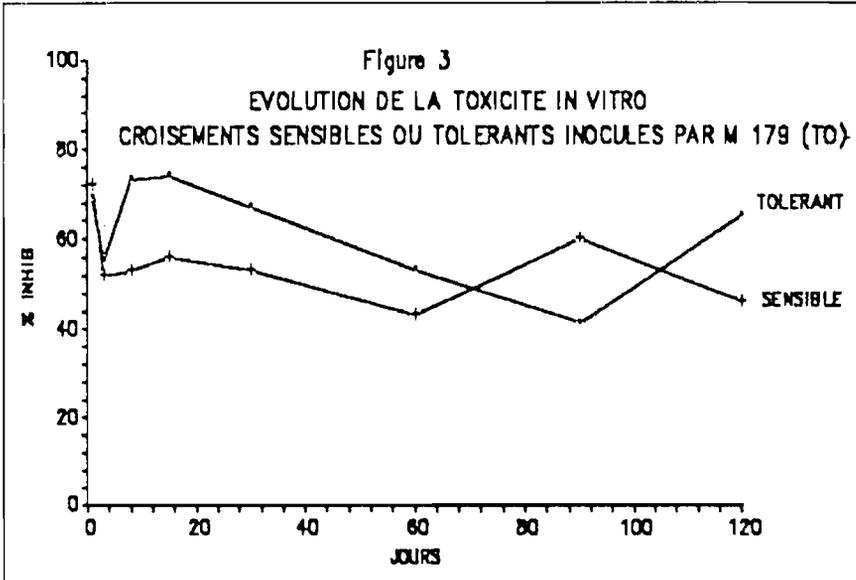
L'évolution similaire des teneurs en substances de nature phénolique confirme leur rôle dans la réaction de défense à la maladie. Des essais actuellement en cours tendent à montrer en plus de l'induction de la fongitoxicité, l'existence d'une compétition dans le sol entre souche pathogène et non pathogène de *Fusarium oxysporum*.

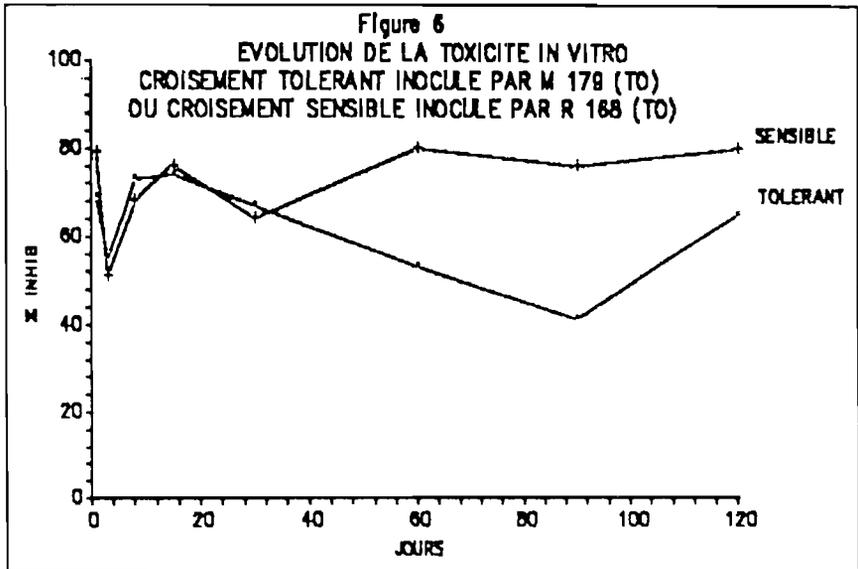
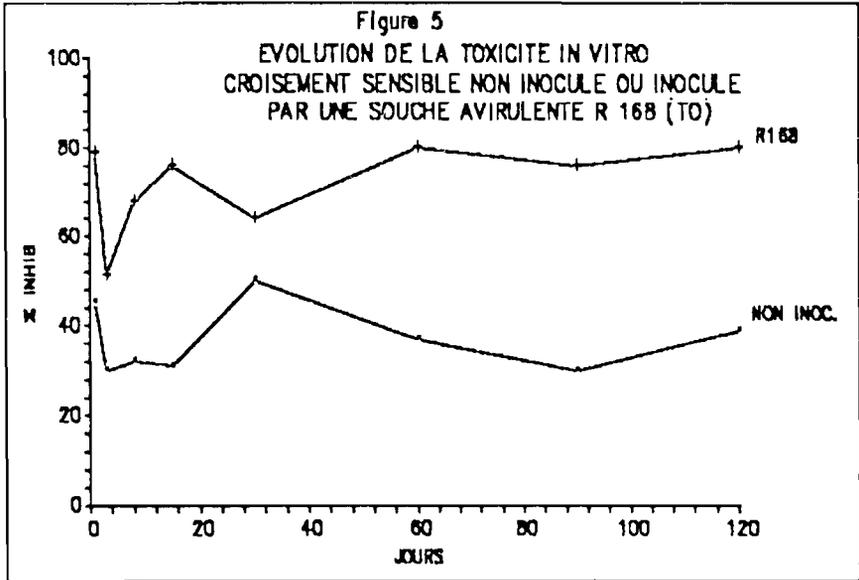
Des travaux similaires réalisés sur la tomate montrent que certaines souches de *F. oxysporum* non pathogènes sont, au même titre que certaines formes spéciales de *F. oxysporum* pathogènes, capables d'induire des mécanismes de résistance qui retardent l'apparition des symptômes (Alabouvette 1986).

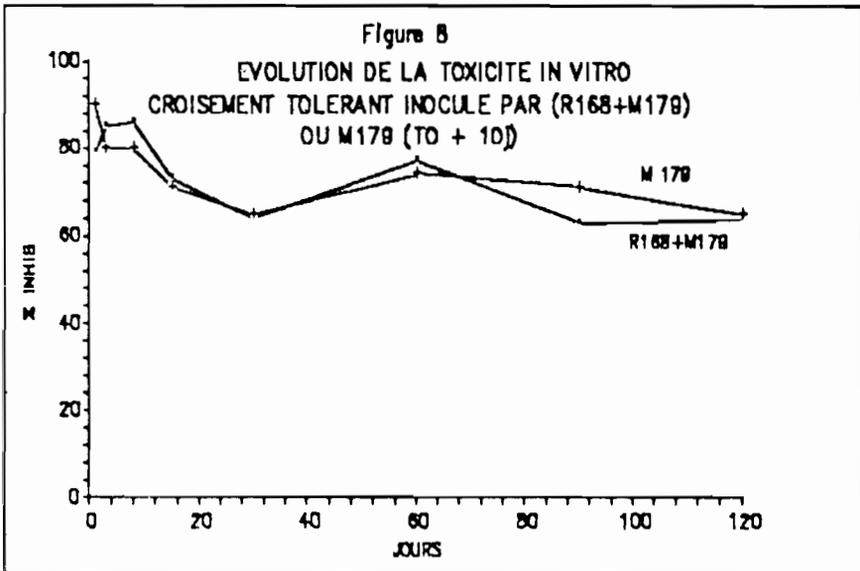
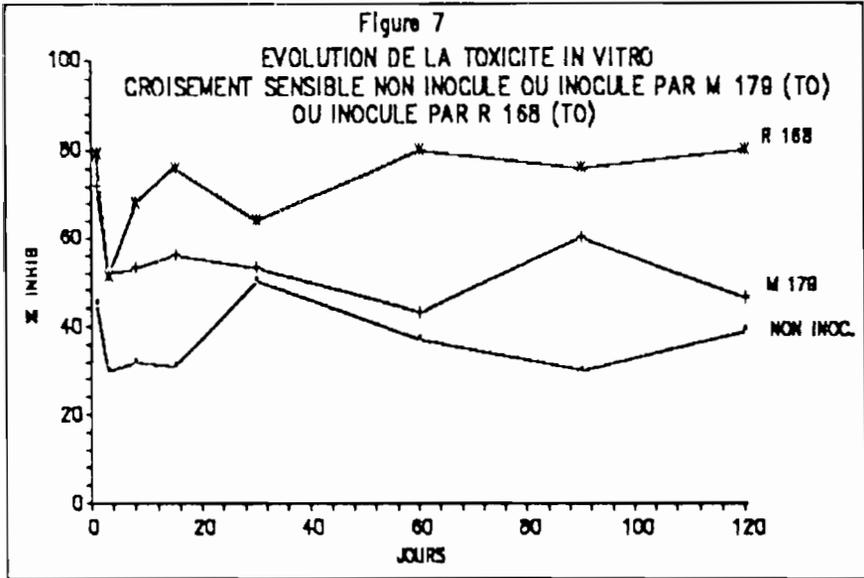
Ces mécanismes de défense résulteraient de deux compétitions entre souches pathogènes et non pathogènes: la première se déroule dans le sol pour certains éléments nutritifs indispensables, et la seconde intervient à la surface des racines pour la conquête des sites d'infections, (Tamietti et Alabouvette 1986). Toujours dans le cas des infections vasculaires, les plantes opposent à la progression du parasite dans le xylème des barrières mécaniques et biochimiques.

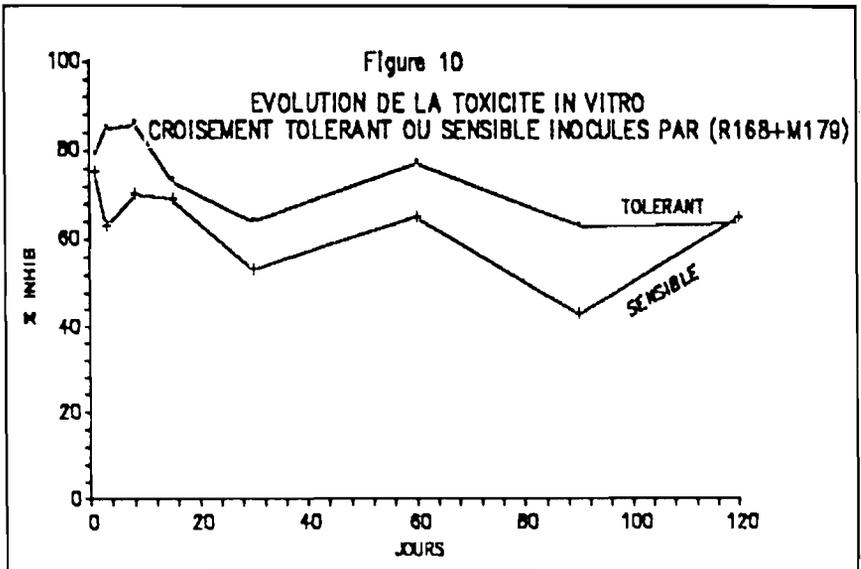
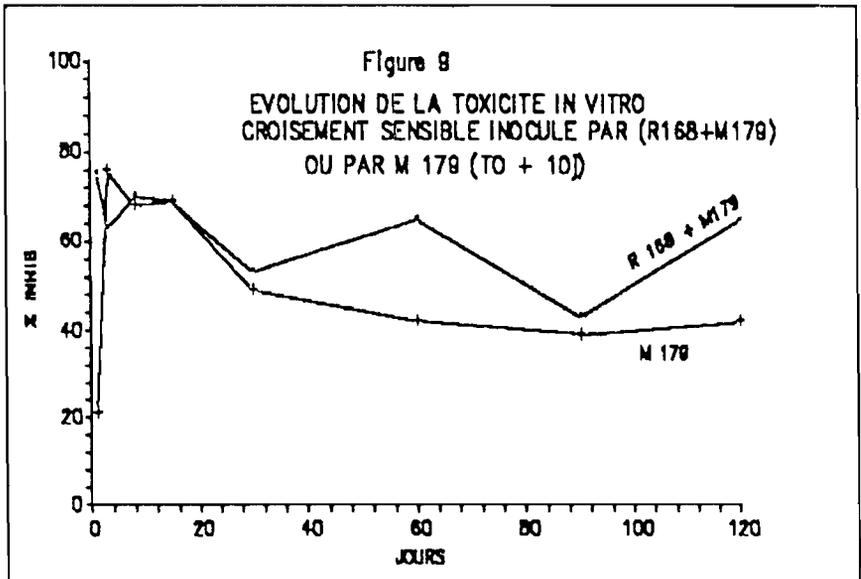
Hillocks (1986) observe dans les tiges de coton infectées par *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* la présence d'occlusions vasculaires et une accumulation importante d'aldéhyde terpénique qui empêchent l'expression des symptômes.

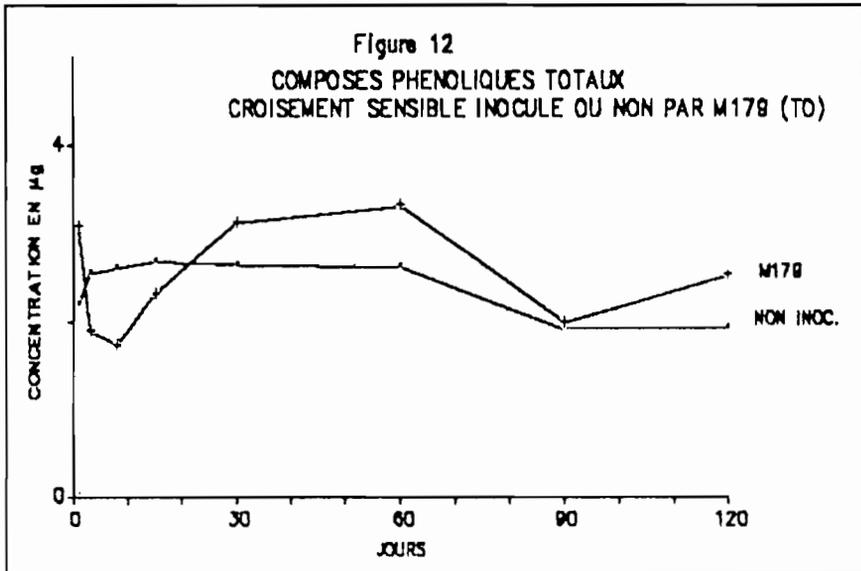
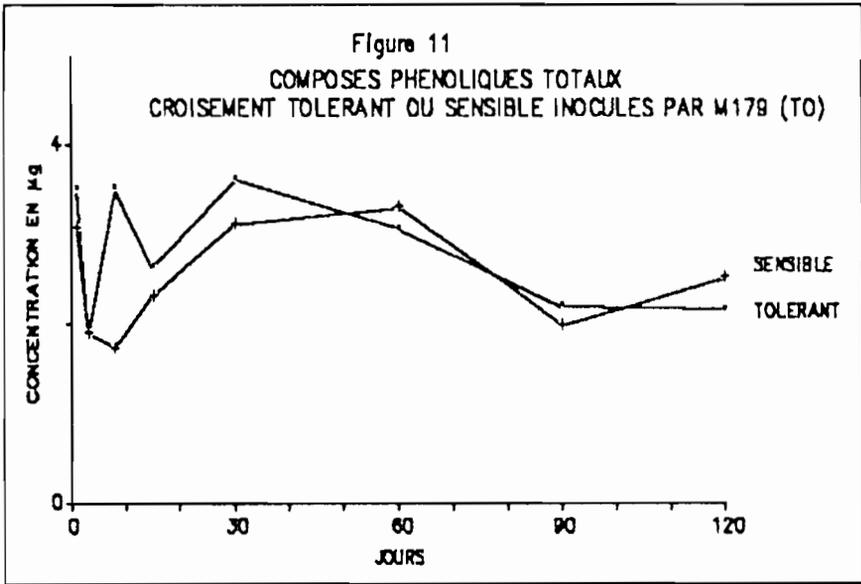


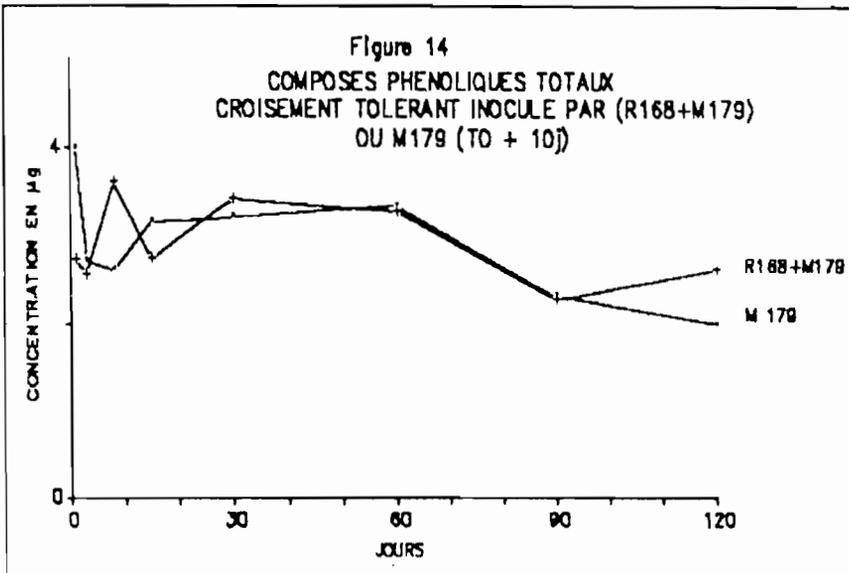
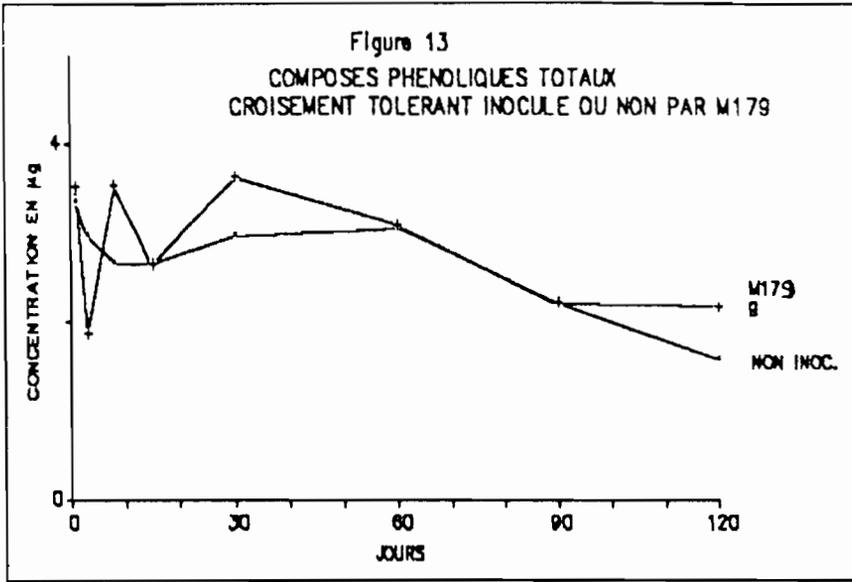


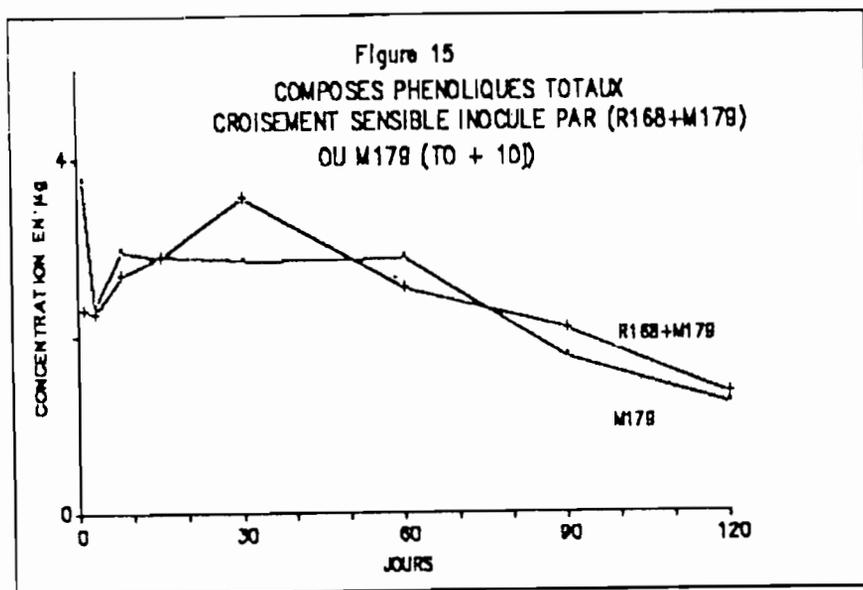












REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alabouvette C. (1986). *Fusarium* wilt suppressive soils from the Châteaurenard region: review of a 10-year study. *Agronomie* 6 (3): 273-284.
- Diabate S., Taquet B., Renard J.L., Franqueville H. de, Reiser P. (1990). Analyse en CLHP des substances produites par le palmier à huile au cours de l'infection par le *Fusarium oxysporum* f.sp *elaeidis*. Perspectives pour la sélection. *Oléagineux* 45 (2): 49-55.
- Franqueville H. de et Renard J.L. (1990). Bilan de l'amélioration du niveau de tolérance du palmier à huile à la fusariose. Evolution de la maladie sur la plantation R. Michaux. *Oléagineux* 45 (10): 400-405.
- Franqueville H. de (1991). Antécédent savane ou antécédent forêt: influence des isolats du pathogène sur le comportement des lignées de palmier à huile vis-à-vis de la fusariose. *Oléagineux* 46 (5): 180-186.
- Hillocks R.J. (1986). Cross protection between strains of *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum* and its effect on vascular resistance mechanisms. *J. Phytopathol.* 117: 216-225.
- Renard J.L., Gascon J.P. et Bachy A. (1972). Recherches sur la fusariose du palmier à huile. *Oléagineux* 27 (12): 581-591.
- Renard J.L., Noiret J.M. et Meunier J. (1980). Sources et gammes de résistance à la fusariose chez le palmier à huile *Elaeis guineensis* et *Elaeis melanococca*. *Oléagineux* 35 (8-9): 387-393.
- Renard J.L. et Quillec G. (1983). Fusariose et replantation - Eléments à prendre en considération pour les replantations de palmiers à huile en zone fusariée en Afrique de l'Ouest. *Oléagineux* 38 (7): 421-427.
- Renard J.L. et Franqueville H. de (1991). Intérêt des techniques culturales dans un dispositif de lutte intégrée contre la fusariose du palmier à huile. *Oléagineux* 46 (7): 255-265.

- Tamietti G. et Alabouvette C. (1986). Résistance des sols aux maladies: XIII- Rôle des *Fusarium oxysporum* non pathogènes dans les mécanismes de résistance d'un sol de Noirmoutier aux fusarioses vasculaires. *Agronomie* 6 (6): 541-548.
- Taquet B. (1985). Les mécanismes physiologiques de la réaction de défense du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) contre la fusariose vasculaire. Application à la recherche de nouveaux moyens de lutte. Thèse Doctorat 3ème cycle Paris VI. 151 pp.
- Taquet B., Renard J.L., Vernenghi A., Diabate S., Subba Rao P.V., Pelletier A. et Ravise A. (1985). Essai de stimulation de la tolérance du palmier à huile à la fusariose vasculaire par application d'éliciteurs. *Fungicides for Crop Protection BCPC Monograph* no. 1: 289-292.
- Wardlaw C.W. (1946). A wilt disease of the oil palm. *Nature* 158: 56.

LE CHARBON DU MIL AU SENEGAL: *TOLYPOSPORIUM PENICILLARIAE* BREF. PARASITE DU MIL (PENNISETUM TYPHOIDES STAPF AND HUBB)

Gnagna Diagne LEYE et Amadou Tidiane BA
Département de Biologie Végétale Faculté des Sciences et Techniques
Université Cheikh Anta Diop de Dakar - Sénégal

Résumé: Le mil est la principale céréale produite au Sénégal et constitue un élément important dans l'alimentation surtout dans les zones rurales. Cependant sa production est limitée par divers facteurs parmi lesquels, les maladies fongiques dont le charbon. *Tolyposporium penicillariae* Bref., une ustilagine est responsable du charbon du mil. Il pénètre dans son hôte par la stigmat puis l'ovaire avant la pollinisation et produit des spores brunes à noires qui remplissent l'ovaire. L'infection est suivie d'un ensemble de modifications affectant à la fois la réceptivité des stigmates et la structure de l'ovaire qui évolue pour donner cette grosse "graine" qui n'est en fait qu'un ovaire hypertrophié. L'étude du biocycle du champignon a montré une grande variabilité de certaines de ces composantes qui semble indiquer une certaine adaptabilité du cycle aux conditions ambiantes. In vitro, les diaspores présentent un polymorphisme remarquable. Les tests de résistance effectués ont montré que presque toutes les variétés cultivées de mil sont sensibles, aussi les méthodes chimiques de lutte restent encore largement utilisées. Des essais in vitro d'extraits de plantes locales ont donné des résultats encourageants sur l'inhibition de la germination des spores et sur la multiplication des sporidies. Sur l'hôte, de nombreuses incertitudes existent encore sur le mode de pénétration, l'évolution du champignon après sa pénétration en particulier au niveau de l'ovaire, et enfin les relations physiologiques hôte-parasite restent encore à préciser sur bien des points.

Abstract: Millet is the principal cereal produced in Senegal and is a major component in the population's diet, especially in rural areas. However, production is limited due to various factors, namely fungal diseases, one of which is pearl millet smut. *Tolyposporium penicillariae* Bref., a ustilago, is responsible for millet smut. It penetrates its host by the stigmata, then the ovary before pollinization and produces brown or black spores which fill up the ovary. The infection is followed by some changes that affect both the receptivity of the stigmata and the structure of the ovary. The latter develops into a large "seed" which is in fact a hypertrophied ovary. The study of the fungus biocycle has shown that certain components are highly variable, which seems to indicate that the cycle is somewhat adaptable to ambient conditions. In vitro, the diaspores are remarkably polymorphic. Resistance tests showed that almost all varieties of cultivated millet are susceptible, and that methods of chemical control are still widely used. In vitro trials using parts of local plants produced encouraging results on the inhibition of the germination of the spores and on the reproduction of the sporidia. Some questions remain with regard to the host: the means of penetration, the development of the fungus after its penetration, particularly the ovary, and finally various points regarding the physiological host-parasite relationship have yet to be defined.

Au Sénégal le mil est la principale céréale produite. La Direction de l'Agriculture indique qu'entre 1986 et 1990, le mil a occupé environ 75% des surfaces cultivées et 60% de la production céréalière. Cependant, les rendements de mil représentent environ 80% du rendement moyen des céréales à cause de diverses contraintes parmi lesquelles les maladies fongiques dont le charbon. L'agent pathogène de cette maladie est *Tolyposporium penicillariae* Bref., une basidiomycète appartenant à l'ordre des ustilaginales. Au terme de

l'action de ce champignon, les graines de mil sont remplies d'une poudre noire d'où le nom de la maladie (charbon du mil).

De nombreux auteurs se sont intéressés à divers aspects de la biologie de ce champignon. C'est ainsi que Bhatt (1946), Thakur and Williams (1980), Willingale and Mantle (1985 et 1987), Wells *et al.* (1987), étudiant le mode de pénétration, ont conclu à une compétition entre la spore et le grain de pollen au niveau de l'ovule. D'autres auteurs dont en particulier Subba Rao et Thakur (1983) ont noté une variabilité remarquable des diaspores en culture pure. La présente étude s'est intéressée en particulier aux rapports du champignon (microorganisme) et de la plante en ce qui concerne le mode et les mécanismes d'infestation, les rapports physiologiques et leurs conséquences morphologiques, les mécanismes de résistance et l'action d'extraits végétaux sur le champignon.

MATERIEL ET METHODES

Isolement de l'agent pathogène

A partir d'épi de mil infesté, des souches de *Tolyposporium penicillariae* Bref. ont été cultivées, isolées et conservées sur les milieux pomme de terre-carotte (PC) et pomme de terre-carotte-agar (PCA) Langeron (1952), suivant deux méthodes: d'abord par la culture de spores obtenues sur PCA, suivie d'une série de dilutions-étalements. Les différentes souches pathogènes sur le mil sont repiquées sur PCA, ensuite par micromanipulation pour obtenir en gouttes pendantes de PC des cultures monosporidiales. Toutes les souches sont conservées sur PCA à l'étuve à 32°C.

L'hôte

Les variétés de mil utilisées au cours de nos travaux nous ont été fournis par le Centre National de Recherches Agronomiques de Bambey (CNRA) - Sénégal. (Voir la liste en annexe 1).

Préparation des inoculums

Les infestations ont été faites avec une suspension de sporidies soit monoclonale soit pluriclonale. L'inoculum monoclonal à partir d'isolats conservés en collection sur PCA est rajeuni par repiquage sur le même milieu. Les souches pluriclonales proviennent d'une culture en atmosphère stérile, de balles de spores sur PCA. Dans les deux cas, les inoculum sont mis en suspension dans de l'eau distillée stérile avant l'utilisation.

Méthodes d'infestation

Du fait d'une certaine discordance entre les auteurs sur le lieu et le mode d'infestation, nous avons testé diverses structures de la plante. C'est ainsi qu'après avoir inoculé une suspension

du pathogène au niveau des racines, de la feuille, de la tige et de l'épi, et conformément à la littérature consultée, il nous a été donné de constater que l'infestation était effective seulement quand l'inoculation était faite au niveau des épis encore à l'intérieur du fourreau. Les épis ainsi infestés sont recouvertes de sachets d'auto-fécondation (Thakur, Subba Rao, Williams 1983 et 1986; Wells, Hanna and Burton 1987).

Les tests de virulence ont été effectués de janvier à février 1989 avec des isolats obtenus par la méthode de dilution-étalement, puis de juillet à août 1990 avec les souches isolées par micromanipulation, à raison de sept épis par souche avec trois témoins. Les infestations sont faites à la micropipette, par injection de 150 μ l d'un inoculum contenant environ 3910⁴ sporidies/ml les épis témoins étant inoculés avec 150 μ l d'eau distillée stérile.

Pour le screening de sensibilité variétale, les cultures pluriclonaux ont été utilisées à la dilution de 4.10⁵ sporidies/ml avec le même mode d'infestation sus-cité. Des épis sont aussi laissés à l'air libre pour une éventuelle infestation naturelle.

Méthodes d'étude anatomique

Des ovaires infestés et témoins prélevés à différents stades de leur développement, dépouillés des glumes et glumelles sous la loupe, ont été fixés dans un mélange de formol-acide acétique-éthanol (F.A.A.) puis déshydratés dans une série de mélange d'éthanol-alcool butylique tertiaire, imprégnés et inclus dans du paraplaste pour le matériel destiné à être coupé au microtome à paraffine et à observer au microscope photonique. Après déparaffinage, les coupes sont colorées à chaud au paragon: (bleu de toluidine: 3,65 g, Fuschine basique: 1,35 g, éthanol 30°: 500 ml), puis lavées à l'eau courante.

Produits naturels extraits de Phanérogames

Des extraits aqueux de 17 plantes ou organes de plantes récoltés dans la région du Cap-Vert et connues pour leur activité anti-bactérienne ou antifongique, Berhaut (Tomes II, III, IV, VI, voir liste en annexe 3) ont été testés sur la germination des spores et la multiplication des sporidies.

Préparation d'extraits à partir de végétaux frais

Sauf pour *Detarium microcarpum* et *Terminalia macroptera* qui n'ont pu être trouvés à l'état frais, 2 g de matière végétale lavée à l'eau distillée stérile pour les plantes à extrait non visqueux, soit avec 10 ml pour celles à suc très dense (*Lawsonia inermis*, *Borreria verticillata*, *Cassya filiformis*).

Les extraits sont ensuite filtrés sur de la gaze. Le matériel de broyage et de filtration étant stérilisé au préalable, tous les processus d'extraction ont été faits sous la hôte à flux laminaire. Pour *Detarium microcarpum* et *Terminalia macroptera* nous n'avons pu faire que des macérés de 24 heures au frigidaire.

Préparation de décocté à partir de plantes séchées

Deux grammes de végétal séché à la température du laboratoire, sont extraits dans 10 ml d'eau à 120° pendant 15 mm. Les décoctions de deux *Allium* et du *Citrus* ont été faites avec des organes frais. Dans tous les cas d'extraction, des disques, Bio-Mérieux stériles de 6 mm de diamètre sont imprégnés de 0,05 ml (2 gouttes) d'extrait et mis à sécher au frigidaire. Les tests d'inhibition sont faits en boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre contenant 25 ml de PCA, des balles de spores ou 0,5 ml d'une dilution pluriclonale à environ 4.10^5 sporidies/ml est étalé à la surface du milieu de culture, quatre disques tests + un témoin imprégné d'eau distillée stérile sont disposés sur la culture. Les lectures sont faites au bout de 48 heures, huit jours, 15 jours et le seuil d'inhibition est évalué, si l'extrait est actif. Pour les balles de spores les extraits sont incorporés au milieu de culture.

RESULTATS

Niveau de pénétration

Des travaux antérieurs indiquent que le champignon pénétrerait par le stigmate ou directement dans l'ovaire à travers sa paroi (Bhatt 1946, Bouhot et Mallamaire 1965). Plus récemment, des auteurs ont démontré le rôle du stigmate dans les phénomènes de pollinisation et d'infestation d'ovaire (Thakur and Williams 1980, Willingale and Mantle 1985 et 1987). Nous avons cherché à vérifier dans les conditions du Sénégal les voies de pénétration du champignon. Nos essais en parcelles nous ont donné les résultats suivants:

Tableau 1. Essais de janvier à février

Tests	Nombre de lectures	Réponses > 0
Infestations racinaires	a 72 + X	0
	b 48 + X	0
Infestations foliaires	c 39 + X	6 > 0; X = 0
	d 44 + X	0
	e 35 + X	
Infestation florale	f 98 + X	74 > 0; X = 0
	g 37 + X	2 > 0; X = 0

a = au moment des semis, b = stade gonflement, c = niveau ligules av. dernières feuilles (1ère feuille après la gaine), d = niveau blessure av. dernières feuilles (1ère feuille après la gaine), e = niveau ligules premières feuilles (1ères après le collet), f = stade gonflement, g = stade post anthèse.

X = nombre d'essais témoins = 16 pour a, = 13 pour b, = 15 pour c, = 15 pour d, = 16 pour e, = 15 pour f, = 15 pour g.

Tableau 2. Essais en période hivernale: de juillet à novembre 1989

Tests	Nombre de lectures		Réponses: %
Infestations (1) racinaires	T	25	7 = 1,3%
	I	36	10 = 1,2%
Ligule n°1	T	26	15 = 3,6%
	I	43	33 = 10%
Infestations foliaires (2)	T	26	11 = 5%
	I	31	13 = 1,7%
Ligule n°2	T	17	2 = 1%
	I	44	6 = 1%
Infestations florales	T	16	16 = 0%
	I	54	45 = 16%

T = témoins, I = individus inoculés, (1) = inoculum incorporé au semi, (2) = les ligules sont numérotées à partir de l'épi.

Les calculs de % ont été faits suivant la formule:

$$S = \sum_{i=1}^{90} \frac{(x_i - 1) n_i + (x_2 - 1) \times 2}{(Ex_i - 1)N} \times 100$$

x_i = catégorie de l'échelle de notation de la sévérité (ICRISAT)

n_i = nombre d'individus rentrant dans la catégorie

Ex_i = la plus forte note de l'échelle

N = nombre total d'individus observés

INTERACTIONS HOTE PARASITE

Relations anatomiques

Les observations au microscope photonique nous ont permis de suivre l'évolution du champignon dans l'ovaire et les modifications anatomiques qui s'ensuivent. Le champignon, une fois dans l'hôte, prolifère rapidement au détriment des téguments de l'ovule qui sont complètement digérés, la paroi de l'ovaire, le nucelle et la cellule sporogène (photos 1 et 2) paraissent moins affectés, on observe cependant quelques lacunes au niveau du nucelle qui seraient dues à un début d'invasion. Déjà à ce stade d'infestation, il est possible d'observer des amas fongiques qui évolueront pour donner les futures balles de spores au sein des tissus attaqués.

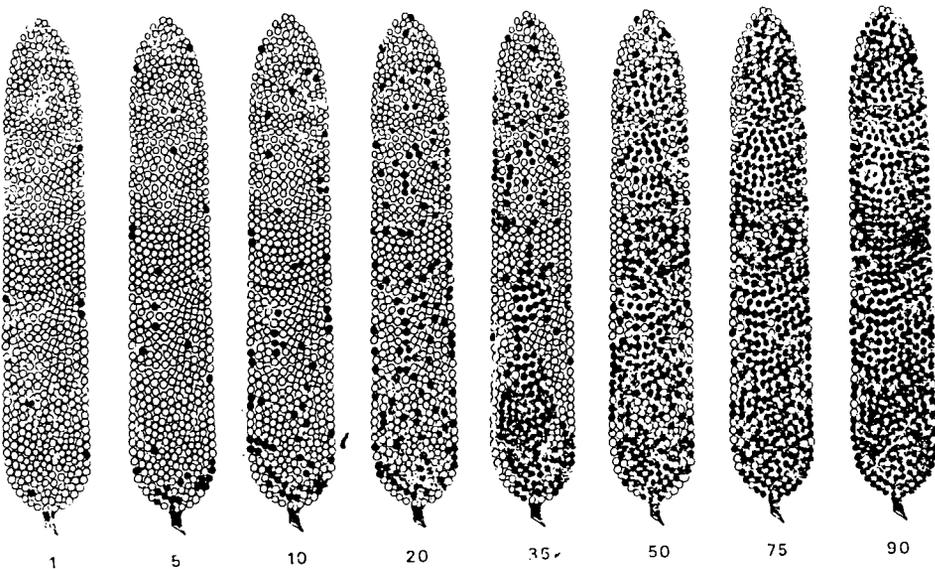
INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

A un stade plus avancé de l'infestation (photo 3), tous les tissus de l'hôte sont désorganisés. Les téguments de l'ovaire se réduisent en un amas informe où aucune structure n'est identifiable. Un reste de nucelle digéré, ou comprimé, complètement détaché de la paroi de l'ovaire, flotte dans la masse fongique qui contient des balles de spores à différents stades de leur développement (photos 4, 5 et 6).

L'ovaire-ovule ainsi infecté est à ce stade bien apparent sur l'épi, et de couleur verte, alors que les graines saines de taille plus réduite sont à peine visibles. L'ovaire est ainsi transformé en sore de consistance spongieuse et de structure lacunaire; elle brunie à maturité et contient un grand nombre de balles de spores sombres d'aspect poudreux (photo 7).

Echelles de notation de la sévérité (ICRISAT)¹

Pearl millet smut severity assessment key



Percent smut incidence

¹ International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics

Photo 1. Coupe longitudinale d'ovaire au bout de 10 jours d'infestation, épaisseur coupe: 8 μ ; G. = X 165.

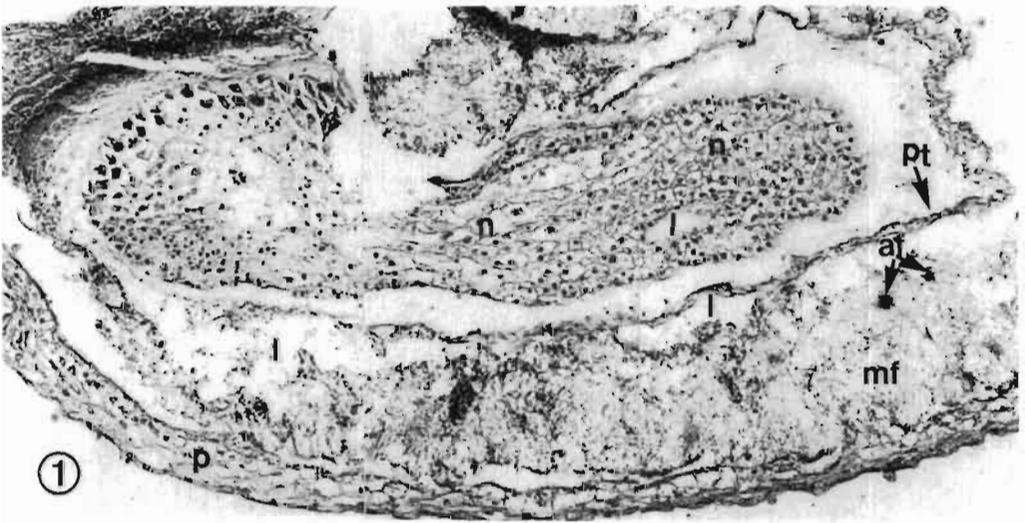


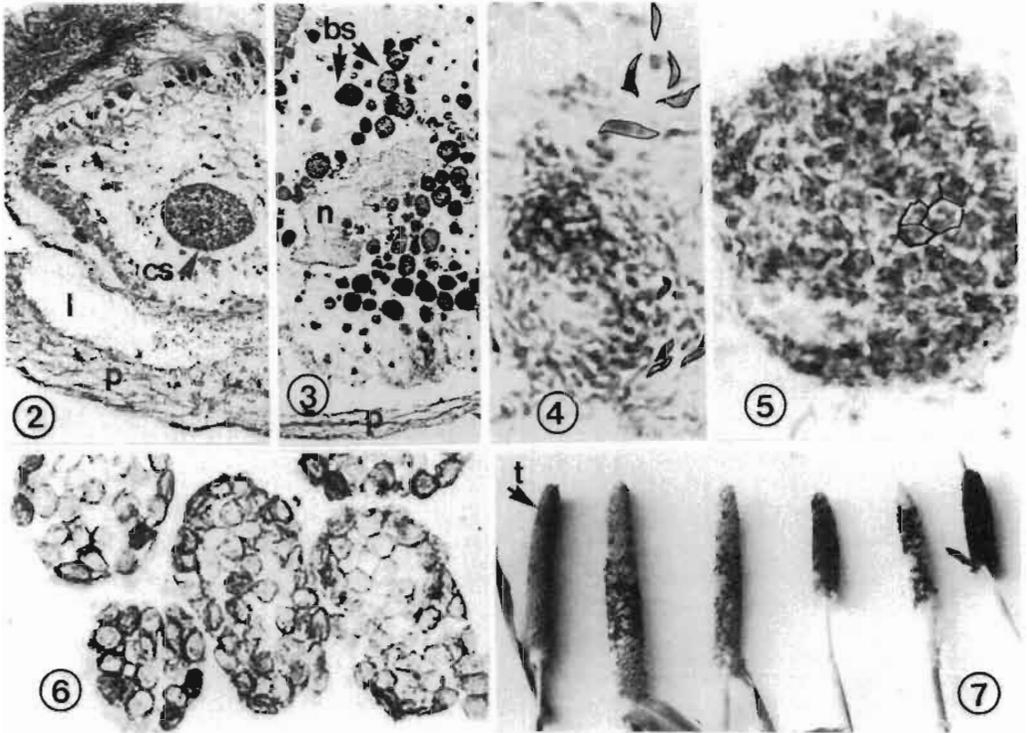
Photo 2. Coupe longitudinale du même matériel passant au niveau du sac embryonnaire, épaisseur coupe = 8μ ; G. = X 165.

Photo 3. Coupe longitudinale du sore au bout de 18 jours d'infestation, épaisseur coupe = 10μ ; G. = X 165

Photos 4, 5, 6. Différentes étapes de la formation de la balle de spore, dans un sore à 18 jours d'infestation, épaisseur coupe = 10μ , photos 4 et 5 = G. = X1580; photo 6 = G. = X 650.

n = nucelle; p = péricarpe; bs = balles de spores; l = lacunes; mf = masse fongique; cs = cellule sporogène; pt = paroi interne du tégument de l'ovule; af = amas fongiques, futures balles de spores.

Photo 7. Echantillons d'épis infestés par *Tolyposporium penicillariae* Bref.
= épi témoin, non infesté.



Sensibilité variétale à l'infestation

Toutes les variétés testées sont sensibles à des degrés divers (Tableaux en annexe 2). Neuf semblent être les plus sensibles au charbon avec une incidence pouvant atteindre 50 à 90 % de sévérité.

1-IP8699-3	:sévérité de 10 à 90% sur les 50 épis inoculés récoltés; sur 33 épis non traités, 25 sont atteints de 5 à 45%.
2-IP6147-4	:avec une sévérité de 10 à 90% sur 63 épis inoculés.
4-IVCP8204	:les 51 épis sont atteints de 3 à 50% de sévérité.
5-IVCP8004-2	:sur 54 épis, 52 avec 5 à 50% de sévérité.
6-Souna local	:avec 10 à 35% sur les 70 épis récoltés.
7-P2933-1	:les 57 épis inoculés sont atteints de 5 à 35%.
8-IBV8004	:avec une sévérité de 5 à 50% pour les 66 épis inoculés.
9-IBV8401	:5 à 45% de sévérité pour les 51 épis testés.

Sept autres variétés présentent des clones tolérants sinon résistants.

1-IP8830-1	:sur 23 épis testés 3 ne présentent aucun symptôme, et 20 sont attaqués avec 5 à 10% de sévérité.
2-MCB82	:sur 49 épis inoculés, 45 sont atteints de 5 à 35% et 4 sans symptôme.
3-NELC H79-4	:3 épis inoculés, sont atteints de 1 à 35%.
4-ICMP83506	:37 inoculés, 37 atteints de 1 à 35%.
5-Souna 3	:78 inoculés, 78 atteints de 1 à 50%.
6-P3281-1	:50 inoculés, 50 atteints de 1 à 20%.
7-7704	:43 inoculés, 40 atteints de 5 à 50%, 3 sans symptômes

Chez cinq variétés nous avons rencontré le plus grand nombre d'individus résistants à l'infection:

1-GAM 8501	:sur 70 épis inoculés, 10 sont sans symptôme.
2-P24	:sur 30 épis inoculés, 9 sans symptôme et 21 de 5 à 10% de sévérité.
3-P310-17	:sur 63 épis testés, 10 sans symptôme.
4-P1591	:sur 38 épis testés, 7 sans symptôme et 31 de 5 à 10%.
5-IBV8001	:sur 55 épis inoculés, 10 sans symptôme.

Sur les sept variétés laissées à l'infestation naturelle à cause de la fragilité des tiges, seules P455-2 et MC82081-2 ont présenté des individus avec des symptômes pouvant atteindre respectivement 35% et 20% de sévérité. Les tests de sensibilité faits avec les souches

monosporidiales isolées par dilutions-étalements nous ont donné des symptômes à sévérité variant de 1 à 35%. Avec celles obtenues par micromanipulation, la sévérité varie de 1 à 20%.

ACTIVITES ANTI-FONGIQUES D'EXTRAITS DE PHANEROGAMES

Action des extraits frais (tableaux en annexes 3, 4 et 5): Des 17 extraits, seul celui de *Allium sativum* possède une activité antifongique qui persiste même après 15 jours d'incubation.

Action des décoctés (tableau en annexe): Aucun décocté n'est actif sur *Tolyposporium penicillaria* Bref. ce qui prouve que le principe actif d'*A. sativum* est thermolabile.

DISCUSSION

Nos travaux sur le mode de pénétration du champignon chez l'hôte confirment dans une certaine mesure les résultats antérieurs. Seules les inoculations faites au niveau de la fleur ont donné des attaques significatives. Heim (1962), étudiant l'évolution nucléaire d'un certain nombre d'ustilaginées sur leurs hôtes, a conclu qu'au moment de la germination des spores, contrairement à ce qu'on observe en culture *in vitro*, tout le contenu de la spore est mis à nu par destruction des enveloppes. Après un court état de repos, le noyau de la spore subit plusieurs divisions suivies d'une condensation du cytoplasme autour de chaque noyau, on assiste ensuite à l'appariement des éléments qui s'entourent alors d'une membrane pour former les cellules binucléées pouvant générer un mycélium.

Chez *T. penicillariae* Bref., il semble que le mycélium produit lors des premiers stades de l'infestation ne persiste que pendant un temps assez court. Très tôt on observe dans les tissus de l'ovaire des éléments pouvant être des articles ou des sporidiés libres. D'abord effilés, ces corps se condensent au fur et à mesure qu'ils se regroupent en amas pour constituer les futures balles de spore où ils prennent une forme polyédrique (photos 4, 5 et 6). Pendant cette phase d'invasion, les tissus de l'hôte sont progressivement désorganisés, digérés et finissent par disparaître au profit du parasite (photos 1 et 3).

Les expériences en cours nous permettront dans un avenir proche de déterminer le rôle et le comportement probables du stigmate dans le phénomène d'infestation, et les mécanismes physiologiques mis en jeu lors de l'invasion de l'ovaire. Les ustilaginales sont reconnues comme étant le groupe présentant la plus grande variabilité morphogène de tous les champignons phytopathogènes selon Stakman et Christensen (1953), Holton, Hoffmann et Duran (1968) et Sambettakis (1978).

Cette variabilité morphogénétique s'exprime depuis l'aspect de la spore, les caractéristiques des cultures jusqu'à l'expression des symptômes chez l'hôte. Ces variations sont aussi bien d'ordre biologiques que physiologiques, d'après Holton, Hoffmann et Duran (1968); elles seraient l'expression d'une fluctuation de la pathogénicité, du degré de virulence ou de la spécialisation. Ces caractères contrôlés par les phénomènes sexuels déterminent aussi les processus d'inter ou intracompatibilité. Il en résulterait donc une spécialisation de la

pathogénicité, facteur prépondérant lors des interactions hôte-parasite (ou plante-microorganisme).

L'étude de la biologie de *T. penicillariae* Bref. mériterait d'être approfondie afin de déterminer les facteurs régissant la pathogénicité chez ce champignon. L'apparition de symptômes lors des tests de sensibilité effectués avec des souches monosporidiales, donc en principe haploïde, nous a paru quelque peu anormale, puisque seul un élément dicaryotique peut être infectieux chez les ustilaginales (Yen Wen Yu 1936, Wang 1943, Viennot-Bourgin 1949, Chadefaud 1960, Zambettakis 1977 et 1978).

Chez les variétés potentiellement sensibles, telles que IP8699-3, IP6147-4, Souna local, IBV8401, tous les épis ne présentent pas le même degré de sévérité. Certaines graines restent intactes malgré une attaque massive. Il serait intéressant pour la sélection variétale de déterminer le support de cette résistance. D'autre part la recherche d'extraits naturels de végétaux, à activité antifongique aideraient dans un premier temps à la lutte contre le charbon.

Annexe 1: Liste des variétés de mil utilisées

IP 70L-1	IVCP 8204	GAM 8501	P 455-2
IP 8830-1	IVCP 8004-2	Souna 3	P 2933-1
IP 8699-3	IVCP 8201	Tifton	P 1591
IP 6147-4	IVCP 78-2	Souna local	7704
IP 8695-1	NELC H72-4 (original)	P 3281-1	IBV 8001
MC B 82	NELC P 8203	P 24	IBV 8004
MC 82081-2	ICMP 83506	P 310-17	IBV 8401

Annexe 2: Tests de sensibilité variétale

Variétés testées	Témoins	Tests de sensibilité	
		% ≤ x ≤ %	
		Infestation artificielle	Infestation naturelle
IP-70L-1	1 ≤ 3 ≤ 10 (23)	5 ≤ 56 ≤ 50 (56)	1 ≤ 20 ≤ 35 (30)
IP8830-1	16 = 0 (16)	5 ≤ 20 ≤ 10 (23)	1 ≤ 4 ≤ 5 (27)
IP8699-3	5 ≤ 15 ≤ 35 (20)	10 ≤ 50 ≤ 90 (50)	5 ≤ 25 ≤ 75 (33)
IP6147-4	1 ≤ 10 ≤ 10 (24)	10 ≤ 63 ≤ 90 (63)	1 ≤ 10 ≤ 10 (38)
IP8695-1			1 ≤ 6 ≤ 5 (22)
MC B82	21 = 0 (21)	5 ≤ 45 ≤ 35 (49)	1 ≤ 11 ≤ 40 (26)

INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

Tableau 2

Tests de sensibilité
% ≤ X ≤ %

Variétés testées	Témoins	Infestation artificielle	Infestation naturelle
MC 82081-2			1 ≤ 6 ≤ 20 (13)
IVCP8204	20 = 0 (20)	5 ≤ 51 ≤ 50 (51)	1 ≤ 22 ≤ 10 (43)
IVCP8004-2	26 ≤ 1 (26)	5 ≤ 52 ≤ 50 (54)	1 ≤ 23 ≤ 20 (33)
IVCP8201			1 ≤ 20 ≤ 5 (58)
IVCP78-2			1 ≤ 4 ≤ 10 (20)
NELCH79-4 (original)	1 ≤ 5 ≤ 5 (15)	1 ≤ 30 ≤ 35 (30)	1 ≤ 10 ≤ 20 (30)

Tableau 3

Tests de sensibilité
% ≤ X ≤ %

Variétés testées	Témoins	Infestation artificielle	Infestation naturelle
NELCP8203			5 ≤ 1 (20)
ICMP83506	1 ≤ 5 ≤ 5 (15)	1 ≤ 37 ≤ 35 (37)	1 ≤ 10 ≤ 20 (17)
GAM8501	1 ≤ 3 ≤ 5 (20)	5 ≤ 60 ≤ 35 (70)	1 ≤ 14 ≤ 35 (30)
Souna 3	1 ≤ 13 ≤ 35 (25)	1 ≤ 78 ≤ 50 (78)	1 ≤ 32 ≤ 50 (40)
TIFTON			1 ≤ 12 ≤ 5 (45)
Souna local	1 ≤ 5 ≤ 10 (28)	10 ≤ 70 ≤ 35 (70)	1 ≤ 20 ≤ 20 (35)

Tableau 4

Tests de sensibilité
% ≤ X ≤ %

Variétés testées	Témoins	Infestation artificielle	Infestation naturelle
P3281-1	20 = 0 (20)	1 ≤ 50 ≤ 20 (50)	1 ≤ 8 ≤ 10 (25)
P24	20 = 0 (20)	5 ≤ 21 ≤ 10 (30)	8 = 1 (28)
P310-17	20 = 0 (21)	5 ≤ 53 ≤ 35 (63)	1 ≤ 5 ≤ 10 (26)
P455-2			1 ≤ 18 ≤ 35 (25)
P2933-1	1 ≤ 2 ≤ 5 (20)	5 ≤ 57 ≤ 35 (57)	1 ≤ 10 ≤ 10 (27)

Tableau 5

Tests de sensibilité
% ≤ X ≤ %

Variétés testées	Témoins	Infestation artificielle	Infestation naturelle
7704	1 ≤ 5 ≤ 5 (23)	5 ≤ 40 ≤ 50 (43)	1 ≤ 16 ≤ 20 (36)
IBV8001	1 ≤ 5 ≤ 20 (23)	5 ≤ 45 ≤ 35 (55)	1 ≤ 13 ≤ 35 (39)
IBV8004	1 ≤ 8 ≤ 10 (22)	5 ≤ 66 ≤ 50 (66)	1 ≤ 17 ≤ 35 (38)
IBV8401	5 ≤ 4 ≤ 10 (25)	5 ≤ 51 ≤ 75 (51)	1 ≤ 20 ≤ 35 (35)

NB: Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre de lecture (individus récoltés).

Annexe 3. Liste de plantes ou organes de plantes testés sur *Tolyposporium penicillariae**

Allium cepa, Linn., Liliacées (Fr)
Allium sativum, Linn., Liliacées (Fr)
Argemone mexicana, Linn., Papavéracées (Tg. F.)
Borreria verticillata, Linn., G.F. Mey, Rubiacées (Tg.F.)
Carica papaya, Linn., Caricacées
Cassia alata, Linn., Césalpiniacées (F.)
Cassyta filiformis, Linn., Lauracées (Pl. E.)
Citrus medica, Linn., var Limon, Rutacées (Fr. Pr.)
Coccinia grandis, Linn., J.O. Voigt, Cucurbitacées (Tg.F.)
Detarium microcarpum Gett Perr., Césalpiniée (R)
Eclipta prostrata Linn., Composées (Tg. F.)
Lawsonia inermis, Linn., Lythracées (Tg. F.)
Momordica balsamina, Linn., Cucurbitacées (Tg. F.)
Moringa oleifera, Lam., Moringacées (F.)
Spathodea campanulata P. Beauv. Bignoniacées (Ec.)
Terminalia macroptera G. et Perr., Combrétacées (F.)
Vernonia colorata (Willd) Drake, Composées (F.)

* Fr = fruits, Tg. F. = tiges fouillées, F. = feuilles, Pl. E. = plante entière, Ec = écorce, R = racines, Fr. Pr. = pelures du fruit.

Annexe 4. Action des extraits sur *Tolyposporium penicillariae* Bref.

Tableau 1	Décocté (120°C)			Frais		
	48 h	8 j	15 j	48 h	8 j	15 j
<i>Momordica balsamifera</i>	±	-	-	-	-	-
<i>Cassia alata</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Spathodea campanulata</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Terminalia macroptera</i>	±	-	-	-	-	-
<i>Eclipta prostrata</i>	-	-	-	-	-	-

INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

Tableau 2	Décocté (120°C)			Frais		
	48 h	8 j	15 j	48 h	8 j	15 j
<i>Vermonia colorata</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Argémone mexicana</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Lawsonia inermis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Cassyta filiformis</i>	±	-	-	-	-	-
<i>Detarium microcarpum</i>	±	-	-	-	-	-

Tableau 3	Décocté (120°C)			Frais		
	48 h	8 j	15 j	48 h	8 j	15 j
<i>Coccinia grandis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Borreria verticillata</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Vermonia colorata</i> + <i>Argémone mexicana</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Allium sativum</i>	-	-	-	+++	+++	++
				+++	++	++
<i>Allium cepa</i>	-	-	-	±	-	-

Tableau 4	Décocté (120°C)			Frais		
	48 h	8 j	15 j	48 h	8 j	15 j
<i>Citrus medica</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Carica papaya</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Moringa oleifera</i>	-	-	-	-	-	-
Témoin (eau)	-	-	-	-	-	-

Annexe 5. Evaluation du seuil d'inhibition de l'extrait frais de *Allium sativum* Linn. sur *Tolyposporium penicillariae* Bref.

	0,05 g		0,1 g		0,5 g		1 g		2 g	
	Sp	Spd	Sp	Spd	Sp	Spd	Sp	Spd	Sp	Spd
48 h	-	St = 14	-	i = 14	-	32	-	34	-	40
8 j	+	-	±	St = ±	-	15	-	19	-	33
15 j	+	-	+	+	-	14	-	17	-	30

* Pour les différentes concentrations, les extraits ont été faits avec 5 ml d'eau distillée stérile. Sp = spores, Spd = sporidies, St = stase (=ralentissement de la croissance), i = inhibition (en mm).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Berhaut J. (1974, 1975, 1979). *Flore illustrée du Sénégal*. Tomes II, III, IV, VI ed. Clairafrique, Paris.
- Bhatt S.L. (1946). Studies in Ustilaginales I. The mode of infection of the Bajra plant (*Pennisetum typhoides* Stapf.) by the smut, *Tolyposporium penicillariae* Bref. *Journal of the Indian Botanical Society* 25: 163-186.
- Bouchot D. et Mallamaire A. (1965). *Les principales maladies des plantes cultivées au Sénégal*. Tome I. 283 pp.
- Chadefaud M. (1960). *Traité de Botanique Systématique Tome I: les végétaux non vasculaires. Cryptogamie*. 1018 pp.
- Heim P. (1962). Observations sur l'évolution nucléaire des ustilaginales. *Revue de Mycologie*. Tome XXVII. Fasc. 4-5. 177-198.
- Holton C.S., Hoffmann J.A. and Duran R. (1968). Variation in the smut fungi. *Annual Review of Phytopathology* 6: 213-242.
- Langeron M. et Vanbreuseghem (1952). *Précis de Mycologie, Mycologie générale, Mycologie humaine et animale - Techniques*, Masson et Cie. 703 pp.
- Stakman E.C. and Christensen J.J. (1953). Problems of variability in fungi. In: *Plant Diseases - The Yearbook of Agriculture*. pp. 35-62.
- Subba Rao K.V. and Thakur R.P. (1983). *Tolyposporium penicillariae*, the causal agent of pearl millet smut. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 81, 3. pp. 597-603.
- Thakur R.P. and Williams R.J. (1980). Pollination effects on pearl millet ergot. *Phytopathology* 70: 8-84.
- Thakur R.P., Subba Rao K.V. and Williams R.J. (1983). Effects of pollination on smut development in pearl millet. *Plant Pathology* 32: 141-144.
- Thakur R.P., Subba Rao K.V. and Williams R.J. (1986). Identification of stable resistance to smut in Pearl Millet. *Plant Disease* 70, 1. pp. 38-41.
- Viennot-Bourgin G. (1949). *Les champignons parasites des plantes cultivées*. Tome I et II. Masson et Cie. 1851 pp.
- Wang C.S. (1943). Studies on cytology of *Ustilago crameri*. *Phytopathology* 33: 1122-1133.
- Wells H.D., Wayne W., Hanna W.W. and Burton G.W. (1987). Effects of inoculation and pollination on smut development in Near-Isogenic Lines of Pearl Millet. *Phytopathology* 77, 2. pp. 293-296.
- Willingale J. and Mantle P.G. (1985). Stigma constriction in Pearl Millet, a factor influencing reproduction and disease. *Annals of Botany* 56: 109-115.
- Willingale J. and Mantle P.G. (1987). Stigmatic constriction in Pearl Millet following infection by *Claviceps fusiformis*. *Physiol. Molec. Plant. Path.* 30: 247-257.
- Yen Wen Yu (1936). Observations cytologiques sur la sexualité et le développement de *Tilletia tritici* (Bjerk). *Wint. C.R. Soc. Biol., Fr.* 121: 1304-1306.
- Zambettakis Ch. et Joly P. (1973). Application de traitements numériques à la systématique des Ustilaginales. II le genre *Tolyposporium*. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* Tome LXXXIX 1, 83-97.
- Zambettakis Ch. (1977-1978). La sexualité chez les Ustilaginales. *Revue de Mycologie* Tomes 41 et 42.

**GESTION DES CONTRAINTES PHYTOSANITAIRES
DES CULTURES TROPICALES: INTERET ET NECESSITE
D'UNE APPROCHE SYSTEMIQUE**

Serge SAVARY

ORSTOM, Institut Français de Recherche Scientifique
pour le Développement en Coopération
IRRI - Division of Plant Pathology
P.O. Box 933, 1099 Manila, Philippines

***Résumé:** La complexité des interactions hôte-ravageur est telle qu'une démarche réductionniste n'est pas envisageable dès lors que l'on s'adresse à la gestion des populations de ravageurs. Parce que toute gestion des populations de ravageurs (sensu lato) implique (a) une analyse des pertes de récolte et (b) l'identification de seuils, les concepts de perte de récolte et de seuil peuvent servir de support pour une réflexion sur les démarches envisageables. L'analyse des systèmes, en tant que démarche scientifique, est, le plus souvent exclusivement assimilée au développement de modèles mathématiques de simulation plus ou moins complexes, faisant intervenir un nombre plus ou moins grand d'hypothèses. En ce qui concerne la protection des cultures, cette conception est erronée - voire dangereuse. Deux grands types de démarches sont envisageables. L'un est fondée sur l'analyse statistique d'un ensemble de données représentant le fonctionnement du système considéré (approche diachronique: enquêtes, bases de données), et l'autre sur la réalisation d'une série d'expériences dont les résultats sont rassemblés dans un modèle déterministe (approche expérimentale, et modélisation). La première des deux démarches permet (1) de hiérarchiser les éléments principaux du système considéré, (2) de prendre en considération la diversité des situations de production et (3) de définir les limites du système qui pourra faire l'objet d'une modélisation. La seconde apporte les éléments constitutifs de modèles de simulation: des hypothèses testées expérimentalement, et donc une compréhension des mécanismes en cause. Ces deux approches sont donc complémentaires. Elles sont illustrées dans le cas de ceux cultures tropicales: l'arachide en Afrique de l'Ouest et le riz irrigué aux Philippines.*

***Abstract:** Host-pest interactions are too complex to enable a reductionist approach to be applied when pest management issues are being considered. This is due to the fact that controlling pest populations (lato sensus) implies: a) an analysis of crop losses, and b) an identification of thresholds. These two elements can serve as the basis for a system design. Systems analysis as a scientific approach is usually equated to the development of more or less complex mathematical simulation models, and entail a rather large number of hypotheses. When applied to crop protection problems, this perception is not only wrong, but may even be dangerous. Two types of procedures should be considered: one is based on the statistical analysis of a set of data that reflect the way the system under study functions (diachronic approach, surveys, data bases) and the other is based on a series of experiments compiled in a deterministic model (experimental approach, modelling). The first of the two can be used: 1) to rank the main elements in the system being studied; 2) to accommodate the variation in production situations and 3) to define the limits to the system that may be modelled. The second type of procedure provides the components of the simulation models, viz. experimentally tested hypotheses, and thus provides an understanding of the mechanisms involved. These two approaches are thus complementary, and are illustrated through their application to two tropical crops: groundnuts in West Africa and irrigated rice in the Philippines.*

LA CULTURE ET SES CONTRAINTES EN TANT QUE SYSTEME

La productivité d'une culture dépend d'un ensemble de facteurs extrêmement divers, que l'on peut désigner par l'expression: 'situation de production'. Une situation de production est représentée par l'ensemble des facteurs climatiques, biotiques, abiotiques, sociaux et économiques qui affectent la productivité agricole (de Wit 1982). En pratique, les recherches en protection des cultures se concentrent essentiellement sur deux aspects de la production agricole: d'une part, la culture proprement dite, c'est-à-dire son développement, sa croissance dans le temps, et le processus d'élaboration du rendement qui leur est associé, et d'autre part, les contraintes phytosanitaires, au travers de leur diversité, et de leurs dynamiques au cours de la période culturale.

L'étude des relations entre culture et contraintes phytosanitaires, c'est-à-dire des interactions entre populations de plantes et populations de ravageurs (*sensu lato*) implique nécessairement la prise en compte d'une série extrêmement diverse d'éléments, et de leurs interactions, au cours du cycle cultural. La mise en oeuvre de techniques relevant de l'analyse des systèmes est donc particulièrement appropriée pour ce type d'étude.

Cette présentation se focalise sur l'un des produits du fonctionnement du système culture-contrainte phytosanitaire: le rendement et ses variations. En effet, il faut considérer les variations de rendement induites par les contraintes phytosanitaires comme le résultat d'une interaction entre culture et contraintes tout au long du cycle cultural. Au cours de cette présentation, les contraintes phytosanitaires seront essentiellement, mais non exclusivement, représentées par des champignons phytopathogènes.

LES APPROCHES ENVISAGEABLES

Une approche systémique, c'est-à-dire une démarche prenant en compte le système considéré dans sa globalité, comporte différentes facettes. S'agissant de mettre en évidence quelques-unes des grandes caractéristiques des variations du rendement, et d'illustrer l'effet des situations de production en relation avec un petit nombre de composants du système considéré, une approche expérimentale en plein champ est envisageable.

En revanche, une approche diachronique, prenant en considération une grande diversité de situations de production, au cours de plusieurs périodes culturales, permet d'envisager l'analyse d'un nombre beaucoup plus important de constituants du système. Une telle démarche peut être envisagée à partir de données d'enquêtes, ou à partir d'une base de données structurée en une série d'expériences élémentaires.

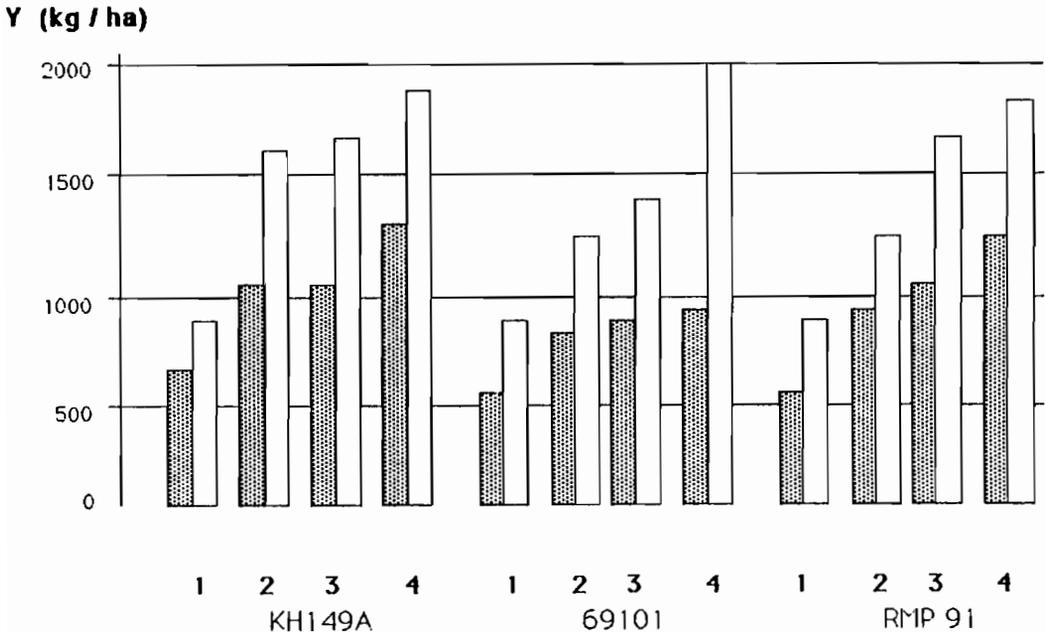
Enfin, l'élaboration de modèles de simulation peut être envisagée. De tels modèles sont fondés sur une connaissance approfondie, quantitative, des mécanismes impliqués dans le fonctionnement du système considéré.

Il s'agit, en pratique, d'une série d'hypothèses sur le fonctionnement du système, représenté par une architecture (un programme informatique), dans laquelle un ensemble de données expérimentales sont introduites.

APPROCHE EXPERIMENTALE

Les maladies fongiques de l'arachide constituent, en Afrique de l'Ouest, des composants majeurs du système de contraintes phytosanitaires de la culture (Savary 1991). Un essai préliminaire (Figure 1) permet de visualiser les relations entre situation de production et deux maladies, la rouille et la cercosporiose. Au cours de l'essai, différentes situations de production sont obtenues en introduisant successivement divers facteurs d'intensification dans un témoin: (1) un contrôle des mauvaises herbes (2), un accroissement de la densité de semis (3), et un apport d'engrais (4). Les deux maladies sont par ailleurs contrôlées à l'aide d'un fongicide de contact dans la moitié des parcelles (rectangles blancs), afin de mesurer les variations de rendement par rapport aux parcelles exposées au développement spontané des maladies (rectangles hachurés). L'expérience est conduite sur trois variétés d'arachide différentes. Les résultats montrent deux points importants: d'une part, des pertes de récoltes importantes quelque soit la variété et le niveau de production, et d'autre part, un accroissement des pertes de récoltes avec le niveau de production. En d'autres termes, les pertes dues aux deux maladies augmentent lorsque l'on améliore la situation de production. L'analyse de variance des rendements démontre par ailleurs que l'interaction entre situation de production et la présence de maladies est significative.

Figure 1



Une seconde expérience, beaucoup plus détaillée, est alors mise en place. Au cours de cette expérience, les deux types de maladies - rouille et cercosporioses - sont séparément manipulées par le biais d'infections artificielles et de traitement fongicides spécifiques. Ainsi, quatre types de parcelles sont obtenues, représentant quatre 'traitements maladies': sans maladies, infectée par la rouille, infectée par les cercosporioses, et infectée par les deux maladies.

A ce dispositif élémentaire, deux autres types de traitements sont superposés: le rendement potentiel des variétés (représentés) par trois variétés de cycle identiques, mais de productivités différentes), et le contrôle des mauvaises herbes (représentés par trois niveaux). Ces deux traitements superposés représentent donc une variation de la situation de production, parce qu'elles modifient la productivité de la culture indépendamment de la présence de maladies. Ce dispositif expérimental en bandes divisées superposées (Gomez et Gomez 1984, Johnson *et al.* 1986) permet de tester un ensemble d'interactions, et notamment de distinguer les effets des deux types de maladies.

L'analyse de variance des rendements met en évidence une série d'effets principaux et d'interactions significatives. Parmi ces dernières, deux ont une importance particulière: l'interaction simple rouille*enherbement, et l'interaction double rouille*enherbement*variété.

Ces deux interactions indiquent que les pertes de rendement dues à la rouille augmentent, respectivement, avec le contrôle des mauvaises herbes, et avec l'accroissement du rendement potentiel des variétés en combinaison avec un contrôle des mauvaises herbes accru. En d'autres termes, les pertes de rendement dues à la rouille augmentent lorsque la situation de production de la culture est améliorée. Il n'en est pas de même pour la cercosporiose, maladie pour laquelle aucune interaction significative est identifiée.

Ces deux expériences illustrent un phénomène bien connu - mais pourtant rarement décrit expérimentalement - en agronomie tropicale: l'accroissement du risque associé aux contraintes phytosanitaires lorsque le niveau d'intensification - représenté par la situation de production - s'accroît. Dans le cas des maladies fongiques de l'arachide, il semble que ce risque soit particulièrement associé à la rouille.

QUELQUES CONCEPTS

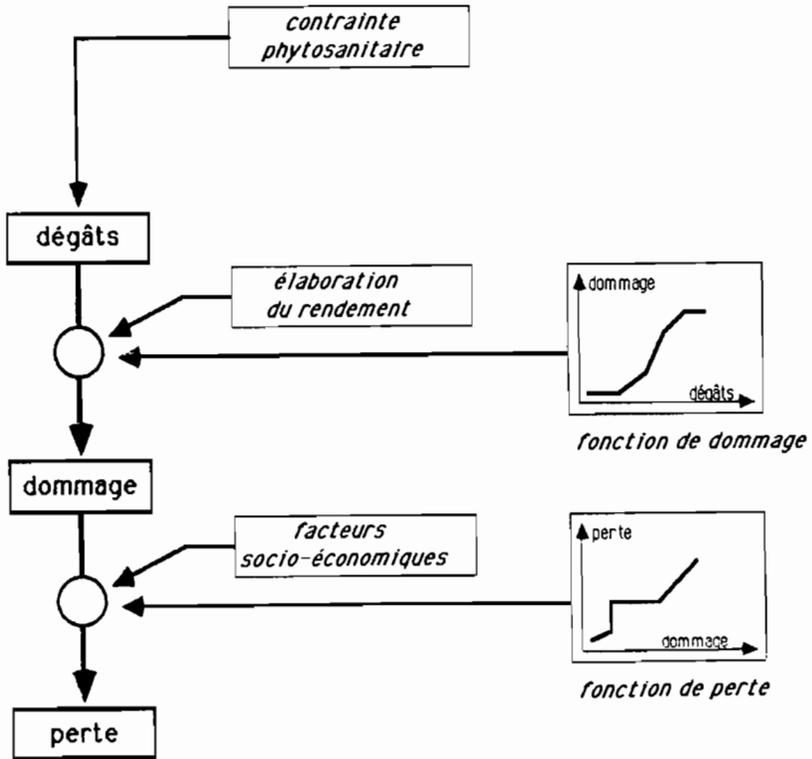
Il est sans doute utile, à ce point de revenir sur quelques concepts, illustrés dans la figure 2. Un dommage, c'est-à-dire une perte de récolte peut être défini comme le résultat d'une interaction dynamique entre, d'une part, les processus d'élaboration du rendement, et d'autre part, la cinétique d'une contrainte phytosanitaire. La figure 2 indique, de manière très simplifiée, quelles sont les relations entre dégât, dommage, et perte (Savary 1991). La présence d'une contrainte phytosanitaire dans une culture, par exemple une maladie, se traduit par un ensemble de signes, visibles, mesurables, que l'on peut désigner globalement par le terme dégât.

Ces signes visibles, de même que d'autres, parfois non mesurables, affectent le processus d'élaboration du rendement, et se traduisent par un dommage, c'est à dire une perte de

récolte. La fonction qui relie dommage et dégât est appelée la fonction de dommage. A son tour le dommage, en combinaison avec un ensemble de facteurs socio-économiques, se traduit par une perte économique.

Figure 2

**Diagramme relationnel entre les concepts:
dégâts, dommage, et perte**



La recherche en protection des cultures se focalise très rarement sur la fonction de perte, notamment en raison de l'extrême complexité des facteurs socio-économiques impliqués, spécialement en ce qui concerne les cultures vivrières tropicales. La fonction de dommage est, comme nous l'avons vu, fonction de la situation de production. Les différentes situations de production peuvent être représentées de manière quantitatives par leurs rendements accessibles respectifs (Zadoks et Schein 1979), c'est-à-dire, par les rendements obtenus en l'absence des contraintes phytosanitaires.

Pour un couple culture-contrainte phytosanitaire, il n'y a donc pas une fonction, mais une famille de fonctions de dommage. Par ailleurs, la fonction de dommage associée à une contrainte donnée risque fort d'être profondément modifiée par la présence d'une autre contrainte phytosanitaire.

De fait, il est assez rare qu'une culture soit, au cours de son cycle, exposée à une seule contrainte phytosanitaire. Si nous désirons être réaliste, il faut prendre en considération un ensemble de contraintes, ainsi qu'une certaine diversité des situations de production, afin de pouvoir envisager les variations de la fonction de dommage. Pour ce faire, une démarche diachronique doit être envisagée.

APPROCHE DIACHRONIQUE

Une enquête sur les contraintes phytosanitaires du riz aux Philippines

L'IRRI a conduit, de 1987 à 1989 une enquête sur les contraintes phytosanitaires du riz dans l'île de Luzon, aux Philippines (Elazequi *et al.* 1990). Les données rassemblées constituent vraisemblablement l'information la plus détaillée jamais recueillie sur les contraintes d'une culture vivrière tropicale. Ce jeu de données, qui couvre quatre cycles culturaux successifs dans 90 champs différents, comprend plusieurs volets. Chaque champ, au cours de chaque cycle cultural, est considéré comme un individu unique, représenté par un ensemble de pratiques culturales: la variété de riz, la date de repiquage, le mode de fertilisation, le contrôle de l'approvisionnement en eau, la fréquence et la nature des traitements pesticides, le mode de contrôle de l'enherbement, notamment. A ce volet, qui représente la situation de production - hormis les contraintes phytosanitaires - s'ajoutent trois autres, représentés par des données séquentielles acquises lors de trois visites successives dans chaque champ, concernant les insectes ravageurs, les maladies, et les mauvaises herbes. Enfin, des estimations de rendement sont, bien entendu, disponibles pour chaque culture dans chaque champ.

Ce jeu de données comporte donc à la fois des variables temporelles (par exemple l'intensité de pourriture des gaines lors d'une visite), et des variables indépendantes du temps (par exemple, la quantité d'engrais apportée); il comporte également des variables ordinales, ou qualitatives (comme la variété), et des variables cardinales, c'est-à-dire quantitatives (comme le rendement). Son analyse a été effectuée au cours d'étapes successives, avec pour objectif de définir des types de pratiques culturales, et des profils de contraintes phytosanitaires, et mettre en évidence d'éventuelles associations entre eux, ainsi qu'avec les niveaux de rendement.

Au cours d'une première étape, chaque série de variables liées au temps (observations successives dans les champs) a été remplacée par une nouvelle variable intégrant ces variations au cours du cycle cultural. Ensuite, pour chaque variable cardinale (quantitative), des classes successives ont été définies, et chacune de ces variables a été remplacée par une nouvelle variable codée selon ces classes. Ainsi, pour le rendement, la gamme de rendements observée, de 0,8 t/ha à 7 t/ha, a été remplacée par six classes successives, représentant un rendement très faible à très élevé.

A l'issue de ces deux premières étapes, on dispose alors d'un ensemble de variables qui sont indépendantes du temps, et qui sont ordinales, soit parce qu'elles sont purement qualitatives, soit parce qu'elle représente une caractéristique quantitative codée en classes de valeurs croissantes. Des groupes de champs ont ensuite été définis, en utilisant deux types de critères: les pratiques culturales, d'une part, et les contraintes phytosanitaires (mauvaises herbes, maladies, insectes ravageurs) d'autre part. Deux classifications ont donc été effectuées, de manière indépendante, sur la base de deux familles de critères différents.

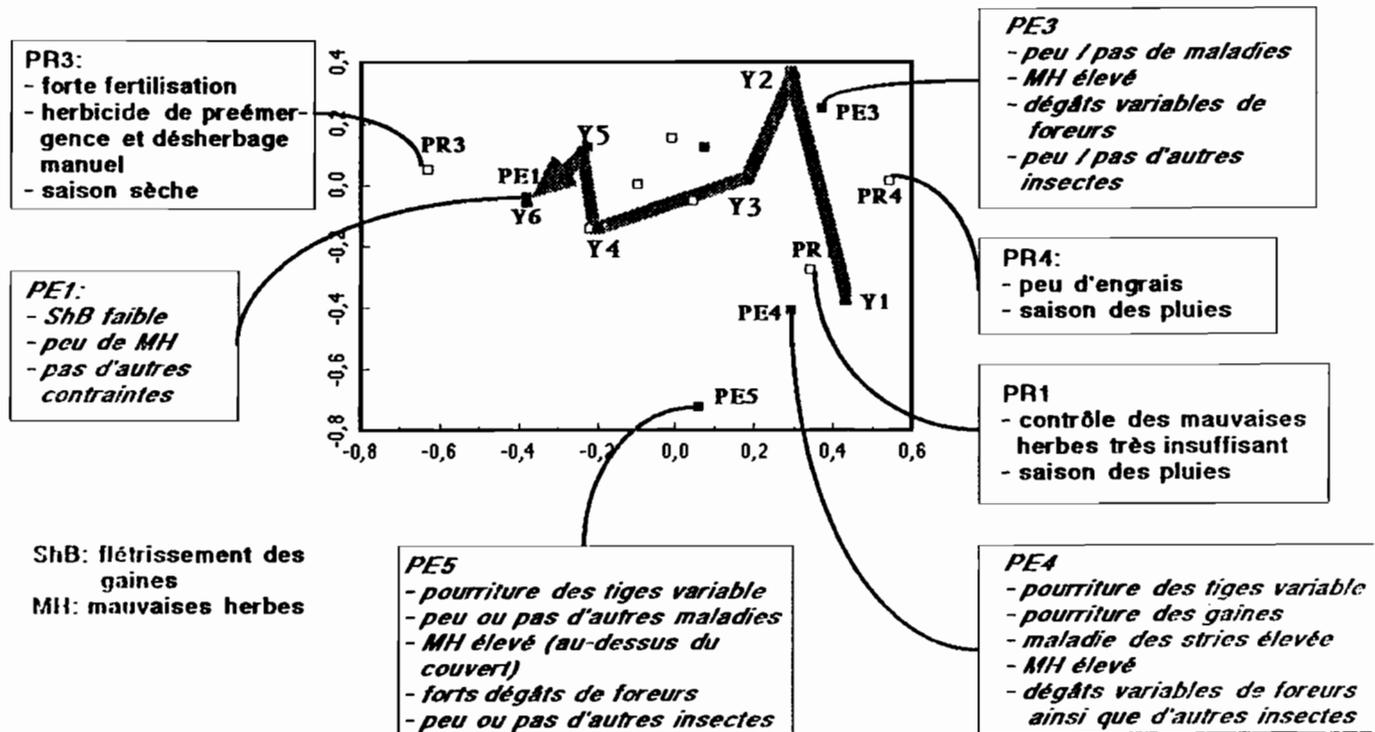
L'étape finale de l'analyse consiste à considérer les résultats de ces deux classifications et à les relier aux variations du rendement. Ces deux classifications, en effet, aboutissent à des regroupements que l'on peut décrire comme des types de pratiques culturales, et comme des profils de contraintes phytosanitaires - la question étant de savoir s'il existe une relation entre pratiques culturales et profils de contraintes, et comment les unes et les autres sont associées au rendement. Ces associations peuvent être visualisées grâce à des analyses factorielles des correspondances, et testées par des tests de chi-deux.

La figure 3 montre les relations indiquées par une analyse factorielle des correspondances entre pratiques culturales, profils de contraintes phytosanitaires et rendement. De ce graphe, naturellement complexe, quelques faits saillants émergent. Ce graphe représente les positions des variables selon les deux premiers axes, qui rendent compte ensemble d'environ 80% de l'inertie totale. Les deux classifications de champs, soit en fonction des pratiques culturales, soit en fonction des profils de contraintes, y sont représentées. Les classes successives de rendement ont été reliées entre elles, de manière à obtenir un itinéraire de rendements croissants, positionné par rapport aux différents types de champs. Différentes associations sont indiquées, comme, par exemple les rendements très élevés (Y6) avec le type de pratique culturale PR3: forte fertilisation, bon contrôle de l'enherbement, et saison sèche. Cette association s'oppose à celle liant les rendements très faibles (Y1) et PR1 (contrôle très insuffisant des mauvaises herbes, et saison des pluies).

Les rendements très faibles sont également associés à deux types de profils de contraintes, l'un et l'autre représentant une grande diversité d'agents (maladies, insectes, mauvaises herbes). Les rendements très élevés, en revanche, sont associés à l'absence de toute contrainte, à l'exception d'une seule, le flétrissement des gaines. Cette maladie est favorisée par des cultures denses, avec un apport de fumure azotée important. D'une manière très générale, cette analyse montre que la contrainte biotique principale est constituée par les mauvaises herbes, de mauvais résultats étant particulièrement aggravés par les insectes foreurs des tiges. Le cas du flétrissement des gaines est particulier; une interprétation possible, nécessitant des expériences de confirmation, est que cette maladie constitue la seule contrainte réelle du riz aux rendements accessibles élevés.

Figure 3

- ▲ Y : classes de rendements
- PR : types de pratiques culturales
- PE : types de profils de contraintes



Analyse d'une base de données sur les maladies de l'arachide

Six expériences élémentaires successives (figure 4) ont été réalisées, au cours d'une période d'environ deux années sur le dommage occasionné par les maladies foliaires de l'arachide. Cet ensemble d'expériences constitue une base de données comportant 90 individus représentés par des parcelles individuelles. Cette base de données doit, en premier lieu, couvrir la plus grande diversité possible de situations de production, représentatives de l'Afrique de l'Ouest. Les situations de production sont manipulées (a) en répétant les expériences, c'est-à-dire en modifiant les périodes de culture et les conditions de mise en place (axe horizontal), et (b) en incorporant une sélection de facteurs d'intensification, l'un d'entre eux étant assigné à chaque expérience, avec l'un des trois niveaux possibles de ce facteur représenté par l'un des blocs dans chaque expérience (axe vertical).

Le second objectif est d'obtenir une diversité de dégâts; les niveaux de dégâts occasionnés sont manipulés afin d'obtenir deux niveaux différents pour chacune des deux maladies. Ces niveaux sont établis grâce à des infections artificielles avec l'agent de la rouille ou de la cercosporiose tardive.

Dans chaque bloc, l'une des parcelles est une référence, protégée contre les deux maladies par une couverture continue avec un fongicide de contact. Ces parcelles de référence produisent un rendement accessible (Y_a), représentatif du bloc dans chaque expérience. La mesure de ce rendement accessible constitue donc la définition opérationnelle de la situation de production, c'est-à-dire, de chaque combinaison: bloc/expérience.

Une description sommaire de cette base de données peut être obtenue grâce à des regressions multiples pas à pas, dont voici un exemple:

$$Y = 143 + 0.96 Y_a - 9.70 Rl*Sl - 0.055 Y_a*Rl + 0.020 Y_a*Sl$$

($R^2 = 0.92$, 85 d.d.l.)

où Rl et Sl sont les logarithmes népériens des aires sous les courbes de progression des épidémies.

Cette équation indique que le rendement réel d'une parcelle (Y) peut être décrit comme une surface de réponse aux variations de la situation de production (Y_a), des dégâts causés par la rouille (Rl) et par la cercosporiose (Sl), et leurs interactions. Elle montre, en particulier, que les dégâts ont des effets moins qu'additifs sur la réduction de Y , c'est-à-dire, sur le dommage (terme Y_a*Sl positif), et, surtout, que l'effet des dégâts n'est pas indépendant de la situation de production (termes Y_a*Rl et Y_a*Sl).

Il est possible de revenir à l'information produite par la base de données au travers d'analyses factorielles des correspondances. La figure 5 en donne un exemple. Deux types de rendements peuvent être considérés: le rendement des cultures protégées (rendement accessible, Y_{ref}) ou non protégées (rendement réel, Y_p), et classés en catégories. Simultanément, deux situations parasitaires peuvent être envisagées: subissant les contraintes parasitaires ($D=1$), ou non ($D=0$).

Cette analyse indique que le rendement accessible, le rendement réel, et la présence de contraintes sont associés, en deux phases:

- dans une première phase (figure 5 b), le rendement réel augmente à mesure que le rendement accessible augmente;
- dans une seconde phase (figure 5 c), l'accroissement du rendement réel avec le rendement accessible dépend de la présence de maladies.

En d'autres termes, l'analyse met en évidence l'existence d'un seuil de rendement accessible; en deçà de ce seuil, des dommages ont lieu, mais n'affectent pas la progression du rendement; au-delà de ce seuil, les dommages sont d'importance suffisante pour que les rendements stagnent. Il existe donc une situation de production optimale, représentée par un rendement accessible de l'ordre de 1400 kg/ha, au-delà de laquelle les pertes de récolte seraient telle qu'une protection fongicide deviendrait indispensable.

MODELES DE SIMULATION

Couplage hôte-parasite: canevas général d'un modèle

La figure 6 indique l'organisation générale d'un modèle destiné à simuler les interactions entre une culture et une contrainte phytosanitaire. La structure du modèle comporte deux parties: la croissance et le développement de la culture, d'une part, et la dynamique de la contrainte, d'autre part. La croissance et le développement de la culture est représentée, très sommairement, par un certain nombre de variables d'état, telles que les photosynthétats assimilés, la biomasse des racines, ou la biomasse des organes de stockage - qui, au terme du cycle cultural, constituera le rendement de la culture. Ces variables d'états sont reliées par des flux de biomasse, contrôlés par des taux tels que le taux de photosynthèse, et par des coefficients de répartition. La dynamique de la contrainte phytosanitaire est représentée schématiquement par différents stades de développement rendant compte du cycle biologique de l'agent, reliés par des flux d'individus, passant d'un stade au stade suivant.

Fonctions de couplage

Enfin, les deux unités sont reliées par des coupleurs. Ces coupleurs, orientés soit dans le sens contrainte-culture, soit dans le sens culture-contrainte, représentent les interactions entre les deux populations. Dans le sens culture-contrainte, un élément de couplage essentiel est la croissance elle-même de la culture, puisque celle-ci définit la capacité de support du milieu pour l'agent responsable de la contrainte. Ainsi, la dynamique d'un parasite foliaire sera étroitement dépendant de la surface foliaire disponible pour son développement. Différents types de couplages dans le sens contrainte-culture peuvent être envisagés. Ces types peuvent être représentés par différentes fonctions de dommage: une réduction du peuplement végétal, une réduction du taux de photosynthèse, une accélération de la sénescence, une réduction de la lumière interceptée par les tissus en place, un détournement d'assimilats, la consommation et la destruction de tissus et une réduction de la turgescence des tissus (Boote *et al.* 1983).

Figure 4

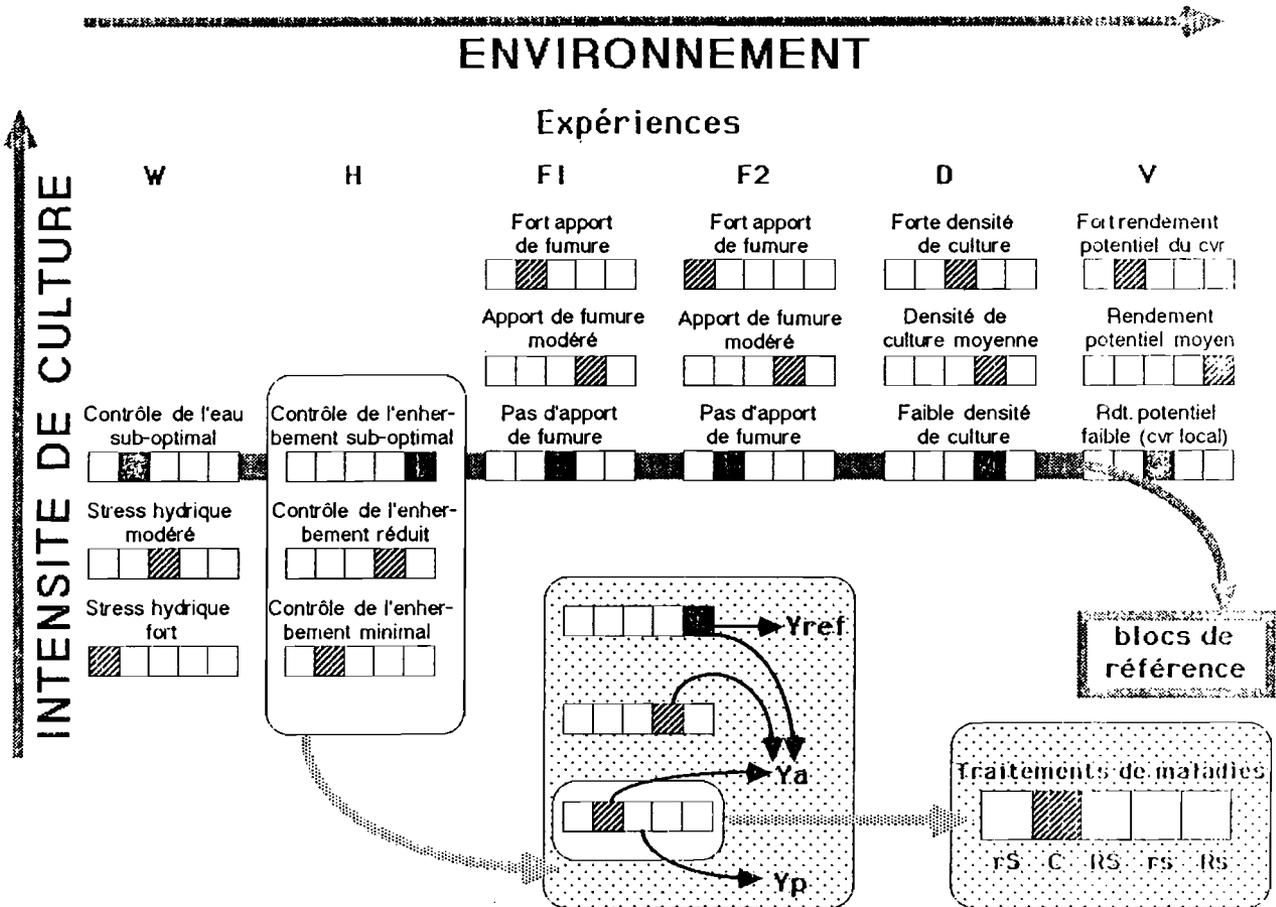


Figure 5

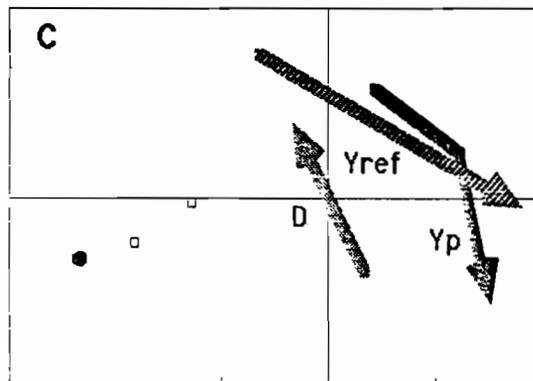
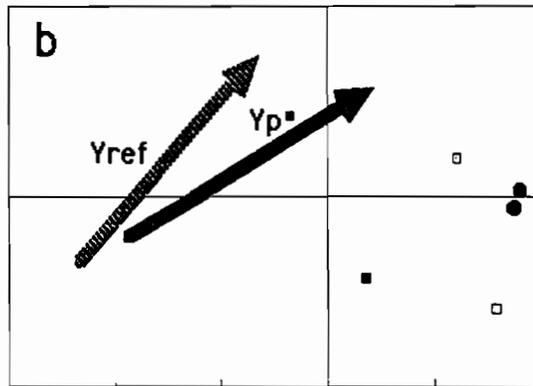
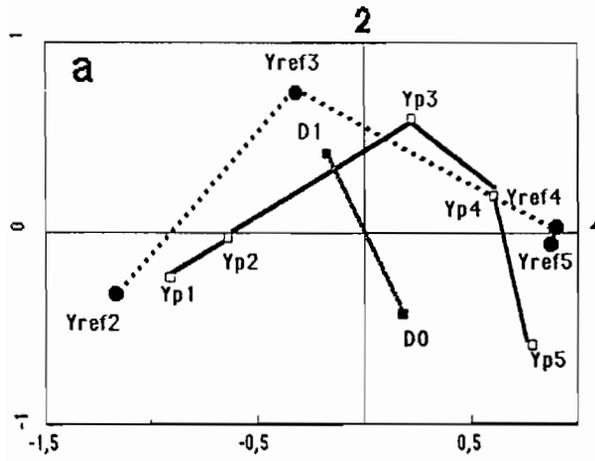
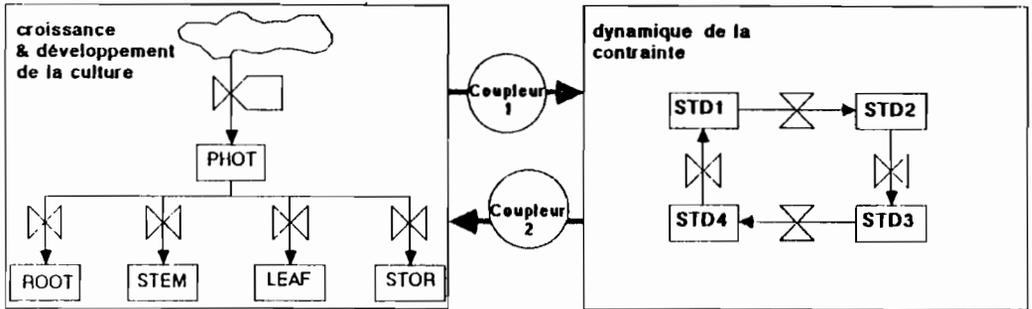


Figure 6



Un élément essentiel est qu'une contrainte phytosanitaire peut être associée à différentes fonctions de dommage. Ainsi par exemple, la cercosporiose de l'arachide provoque une réduction du taux de photosynthèse (probablement), une accélération de la sénescence des feuilles, et une réduction de la lumière interceptée par les feuilles en place. Par contre, un insecte foreur des tiges du riz provoque une réduction du peuplement végétal, consomme et détruit ses tissus, et réduit leur turgescence.

Modèles comportant plusieurs contraintes

Cette architecture peut être étendue à plusieurs contraintes prises en considération simultanément. La figure 7 montre l'organisation générale d'un modèle de ce type. Ce schéma met en évidence l'importance d'une structure modulaire de chacun des éléments du modèle, seule à même d'exploiter le caractère universel des fonctions de couplage.

Il permet également de souligner l'importance du modèle de culture, qui doit simuler quantitativement les processus physiologiques au niveau desquels ces fonctions de couplage interviennent. En d'autres termes, le modèle de la culture doit être suffisamment détaillé pour rendre compte des effets physiologiques des contraintes phytosanitaires, afin de pouvoir les traduire en pertes de rendement.

Architecture d'un modèle de simulation préliminaire du flétrissement des gaines du riz

Le flétrissement des gaines du riz est provoqué par un champignon (*Rhizoctonia solani* Kühn) qui possède la caractéristique de ne pas avoir de stade de développement véritablement clair - hormis la formation de sclérotés - au cours de son cycle biologique, qui est presque toujours végétatif. Le développement des épidémies est attribué à un inoculum d'origine tellurique,

représenté par du mycélium survivant sur des débris végétaux et par des sclérotés, puis à l'infection de jeunes plants de riz.

Ultérieurement, l'épidémie se développe essentiellement par contact entre tissus infectés et tissus sains. Deux types de tissus peuvent être considérés: les gaines, et les feuilles proprement dites.

L'infection peut se propager sur l'un et l'autre des deux supports, qui sont donc considérés séparément, et reliés entre eux par des fonction de contacts. Ce cas particulier de modèle doit permettre de tester si les épidémies de flétrissement des gaines sont effectivement gouvernées par la fréquence des contacts, dans le couvert végétal, entre tissus sains et tissus infectés. Il pourra ultérieurement être couplé à un modèle de croissance du riz.

Un modèle de simulation pour la rouille de l'arachide

La construction d'un modèle de simulation constitue une approche idéale pour rassembler les informations disponibles sur un système biologique complexe, et pour identifier les points qui nécessitent de futures expérimentations. Un tel modèle a été élaboré pour la rouille de l'arachide (Savary *et al.* 1990) à partir de données expérimentales. Ce modèle comporte les deux parties, évoquées précédemment, d'un modèle couplé: un sous-modèle de la croissance et du développement de la culture, et un sous-modèle de dynamique de la maladie.

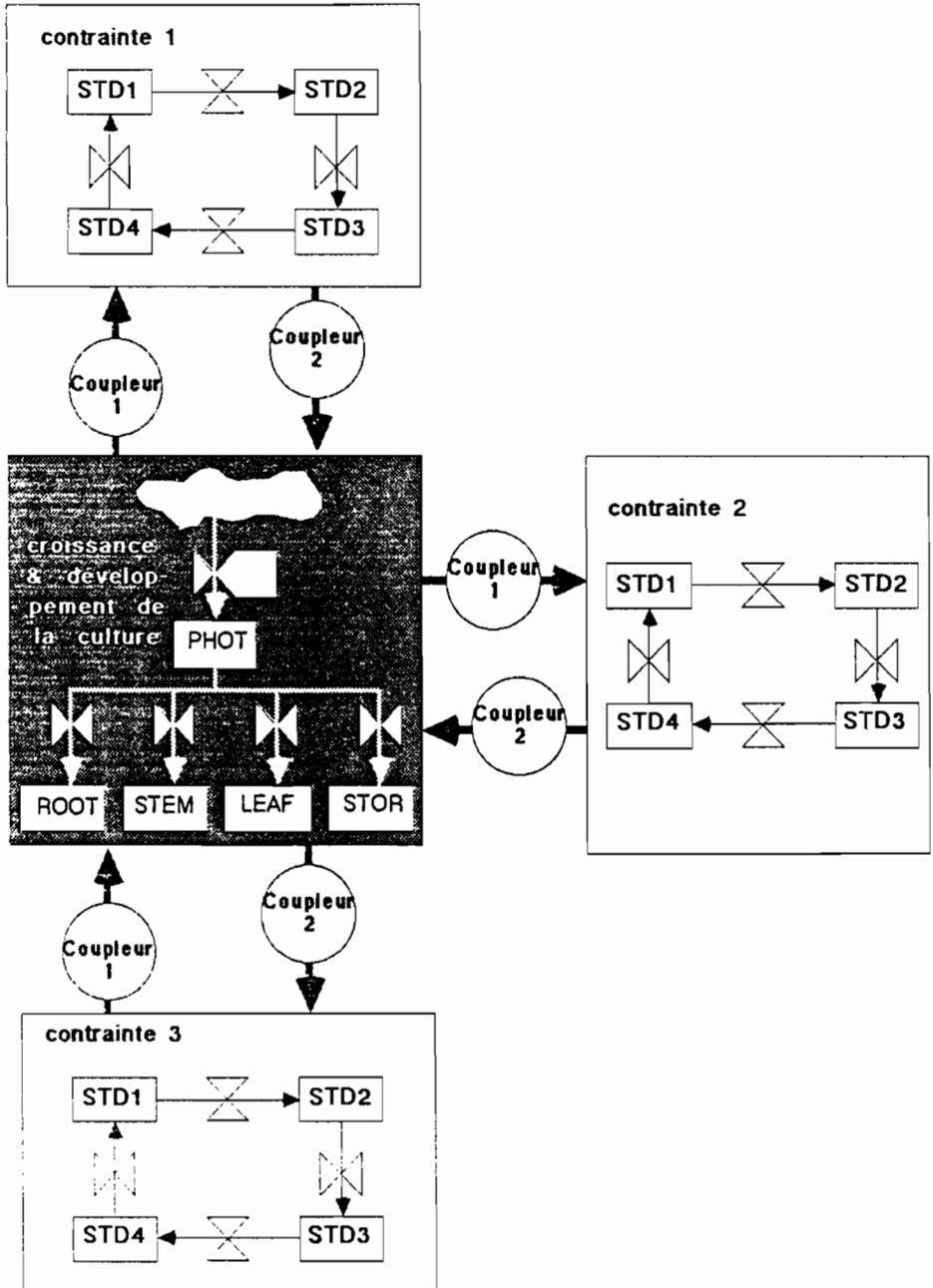
Le système considéré par ce modèle est constitué par 1 m² de culture d'arachide infectée par la rouille, entouré par un grand nombre de systèmes équivalents. Le pas de temps du modèle est de 1 jour: à la fin de chaque journée écoulée, l'ensemble des valeurs des variables considérées est réévalué en fonction des nouvelles valeurs des fonctions directrices (principalement climatiques) du modèle.

Le modèle de l'hôte est un modèle très simple, qui rend compte de la photosynthèse et de la transpiration en conditions optimales d'alimentation hydrique et minérale. Les hydrates de carbones libres sont alors répartis et fixés dans les différents organes: racines, tiges, feuilles, et gousses. Cette répartition est fonction du stade de développement de la culture.

Le modèle de maladie prend en considération plusieurs stades de développement des lésions de rouille; un site à la surface d'une feuille peut être libre, latent, infectieux (la lésion est toujours visible, mais elle ne produit plus de spores et ne participe plus à l'épidémie). La sporulation, à partir des lésions infectieuses, donne naissance à un flux de spores libérées, puis transportées, et déposées.

Différents facteurs régissant ces processus sont pris en compte dans le modèle. Le couplage entre les deux sous-modèles s'effectue dans les deux directions: maladie-culture et culture-maladie. La croissance du couvert, et l'accroissement de l'indice foliaire, est directement responsable des variations du substrat disponible pour le parasite (sens culture-maladie). De plus, le nombre de spores piégées par le couvert végétal est proportionnel à l'indice foliaire.

Figure 7



En sens inverse, la maladie affecte la culture de deux manières: la multiplication des lésions réduit la surface foliaire photosynthétisante, et la production de spores s'effectue directement aux dépens des hydrates de carbones non encore fixés. Ce second effet est sans doute très important: une culture d'arachide (LAI=4) infectée par la rouille avec une sévérité de 15% (environ $1.86 \cdot 10^6$ lésions.m²) produit 1 à 3 kg de spores par hectare et par jour, dans des conditions modérément favorables.

Ce modèle permet de tester et de tester diverses hypothèses concernant les composantes de résistance à la maladie et constitue donc un outil pour la sélection de variétés résistantes. Il permet également de comparer différents scénarios pouvant influencer le cours d'une épidémie, soit du fait de changements climatiques, soit du fait de la mise en œuvre de mesures de contrôle, notamment par un fongicide. Il peut donc être utilisé comme outil d'optimisation et d'évaluation. Naturellement, l'outil est imparfait. Plusieurs améliorations peuvent être envisagées (Savary *et al.* 1990), qui concernent essentiellement le modèle de la culture.

CONCLUSION

Les expressions 'démarche systémique' et 'analyse des systèmes' reprennent, sous des termes rénovés, des conceptions établies depuis longtemps: il est nécessaire d'avoir une connaissance globale d'un système avant de pouvoir le gérer. Souvent, l'analyse des systèmes est associée d'une manière exclusive à l'élaboration et à l'utilisation de modèles mathématiques. Il est vrai que ces modèles mathématiques constituent le moyen privilégié de rassembler des hypothèses, de les structurer, et de mesurer quantitativement leur signification dans le contexte du système considéré.

Il est vrai également que seuls ces modèles permettent d'explorer l'ensemble des interactions entre les différents composants du système, comme, ici, des relations plantes-parasites. L'élaboration de modèles mathématiques ne permet pas, cependant, d'appréhender la complexité et la diversité de certains systèmes, comme par exemple l'ensemble des contraintes phytosanitaires d'une culture vivrière tropicale. Cette perception-là, seule une enquête de terrain, structurée et dûment analysée, est capable de la fournir.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boote K.J., Jones J.W., Mishoe J.W. and Berger R.D. (1983). Coupling pests to crop growth simulator to predict yield reductions. *Phytopathology* 73: 1581-1587.
- De Wit C.T. et Penning de Vries F.W.T. (1982). L'analyse des systèmes de production primaires. In: *La Productivité des Pâturages Sahéliens*. F.W.T. Penning de Vries et M.A. Djiteye Eds. Agr. Res Rep. 918 Pudoc, Wageningen. pp. 275-283.
- Elazegui F.A., Soriano J., Bandong J., Estorninos L., Jonson I., Teng P.S., Shepard B.M., Litsinger J.A., Moody K. and Hibino H. (1990). Methodology used in the IRRRI integrated pest survey. In: *Crop Loss Assessment in Rice*. IRRRI, Los Baños, pp. 241-271.
- Gomez K.A. and Gomez A.A. (1984). *Statistical Procedures for Agricultural Research*. Second Edition. John Wiley and Sons, New York. 680 pp.

- Johnson K.B., Radcliffe E.B. and Teng P.S. (1986). Effects of interacting populations of *Alternaria solani*, *Verticillium dahliae* and the potato leafhopper (*Empoasca fabae*) on potato yield. *Phytopathology* 76: 1046-1052.
- Savary S., De Jong, Rabbinge R. and Zadoks J.C. (1990). Dynamic simulation of groundnut rust: a preliminary model. *Agricultural Systems* 32: 113-141.
- Savary S. (1991). *Approches de la Pathologie des Cultures Tropicales. L'exemple de l'Arachide en Afrique de l'Ouest*. Editions Karthala/ORSTOM, Paris. 288 pp.
- Zadoks J.C. and Schein R.D. (1979). *Epidemiology and Plant Disease Management*. Oxford University Press, New York. 427 pp.

STRATEGIES DE SELECTION ET DE LUTTE GENETIQUE CONTRE LES PHYTOPARASITES

Michel VALES
Institut des Savanes
BP 635 Bouaké, Côte d'Ivoire

Résumé: Dans le cadre de la lutte génétique c'est principalement sur la plante, du gène à la population, qu'il est possible d'intervenir sur les interactions hôte-parasite. Certaines des techniques qui permettent d'intervenir de plus en plus directement sur le génome de la plante débouchent sur des applications au champ. Cependant quelque soit la méthode d'obtention des caractères de résistance, ceux-ci correspondent à des effets qui peuvent être formalisés. Finalement les interactions plante-agent pathogène s'expriment en termes d'équilibre entre populations hôte et parasite. Cet équilibre, souhaité en faveur de la culture, peut être soit réalisé par des stratégies d'utilisation de résistances monogéniques, soit obtenu par l'usage d'une résistance directement durable. Le milieu, sol-climat, intervient sur les interactions, aussi son rôle doit être pris en compte lors des sélections notamment pour la stabilité de la résistance. Le milieu, système de culture-économie, intervient sur les interactions hôte-parasite par le choix des stratégies qu'il impose et le type d'équilibre entre populations qui en résulte.

Abstract: In the genetic control of plant diseases, host-parasite interactions can be manipulated by working on the plant, from the gene to the population. Certain techniques that make it possible to work more or less directly on the plant's genome have led to field applications. All the methods used to obtain resistance traits correspond to effects that can be formalized. Lastly, the plant-pathogen interactions are expressed in terms of equilibrium between the host populations and the parasite. This equilibrium, which hopefully favours the crop, is to be achieved through strategies that use monogenic resistance, or by the use of inherently durable resistance. The environment - soil and climate - has an effect on these interactions, so its role must be considered during selection work, especially in relation to the stability of resistance. The environment - cropping system and economy - has an effect on the host-parasite interactions by virtue of the strategies that it imposes and the resulting equilibrium between the populations.

Dans le cadre de la lutte génétique c'est principalement sur la plante, du gène à la population (Fig. 1), qu'il est possible d'intervenir sur les interactions hôte-parasite. Les caractères de résistance peuvent être manipulés par des techniques d'intervention de plus en plus directes sur le génome de la plante.

Cependant, l'objectif reste la réalisation d'un équilibre entre populations hôte et parasite en faveur de la culture, équilibre qui peut être réalisé par des stratégies d'utilisation des gènes de résistance ou l'obtention d'une résistance directement durable et stable. Le troisième acteur qui intervient dans les interactions hôte-parasite est le milieu. C'est un partenaire incontournable pour le passage aux applications.

INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

Figure 1. Interactions plante-parasite-milieu

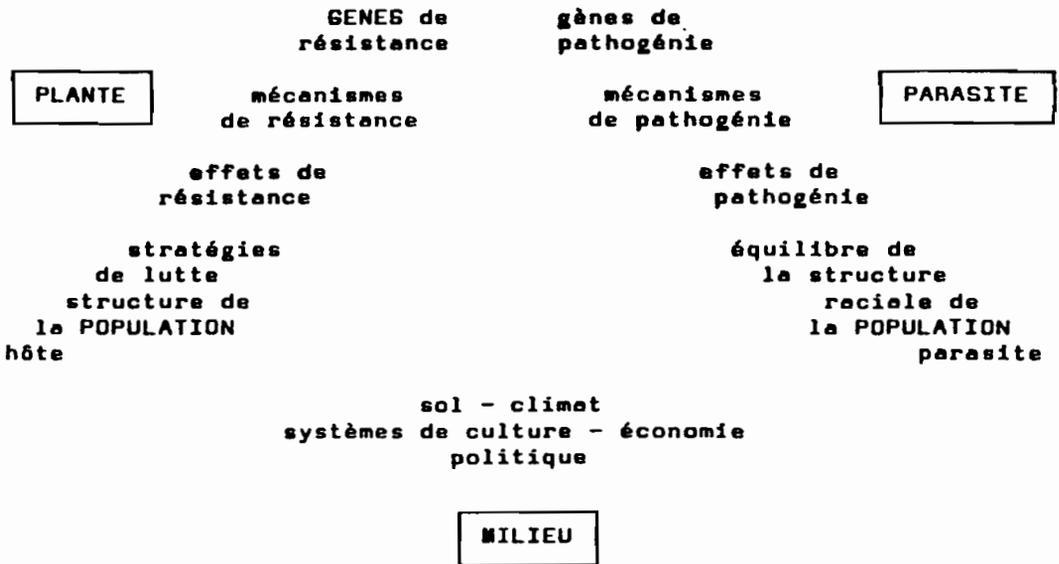
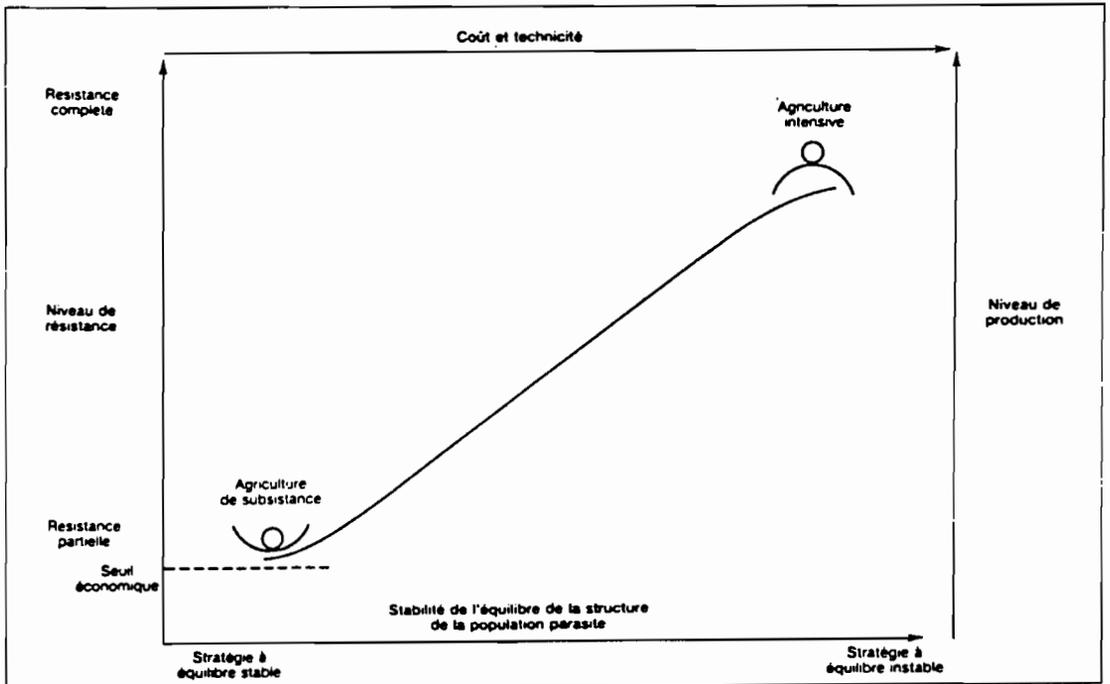


Figure 2. Représentation des relations actuelles entre: le niveau de la résistance réalisée au champ, la stabilité de l'équilibre de la structure (races) de la population parasite réalisée par la stratégie de lutte génétique; le coût et la technicité requis par cette stratégie; le type d'agriculture concerné (d'après Vales 1983)



DES NOUVELLES METHODES D'AMELIORATION DE LA RESISTANCE ET SES EFFETS: NOUVELLES METHODES D'AMELIORATION DE LA RESISTANCE OLIGOGENIQUE

Il est possible d'intervenir sur le génome, soit par des méthodes classiques d'hybridation, soit avec des méthodes plus directes. Ces méthodes de transfert ou d'acquisition de caractères de résistance sont suivies de méthodes de cribles classiques ou particulières qui privilégient les effets nets et faciles à transmettre. Il s'en suit que ces techniques s'intéressent en général à des résistances oligogéniques et qui confèrent le plus souvent une protection complète au parasite (Seilleur 1989).

La mutagénèse artificielle

La mutagénèse artificielle peut permettre de modifier un caractère défavorable d'une variété résistante et ainsi d'en permettre la vulgarisation. C'est ainsi qu'a pu être vulgarisée la variété de riz pluvial IRAT 13 mutant à paille plus courte de la variété 63-83 résistante à la pyriculariose. A l'opposé la mutagénèse artificielle peut permettre de doter une variété intéressante de la résistance qui lui manque. Ainsi la variété de riz Fulgente est un mutant résistant à la pyriculariose de la variété Maratelli très sensible à cette maladie. Les deux variétés clonales de menthe, Todd's Mitcham et Murray Mitcham, résistantes à *Verticillium dahliae* ont été obtenues à partir de rhizomes de variétés sensibles traités aux neutrons rapides (Seilleur 1989).

Des résistances à diverses maladies ont été obtenues par mutations artificielles chez bien d'autres espèces cultivées, orge, avoine, blé, millet, canne à sucre, soja, haricot, pomme de terre, moutarde, jute, pommier, etc... En général, il s'agit de résistance à effet très net facile à sélectionner. Cependant il existe quelques exemples d'obtention de résistance partielle, comme celle du froment à *Erysiphe graminis* (Seilleur 1989).

Les variants somaclonaux par culture in vitro

La rupture des régulations par culture *in vitro* de tissus dédifférenciés, d'amas cellulaires ou de cellules peut aboutir à des plantes régénérées de même génome mais fonctionnant différemment. Ce sont des variants somaclonaux (Nozeran 1978). Depuis 1967 des variants somaclonaux de canne à sucre plus résistants au virus de la maladie de Fiji et à *Helminthosporium sacchari* ont été sélectionnés et utilisés en production. La culture de protoplastes de pomme de terre a permis d'obtenir des variants à résistance améliorée vis-à-vis de *Phytophthora infestans*, d'*Alternaria solani*, de *Streptomyces scabies*, du virus Y (PYV) et du virus de l'enroulement (PLRV) (Seilleur 1989).

Les haploïdes doublés

Après croisement, la réalisation d'haploïdes doublés permet de fixer rapidement les lignées, par exemple chez le riz (Courtois 1988). Ceci constitue un outil d'analyse génétique très

intéressant. Mais cette technique ne permet pas d'obtenir des variétés plus rapidement. En effet, il reste à sélectionner, évaluer et multiplier le matériel végétal fixé, par exemple pour l'orge (Seilleur 1989). Ces phases sont habituellement réalisées en même temps que la fixation.

L'intérêt de la réalisation d'haploïdes doublés réside dans la limitation du retour vers les types parentaux lors des croisements entre plantes distantes génétiquement. Ainsi, parmi les haploïdes doublés issus de croisements entre riz des groupes *japonica*, résistant à de nombreuses maladies, et *indica*, intéressant notamment pour leur type de grains longs, il subsiste un grand nombre de recombinants. Ceci malgré un retour vers le type *japonica*, comparable à celui observé dans les F2 des mêmes croisements. Ces recombinants sont identifiables par électrophorèse (Guiderdoni *et al.* 1989). Des plantes haploïdes androgénétiques d'orge sont utilisées en Allemagne pour l'incorporation du gène de résistance au virus de la mosaïque jaune (BYMV) (Seilleur 1989).

La fusion de protoplastes

La fusion de protoplastes permet d'éviter les barrières d'incompatibilité sexuelle, et permet de conserver le contenu cytoplasmique, les génomes plasmagènes, des deux parents. La fusion de protoplastes de *Solanum tuberosum*, (4 n) hypersensible à la race 0 et sensible à la race 4 de *Phytophthora infestans*, et de *Solanum brevidens*, (2 n) sensible à la race 0 et à la race 4 et résistante au virus de l'enroulement (PLRV), a permis l'obtention d'hybrides dont la plupart étaient résistants au PLRV et aussi résistants que le partenaire *S. tuberosum* à *P. infestans* (Seilleur 1989). La régénération de plantes après fusion de protoplastes plus difficile pour les céréales est devenue possible pour le riz (Coulibaly et Demarly 1986, 1989, Abdullah *et al.* 1986, Toriyama *et al.* 1986) et pour le maïs (Cai *et al.* 1987).

Les plantes transgéniques

Les protéines synthétisées en réponse à une agression parasite ou à un éliciteur sont souvent de petit poids moléculaire (Rouxel 1989), comme celles produites par le persil (Somssich *et al.*, 1986), la tomate (Lucas *et al.* 1985) ou le haricot (Lamb 1986). En général, leur rôle est inconnu à quelques exceptions comme les chitinases et des 1,3- β galacturonases synthétisées par la pomme de terre agressée par *Phytophthora infestans* (Kombrink *et al.* 1988) et par le tabac infecté par le virus de la mosaïque (Kauffmann *et al.* 1987). Peut-être serait-il intéressant de modifier les gènes présents chez la plante pour rendre ces protéines constitutives.

Une autre possibilité est d'introduire dans la plante de tels gènes. Ainsi le gène "chitinase" de la bactérie *Serratia marcescens* (Joshi et Kozlowski 1986) a été incorporé chez le tabac. Le niveau de production de chitinase par les plantes transformées est directement lié à leur niveau de résistance à *Fusarium* (Semal 1989). Le gène codant pour la protéine capcidiale du virus de la mosaïque du tabac a été transféré dans des cellules de tabac en utilisant comme vecteur un *Agrobacterium tumefaciens* désarmé. Les symptômes des plantes transformées

inoculées sont réduits ou retardés en comparaison des plantes non transformées. Il existe des projets identiques pour le riz contre le virus du tungro et le RYMV.

Afin de bloquer la traduction de l'ARN messager viral dans les cellules infectées, il a été envisagé de le confronter à un ARN complémentaire pour qu'ils s'hybrident et forment ainsi une structure bicaténaire. L'intégration dans le génome du tabac d'un ADN codant pour des ARN antimessagers correspondant à l'ARN messager de la replicase (ARN polymérase virale) ou de la protéine capcidiale du virus de la mosaïque a été réussie (Semal 1989).

DIFFERENTS EFFETS D'UN GENE DE RESISTANCE

Quelque soit l'origine génétique du caractère de résistance il correspond à des effets épidémiologiques mesurables (Vales 1983, 1987c; Rapilly 1991). Ces effets vont d'abord être sujet à sélection avant d'être mis en jeu dans les stratégies de lutte génétique qui visent à réaliser un équilibre entre populations hôte et parasite en faveur de la culture. Le gène comme unité est choisi pour une schématisation plus aisée et parce que les exemples ne nous sont fournis que par l'étude de modèles génétiques simples. Cependant les considérations suivantes restent vraies pour les résistances polygéniques.

L'effet direct principal

Un effet de résistance est dit direct s'il ne s'exprime que lors de la confrontation d'un parasite et d'une plante possédant le gène de résistance considéré. Indirect dans le cas contraire (Tab. 1). Cet effet peut correspondre à une résistance complète ou partielle. Dans le premier cas le parasite ne boucle pas son cycle, dans le second il le fait moins bien (épidémie ralentie) que sur un hôte sans le gène de résistance. Dans les deux cas la résistance peut être générale vis à vis de toutes les souches du parasite ou spécifique de certaines, il n'y a pas ou il y a interaction différentielle hôte-parasite. L'effet direct principal, en général le premier effet perçu, peut correspondre à différents types de résistance:

Résistance complète avec interaction: Le cas particulier des relations "gène-pour-gène" avec les exemples historiques lin-*Melampsora lini* (Flor 1955), Pomme de terre-*Phytophthora infestans* (Van der Plank 1968), ou très récent, riz-*Pyricularia oryzae* (Silue *et al.* 1992).

Résistance complète sans interaction: Les exemples des couples tomate-*Alternaria tomato*, sorgo-*Periconia circinata*, chou-*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Crill 1977).

Résistance partielle avec interaction: Exemple du gène Pi-f du riz contre *Pyricularia oryzae* (Kiyosawa 1976) ou Ht du maïs qui retarde l'apparition des symptômes dus à *Helminthosporium turcicum* (Petitprez *et al.* 1985) ou résistance de la tomate à *Verticillium dahliae* (Beye et Lafay 1988).

Résistance partielle sans interaction: Une partie de la résistance partielle de la variété de riz IRAT 13 vis à vis de *P. oryzae* correspond à ce cas.

L'effet direct secondaire

Une souche peut surmonter l'effet direct principal, mais il se peut que son cycle infectieux se déroule moins bien, sur une variété qui a le gène surmonté que sur une qui ne l'a pas. Ainsi un gène surmonté peut conférer une résistance résiduelle (ghost effect).

Sans interaction: Ceci semble le cas le plus général. Ainsi les gènes Pm 4 et Pm 3C surmontés confèrent une résistance partielle au blé (*Triticum aestivum*) vis à vis de l'oïdium (*Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*) (Martin et Ellingboe 1976, Nass *et al.* 1981). Le gène Pi-z surmonté confère une résistance partielle résiduelle au riz (*Oryza sativa*) vis à vis de la Pyriculariose (*Pyricularia oryzae*) (Kiyosawa 1976).

Avec interaction: Le fait que l'effet direct principal soit surmonté n'interdit pas les interactions différentielles hôte-parasite lorsque seul est considéré l'ensemble des souches qui surmontent cet effet. L'exemple nous est fourni au locus Pi-k de résistance du riz à *P. oryzae* (Kiyosawa 1977) (Tab. 2).

Les effets directs tertiaire, quaternaire et suivants

La résistance du riz à la pyriculariose conférée par l'allèle Pi-k peut être surmontée par paliers, d'abord grâce au facteur de virulence av-kh et plus complètement grâce à av-k+ (Kiyosawa 1977). Bien qu'il s'agisse de deux expérimentations distinctes, il semblerait qu'un troisième palier existe puisque les souches dotées d'av-k ont leur cycle infectieux plus limité que celles pourvues du facteur av-km (Kiyosawa 1982). La figure 1 montre que l'allèle de résistance Pi-k est surmonté par une série de facteurs du pouvoir pathogène de plus en plus efficaces. Ceci correspond au fait que soient surmontés successivement les effets directs principal, secondaire, tertiaire, quaternaire, et les suivants.

L'effet direct de prémunition

La prémunition est l'effet de résistance attribuable à des mécanismes de défense déclenchés par un stimulus avant l'infection par une souche et s'exprimant contre cette dernière. La formation d'appressorium, et la pénétration d'une souche de *P. oryzae* compatible sont limitées si cette dernière est mélangée avec une souche incompatible lors de l'inoculation au riz (Fujita et Suzuki 1979). Cette défense peut se faire sous la forme de la production de molécules néphastes au parasite, les phytoalexines.

L'effet indirect: la force du gène

La charge d'un agent pathogène correspond à la distance qui le sépare de la forme la mieux adaptée dans une situation donnée. Les souches dotées du gène de virulence permettant de surmonter l'effet principal du gène de résistance d'une variété sont favorisées sur celle-ci et leur fréquence au champ augmente. Quand ce gène de virulence est inutile, en général les

souches qui en sont dotées sont défavorisées et leur fréquence diminue. C'est l'expression de la charge du gène de virulence. Un gène de résistance est dit fort si le coût de la virulence qui lui correspond est élevé pour le parasite. Dans le cas contraire, il est dit faible. Si le prix ne peut être payé par aucune souche, il sera dit extra-fort (Messiaen 1980). Cela signifie que l'acquisition de la virulence est au-delà des possibilités adaptatives du pathogène et que l'effet du gène de résistance considéré ne peut être surmonté. L'effet direct principal est alors permanent.

Pour le couple riz-*Pyricularia oryzae*, Chevaugéon *et al.* (1978) comparent les forces des gènes de résistance en estimant les charges des souches possédant les facteurs de virulence correspondants. Pour cela, ils mesurent leur demi-vie sur une variété hôte compatible. La demi-vie est le temps nécessaire pour que la fréquence d'une souche contre-sélectionnée diminue de moitié. Ils montrent que les gènes Pi-ta et Pi-ta2 sont plus forts que les autres.

CONCLUSION

Ces effets potentiels d'un gène de résistance sont a priori indépendants. Et mis à part l'effet direct principal leurs rôles dans les épidémies ont été peu étudiés.

LES DIFFERENTES STRATEGIES D'UTILISATION DES RESISTANCES MONOGENIQUES

La formalisation des effets d'un gène de résistance va nous permettre d'examiner comment les différentes stratégies d'utilisation des résistances monogéniques interviennent sur les interactions en termes d'équilibre entre populations hôte et parasite.

Eradication

L'éradication d'une maladie n'est envisageable que si l'on peut, sur l'ensemble d'une région isolée, introduire partout en même temps des variétés pourvues d'une résistance complète, non surmontée, afin d'éteindre la population parasite.

L'éradication est une stratégie qui utilise l'effet direct principal des gènes de résistance complète, mais aussi l'effet indirect, qui est la force du gène, car il ne faut pas que le parasite puisse s'adapter à la nouvelle variété durant le temps qui sépare l'introduction de celle-ci, de l'extinction de la population pathogène.

La stratégie d'éradication permet d'obtenir une "résistance" complète de la culture. Mais l'extinction de la population parasite n'est pas acquise définitivement. Cet "équilibre" extrême de la population parasite est précaire.

Une telle stratégie a été réalisée en 1976 en Corée avec l'introduction de variétés de riz de type Tongil résistantes à la pyriculariose. Cependant, dès 1978, toute la Corée était touchée par la pyriculariose à l'exception de la vallée de Cheolweon (Crill *et al.* 1980).

Rotation de variétés résistantes

La rotation permet de réduire au minimum le délai, donc le préjudice économique, existant entre l'apparition de souches surmontant la résistance d'une variété et le remplacement de celle-ci (Ahn 1981). La stratégie de rotation de variétés utilise les effets directs principaux des gènes de résistance. Mais le nombre des gènes de résistance complète étant limité, il faut qu'entre deux utilisations de chacun d'eux le gène de virulence correspondant ait été suffisamment contre-sélectionné. Cette stratégie utilise donc aussi l'effet indirect qu'est la force du gène de résistance.

Yamada (1979) observe une telle contre-sélection au champ pour les facteurs de virulence av-a et av-k+ de *Pyricularia oryzae*. Un gène devra être jugé pour ces deux effets. Ainsi, un gène fort de résistance partielle pourrait être préféré à un gène faible de résistance complète. La stratégie de rotation de variétés résistantes consiste à la réalisation d'équilibres successifs instables de la structure raciale de la population parasite par modification de celle de l'hôte. Autrement dit cette stratégie représente une tentative pour réaliser un équilibre dynamique entre les populations hôte et parasite. En moyenne, cette stratégie réalise une protection de la culture de bon niveau, mais elle nécessite de disposer d'un réseau de surveillance et de distribution des semences bien structuré. La rotation de variétés de riz est utilisée empiriquement depuis longtemps par les paysans philippins qui ont observé qu'il était mauvais de cultiver plusieurs fois de suite la même variété (Crill *et al.* 1980).

ACCUMULATION DE GENES DE RESISTANCE DANS UNE VARIETE

La stratégie d'accumulation de gènes de résistance dans une variété (pyramiding) peut être proposée sur la base de quatre hypothèses (Vales 1983, 1987d).

Première hypothèse: Il peut être fait l'hypothèse que plus une variété aura de gènes de résistance, plus l'apparition d'une race du pathogène possédant tous les gènes de virulence correspondants sera improbable. La résistance de la variété est due à l'effet direct principal des gènes, mais sa stabilité repose en partie sur leur force, qui s'oppose à l'association des gènes de virulence. Dans le cas du couple riz-*P. oryzae*, l'important polymorphisme du pouvoir pathogène du parasite permet de penser que cette première hypothèse est insuffisante pour justifier la stratégie d'accumulation de gènes de résistance dans une variété.

Deuxième hypothèse: Plus une variété a de gènes de résistance plus les souches du parasite qui l'infectent ont de gènes de virulence correspondants. Et si il y a des mutations spontanées vers l'avirulence, plus la probabilité qu'au moins un gène de virulence mute vers l'avirulence sera grande. D'où une plus importante diminution de l'autoinoculum virulent. Ahn et Ou (1982) observent bien que la descendance d'une spore de *P. oryzae* présente un grand polymorphisme pour la virulence. Cependant le calcul le plus optimiste montre qu'il faudrait introduire plus de 1000 gènes de résistance dans une variété pour diminuer de 1/10 l'autoinoculum virulent (Vales 1983, 1987d).

Troisième hypothèse: Nelson (1978) pense que l'accumulation d'un grand nombre de gènes de résistance surmontés dans une variété lui confère un bon niveau de résistance par l'accumulation des effets directs secondaires.

Quatrième hypothèse: La résistance associée à des gènes surmontés pourrait aussi être attribuée aux effets indirects. Cette force de plusieurs gènes de résistance associés peut être supérieure à la somme des forces de chaque gène (Robinson 1976). C'est peut-être ce qui est à l'origine de la durabilité de la résistance à la rouille jaune de la variété de Brigant, qui a les gènes R 14 et R 13 surmontés chez ses deux parents, Marie Bilo (R 14) et Huntsmann (R 13).

Discussion

Les mécanismes de résistance décrits par les trois dernières hypothèses ne sont pas exclusifs. D'après la première et, dans une certaine mesure, la quatrième hypothèse cette stratégie réalise une protection complète de la culture et repose sur un "équilibre" instable de la structure génétique de la population parasite qui peut être rompu par l'apparition de la super-race capable de surmonter la résistance de cette variété. D'après la deuxième, la troisième et, dans une certaine mesure, la quatrième hypothèse, cette stratégie confère une protection partielle de la culture et est fondée sur la réalisation d'un équilibre stable de la structure raciale de la population parasite. La première hypothèse fait état du rôle des effets directs principaux, qui sont connus, mais elle n'est pas crédible. Les autres hypothèses sont fondées sur les effets directs secondaires et de prémunition, ainsi que sur les effets indirects, qui sont mal connus. Aussi il est difficile de juger de l'intérêt de cette stratégie.

CULTURE EN ZONES DE DIFFERENTES VARIETES RESISTANTES

Lorsqu'une épidémie se développe systématiquement d'une zone infectée vers une zone indemne, il est possible d'enrayer sa progression en lui opposant successivement différents gènes de résistance. A chaque gène de résistance correspond une zone. Les variétés d'une même zone peuvent être différentes mais doivent être dotées d'un même gène de résistance. L'effet direct principal protège les variétés d'une zone tant que le gène n'est pas surmonté. L'effet indirect, la force du gène, agit de telle sorte que, pendant la progression du parasite dans une zone, les gènes de virulence inutiles sont contre-sélectionnés. La baisse du polymorphisme du pouvoir pathogène du parasite qui reste diminue la probabilité de maintien de races virulentes pour les variétés de la zone suivante.

Dans chaque zone envahie, la structure raciale de la population évolue vers un équilibre stable défavorable à la zone considérée mais favorable aux zones suivantes. Pour la zone suivante indemne, l'"équilibre" est rompu par le franchissement de la limite par le parasite. L'exemple classique de l'emploi de cette stratégie est la lutte contre la rouille noire du blé, *Puccinia graminis* en Amérique du Nord. Sa progression se fait du sud vers le nord, entre les mois de mai et de juillet, et a pu être en partie contrôlée par trois zones plantées de variétés à gènes de résistance différents. Ceci est un exemple d'utilisation de stratégie à l'échelle

continentale concernant un parasite obligatoire qui, en fin de cycle de culture, déserte les zones conquises.

MULTILIGNEE, MELANGE DE VARIETES ET VARIETE SYNTHETIQUE

Chez les plantes autogames, une multilignée est formée par un mélange de plusieurs lignées isogéniques ne différant que par un ou plusieurs gènes de résistance (Browning et Frey 1969). Un mélange est formé avec plusieurs variétés ayant les mêmes caractères agronomiques et différant par un ou plusieurs gènes de résistance. Chez les allogames une variété synthétique correspond à une multilignée ou un mélange où les fécondations croisées peuvent modifier les associations de gènes de résistance.

L'effet direct principal des gènes de résistance de chaque lignée, s'exerce à l'encontre des spores avirulentes. Pour que cet effet s'exerce, le maintien de l'hétérogénéité de la population parasite est indispensable. Autrement dit, une super-race ne doit pas remplacer complètement toutes les autres races de la population parasite. Le fonctionnement des multilignées peut-être expliqué par l'effet direct principal de la manière suivante. La majorité des races ne peut attaquer toutes les composantes de la multilignée; ainsi, pour chacune d'elles, tout se passe comme s'il y avait une diminution de la densité de l'hôte et cela reste vrai, en moyenne, pour toutes les races. Pour le parasite la densité apparente de l'hôte est inférieure à la densité réelle (Vales 1983, 1987d). Pour la rouille de l'orge un abaissement de la densité diminue le taux de progression de la maladie (Burdon 1982).

L'effet direct secondaire, effet résiduel de chaque gène de résistance, s'exprime à l'encontre des races qui surmontent leur effet direct principal. Cet effet contribue à la résistance partielle de la multilignée. L'effet de prémunition est exercé par des lignées à l'encontre de races virulentes, après stimulation par les races avirulentes. Ce mécanisme nécessite un maintien du polymorphisme de la population parasite, afin que coexistent des races avirulentes et virulentes pour chaque lignée.

La charge est liée aux gènes de virulence des races du parasite et s'exprime, sur tout hôte compatible, par une résistance partielle. Cette effet est primordial, car il contre-sélectionne les races qui ont le plus de gènes de virulence et permet ainsi un maintien du polymorphisme du parasite, il empêche la domination complète d'une super-race virulente. Ainsi cette stratégie utilise tous les effets des gènes de résistance. De plus le maintien du polymorphisme permet également de faire jouer d'éventuels antagonismes entre races du parasite. Ainsi, les races C8 de *Pyricularia oryzae* produisent une substance qui inhibe la germination des races C1 (Iwano *et al.* 1974).

La multilignée est une stratégie qui établit un équilibre stable de la structure raciale de la population parasite, et utilise pour cela tous les effets des gènes de résistance et l'antagonisme entre races. La résistance partielle ainsi réalisée par l'"effet multilignée" est donc durable. Les indiens d'Amazonie, au Brésil, cultivent systématiquement et volontairement le manioc en mélange de clones, et réalisent ainsi, empiriquement, une stratégie de lutte par multilignée contre la bactériose qui affecte cette culture (Lourd 1980, com. pers.). Les variétés

traditionnelles de riz sont souvent des variétés-populations qui peuvent fonctionner comme des multilignées vis à vis de différentes maladies.

La variété Floroner d'arachide, qui a une très grande adaptabilité et une résistance à la cercosporiose, se révèle, en fait, être une multilignée composée de lignées soeurs. Celles-ci diffèrent par leur résistance aux divers types de *Cercospora* se succédant souvent, durant le cycle de culture. Le premier programme de sélection de multilignées de blé a été lancé dans les années 50 (Borlaug 1959) et a débouché sur les variétés Miramar 63 et 65, commercialisées en Colombie et qui sont formées à égale proportion de 10 lignées semblables pour leurs caractéristiques agronomiques et portant chacune un gène différent de résistance complète à la rouille.

Au Danemark, 15% des orges de printemps sont cultivés en mélange et 90% l'étaient dans l'ex-RDA. Les essais en France sur blé ont permis d'observer une réduction de 30 à 80% de rouille jaune causée par *Puccinia striiformis* et un gain de rendement de 6 à 7% par rapport à la moyenne des composantes (Lannou *et al.* 1991).

MOSAIQUE

Une mosaïque correspond à la création de zones dans chacune desquelles est employé un gène de résistance différent. Une mosaïque peut être assimilée à une multilignée à grande échelle. L'unité de résistance n'est plus la plante mais le champ ou même une zone plus vaste. La mosaïque, en limitant la progression de la maladie à partir de foyers, peut également être assimilée à la culture en zones. La mise en place de cette stratégie de lutte qui demande une concertation entre agriculteurs est souvent réalisée par hasard en agriculture traditionnelle.

CONCLUSION

La formalisation du rôle d'un gène de résistance en quatre effets potentiels nous a permis de comprendre le fonctionnement des stratégies de lutte génétique utilisant les résistances monogéniques. Ces stratégies ne sont pas exclusives dans le temps. Ainsi, l'utilisation d'une variété accumulant tous les gènes de résistance n'empêchera pas, en cas de chute, l'usage ultérieur d'une multilignée efficace utilisant les mêmes gènes de résistance, si l'effet multilignée est effectif.

Nous avons vu que les stratégies d'emploi de gènes de résistance complète oligogénique peuvent correspondre à deux types d'équilibre: soit à un équilibre stable de la structure raciale de la population parasite, qui correspond à une résistance partielle, soit à un équilibre instable, qui correspond à une résistance complète. La figure 2 schématise les liens qui existent entre le niveau de résistance réalisée au champ, la stabilité de l'équilibre de la structure de la population parasite, le coût et la technicité requis par cette stratégie et le type d'agriculture concerné (Vales 1983, 1987d). Ainsi du type d'agriculture, et des moyens qui y sont associés, dépend le choix de la stratégie et donc le type, d'équilibre réalisé entre populations hôte et parasite.

RECHERCHE D'UNE RESISTANCE DIRECTEMENT DURABLE ET STABLE

Une autre possibilité est la recherche de variétés à résistance directement durable sans stratégie particulière. Cette possibilité correspond à la réalisation d'une résistance partielle de la culture et d'un équilibre stable (Fig. 2). Pour que la résistance ait plus de chance d'être durable, il faut qu'elle soit générale, polygénique et, pour le couple riz-*Pyricularia oryzae*, partielle, parce que toutes les résistances complètes connues sont spécifiques. Et si possible il faut que son niveau soit stable dans différentes conditions. C'est la prise en compte indépendante de ces caractères de la résistance recherchée qui va déterminer la stratégie d'amélioration (Vales 1983, 1987a, 1989b).

PRISE EN COMPTE DU CARACTERE GENERAL ET POLYGENIQUE DE LA RESISTANCE RECHERCHEE

Résistance générale

Pour le couple riz-*Pyricularia oryzae*, une souche qui surmonte les résistances complètes spécifiques des deux parents de chaque croisement n'est pas toujours disponible. Alors, en début de sélection, il faut épurer les descendances en ségrégation des gènes de résistance non surmontés. Cette épuration est réalisée par inoculation artificielle ne permettant que l'expression en "tout-ou-rien" des gènes de résistance complète. Seules les plantes sensibles sont conservées (sélection massale). Par sécurité la descendance séparée de chaque plante précédemment retenue est testée par la même technique. Les lignées retenues définitivement sont celles dont tous les individus présentent des symptômes de pyriculariose (sélection généalogique). Cependant, la résistance partielle qui reste peut être spécifique, aussi il convient d'utiliser des souches différentes pour chaque localité et chaque année.

Résistance polygénique

La sélection récurrente est proposée pour l'amélioration des caractères polygéniques de nombreuses espèces et en particulier la résistance comme celle de la luzerne (*Medicago sativa*) contre *Corynebacterium insidiosum* (Barnes *et al.* 1971), du tournesol (*Helianthus annuus*) contre *Sclerotinia sclerotiorum* (Castaño *et al.* 1991), du dactyle (*Dactylis glomerata*) contre *Stagonospora arenaria* (Zeiders *et al.* 1984), du brome (*Bromus inermis*) contre *Pyrenophora bromi* (Berg *et al.* 1986), du maïs (*Zea mays*) contre *Helminthosporium turcicum* (Jenkins *et al.* 1954), du sègle (*Secale cereale*) contre *Erysiphe graminis* f. sp. *secalis* (Lind 1988), du blé d'hiver (*Triticum aestivum*) contre *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* (Abdalla *et al.* 1989), de l'avoine (*Avena sativa*) contre le "yellow dwarf virus" (BYDV) (Baltenberger *et al.*, 1988), de l'orge (*Hordeum vulgare*) contre *Puccinia hordei* et *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (Parlevliet et Van Omerren 1988) ou encore du riz (*Oryza sativa*) contre *Pyricularia oryzae* (Vales 1983, 1987b).

La population de base de riz pluvial sur laquelle nous travaillons, a été réalisée au Brésil par J. Taillebois. Le brassage génétique est permis par l'introduction d'un gène de stérilité mâle récessif (ms). Nous avons épuré cette population des gènes de résistance complète non

surmontés par la souche de *Pyricularia oryzae* que nous utilisons. Ceci par sélection massale et généalogique. Cette population est conduite selon plusieurs schémas de cycle sélection-brassage (Vales 1989): sélection sur familles de demi-frères en bacs, sélection sur familles de demi-frères au champ et sélection sur familles de plein-frères au champ.

PRISE EN COMPTE DU CARACTERE PARTIEL DE LA RESISTANCE

L'épuration, si elle a été nécessaire, permet d'utiliser une souche surmontant les résistances complètes, et donc de pouvoir observer et sélectionner la résistance partielle.

Sélection en bacs de culture

La sélection en bacs de culture est faite après inoculation artificielle des jeunes plantes, mise à incubation en chambre de rosée, notation des symptômes foliaires et repiquage des individus les plus résistants. Contrairement à une phase d'épuration les réponses ne doivent plus être en "tout-ou-rien".

Sélection en F2 au champ

La souche de *P. oryzae* choisie est inoculée à une bande infestante constituée de variétés de riz sensibles et perpendiculaire aux lignes des populations F2 testées (Notteghem 1977). Des hétérogénéités du milieu peuvent faire varier la pression parasitaire et les symptômes des plantes. Aussi des variétés témoins sont disposées à intervalles réguliers.

Les conditions climatiques peuvent varier dans le temps et avec elle l'épidémie et les symptômes. La période de sensibilité des cous (base de la panicule) aux attaques de pyriculariose est de quelques jours entre le début de l'émergence paniculaire et le stade laiteux des grains. Ainsi une variété est plus attaquée si sa floraison coïncide avec un pic de plus forte épidémie. Aussi il est impossible de comparer les résistances variétales sur la base directe des niveaux d'attaque des cous (Vales 1989). C'est pourquoi les témoins sont semés de façon à synchroniser leurs floraisons à quatre dates. Ces dates recouvrent la période de floraison de l'ensemble du matériel végétal en sélection. Pour une plante donnée l'appréciation de sa sensibilité du cou est pondérée par celle du témoin suffisamment sensible qui a fleuri au même moment. En 1987, IRAT 13 présentait de 10 à 60%, et en 1988 Lung Sheng 1 de 5 à 95% de cous attaqués en fonction de la date de floraison.

Sélection de F3 à Fn au champ

Le support et la base de ce dispositif sont les mêmes que ceux utilisés en F2. Les lignées, leurs parents et les témoins sont semés sur trois blocs. L'un est traité avec un fongicide tout au cours de la culture. Les lignées dans ce bloc ne sont pas attaquées par la pyriculariose. Un autre bloc n'est traité que jusqu'au tout début de la montaison. Les lignées de ce bloc ne peuvent être touchées que par la pyriculariose du cou. Le troisième bloc n'est pas traité et

les lignées peuvent donc être affectées par la pyriculariose foliaire et celle du cou. Seuls les deux derniers blocs sont placés le long d'une bande infestante inoculée par une souche compatible avec les parents des lignées testées. Ainsi, il est possible d'estimer les pertes dues à la pyriculariose foliaire et/ou du cou.

Evaluation de F4 à Fn

Dès la F4 les lignées vont aussi sur un dispositif permettant de les évaluer et de tester la stabilité de leur résistance. Le précédent cultural joue un rôle sur le parasitisme du sol, l'alimentation des plantes et donc, leur sensibilité aux maladies. L. Seguy (1988, com. pers.) montre que l'incidence de la pyriculariose est moindre lorsque la source de phosphore est le yoorine, proche des scories Thomas.

La profondeur de travail du sol a des conséquences très importantes sur l'enracinement (Seguy 1970) et les disponibilités en eau et donc sur l'expression de la résistance à la sécheresse et à la pyriculariose. Aussi l'ensemble de supports largement suggéré par L. Seguy (1988, com. pers.) prend en compte: deux précédents: un favorable: une légumineuse, un défavorable: le riz; 2 types de travail du sol: favorable: profond, défavorable: superficiel; 2 types de fumure: favorable: avec scories Thomas, moins favorable: fumure vulgarisée; et 3 localités à sol et régime hydrique différents: Bouaké et Ferké: savane centre et nord, Man: forêt ouest ivoirien.

Ce dispositif permet d'étudier la stabilité de la résistance mais également de commencer d'évaluer l'adaptation des lignées à tel ou tel grand type de conditions de culture. Ceci permet de faire le lien avec la recherche sur les systèmes de culture qui fournit les objectifs de sélection et effectue les derniers choix sur les variétés obtenues.

CONCLUSION

De nouvelles méthodes de transfert ou d'acquisition de caractères de résistance portent déjà leurs fruits. Cependant, quelque soit la méthode d'obtention des caractères de résistance, ceux-ci correspondent à des effets épidémiologiques mesurables. Finalement, les interactions plante-agent pathogène s'expriment en termes d'équilibre entre populations hôte et parasite.

Cet équilibre, souhaité en faveur de la culture, peut être soit réalisé par des stratégies d'utilisation de résistances monogéniques, soit obtenu par l'utilisation d'une résistance directement durable. Le milieu, sol-climat, intervient sur les interactions, soit directement sur le parasite, soit à travers la plante.

Aussi, son rôle doit être pris en compte lors des sélections notamment pour la stabilité de la résistance. Le milieu, système de culture-économie, intervient sur les interactions hôte-parasite par le choix des stratégies qu'il impose et le type d'équilibre entre populations qui en résulte.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdalla A.H., Coffman W.R., Sorrells M.E. and Bergstrom G.C. (1989). Modified half-sib and phenotypic recurrent selection for resistance to powdery mildew in winter wheat. *Crop Science* 29: 1351-1357.
- Abdullah R., Cocking E.C., Thompson J.A. (1986). Efficient plant regeneration from rice protoplasts through somatic embryogenesis. *Biotechnology* 4: 1087-1090.
- Ahn S.W. (1981). The slow blasting resistance. Meeting on Blast and Upland Rice. EMBRAPA, CNPAF, Goiania, 8-14 March. 15 pp.
- Ahn S. and Ou S.H. (1982). Epidemiological implication of spectrum of resistance to rice blast. *Phytopathology* 72: 282-284.
- Baltenberger D.E., Ohm H.W. and Foster J.E. (1988). Recurrent selection for tolerance to barley yellow dwarf virus in oat. *Crop Science* 28: 477-480.
- Barnes D.K., Hanson C.H., Frosheiser F.I. and Elling (1971). Recurrent selection for bacterial wilt resistance in alfalfa. *Crop Science* 11: 545-546.
- Beye I., Lafay J.F. (1988). Verticilliose de la tomate: analyse des interactions entre l'agressivité de l'agent pathogène et la résistance générale de l'hôte. *Agronomie* 8 (4).
- Borlaug N.E. (1959). The use of multilineal or composite varieties to control airborne epidemic disease of self-pollinated crop plants. *Proc. Intern. Wheat Genet. Symp.* 1 st. Winnipeg: 12-26.
- Browning A. and Fray K.J. (1969). Multiple cultivars as a means of disease control. *Ann. Rev. of Phytopathology* 7: 355-382.
- Burdon J.J. (1982). Host density as a factor in plant disease ecology. *Ann. Rev. Phytopathology* 20: 134-166.
- Cai Q.Q., Kuo C.S., Qian Y.Q., Jiong R.X., Zhou Y.L. (1987). Plant regeneration from protoplasts of corn (*Zea mays* L.). *Acta Bot. Sin.*, 29(5): 453-458.
- Castagno F., Vear F. et Tourtevielle D. (1991). *Sclerotinia sclerotiorum*: les atouts de la lutte génétique chez le tournesol. ANPP-Troisième Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes. Bordeaux 3-5 décembre: 719-726.
- Chevaugon J., Bah C.P. et Makounzi J.A. (1978). Mesure rapide de la force de gènes de résistance. Application à la Pyriculariose du riz. *Ann. Phytopathol.* 10(3): 277-286.
- Coulibaly Y., Demarly Y. (1986). Regeneration of plantlets from protoplasts of rice. *Z. Pflanzenzucht.*, 96 (1): 79-81.
- Coulibaly Y., Demarly Y. (1989). Culture de protoplastes chez le riz *Oryza sativa* L. Totipotence des organes. *Agronomie africaine* 1(1): 15-21.
- Courtois B. (1988). La culture *in vitro* pour l'amélioration du riz. *L'Agron. Trop.* 43 (4): 307-312.
- Crill P. (1977). An assessment of stabilizing selection in crop variety development. *Ann. Rev. Phytopathol.* 15: 185-202.
- Crill P., Ikehashi M. and Beachell H.M. (1980). Rice blast control strategies. Special Intern. Symp. IRRRI 21-25 April. 37 pp.
- Flor H.H. (1955). Host-parasite interaction in flax rust. Its genetic and other implications. *Phytopathology* 45: 680-685.
- Fujita Y. and Suzuki H. (1979). Aggressiveness of conidia of *Pyricularia oryzae* formed on leaf lesion and medium. *Ann. Phytopathology Soc. Japan.* 45: 404-405.
- Guideroni E., Glaszmann J.-C., Courtois B. (1989). Segregation of 12 isoenzyme genes among doubled haploid lines derived from *japonica* x *indica* cross of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 42 (1-2): 45-55.
- Iwano M., Yamada M. and Ogasawara N. (1974). (en japonais). *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 40. 178 pp.
- Jenkins M.T., Robert A.L. and Findley Jr., W.R. (1954). Recurrent selection as a method for concentrating genes for resistance to *Helminthosporium turcicum* leaf blight in corn. *Agronomy Journal* 46: 89-94.
- Joshi M.T. and Kozlowski M. (1986). Cloning and characterization for *Serratia liquefaciens* chitinase(s). IIIe Symp. Intern. de génétique moléculaire des interactions plantes-microorganismes. McGill Univ., Montréal, Canada. 27-31 juillet. 82 pp.

- Kauffmann S., Legrand M., Geoffroy P. and Fritig B. (1987). Biological function of "pathogenesis-related" proteins: Four PR proteins of tobacco have 1,- β -glucanase activity. *EMBO J.* 6: 3209-3212.
- Kiyosawa S. (1976). Methods for tests and gene analyses of blast resistance of rice varieties. *Oryza* 13(1): 1-32.
- Kiyosawa S. (1977). Some examples of pest and disease epidemics in Japan and their causes. *Ann. New York Acad. of Sc.*: 35-44.
- Kiyosawa S. (1982). Genetics and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 20: 93-117.
- Kombrick E., Schroder M., and Hahlbrock K. (1988). Several "pathogenesis-related" proteins in potato are 1,3- β -glucanases and chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 782-786.
- Lamb C.J. (1986). Organization, structure and activation of plant defense genes. Le III^e Symposium international de génétique moléculaire des interactions plantes-microorganismes. McGill University Montréal, Canada. 27-31 juillet. 55 pp.
- Lannou C., de Vallavielle-Pope C., Goyeau H., Biass C. (1991). L'efficacité d'un mélange variétal de blé vis à vis des rouilles jaune et brune: expérimentations et modélisations. ANPP-III^e Conf. Intern. sur les Maladies de Plantes. Bordeaux, 3-5 déc.: 735-744.
- Lind V. (1988). Half sib selection for resistance to powdery mildew (*Erysiphe graminis* DC. f. sp. *secalis* Marchal) in rye populations. *Theor. Appl. Genet.* 76: 560-564.
- Lucas J., Camacho-Henriquez A., Lottspeich F., Henschen A., Sanger H.-L. (1985). Amino acid sequence of the "pathogenesis-related" leaf protein p14 from viroid-infected tomato reveals a new type of structurally unfamiliar proteins. *EMBO J.* 4: 2745-2749.
- Martin T.J. and Ellingboe A.H. (1976). Differences between compatible host genotypes involving the Pm4 locus of wheat and the corresponding genes in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Phytopathology* 66: 1435-1438.
- Messiaen C.M. (1980). "Plant Pathosystems" essai de résumé et de lecture critique. *Agronomie Tropicale XXXIII* (3): 263-274.
- Nass H.A., Pedersen, Mackenzie D.R. and Nelson R.R. (1981). The residual effects of some "defeated" powdery mildew resistance genes in isolines of winter wheat. *Pathology* 71 (12): 1315-1318.
- Notteghem J.-L. (1977). Mesure au champ de la résistance horizontale du riz à la pyriculariose. *Agron. Trop.* 34(2): 180-192.
- Parlevliet J.E. and Van Ommeren A. (1988). Accumulation of partial resistance in barley leaf rust and powdery mildew through recurrent selection against susceptibility. *Euphytica* 37: 261-274.
- Petitprez M., Benmoura P., Albertini L. (1985). Epidémiologie d'une helminthosporiose du maïs due à *Exserohilium turcicum* en France. Epidémiologie, 28^e Colloque Soc. Fr. Phytopathol. Versailles, 14-15 mai. C.N.R.A. ed. pp. 70-81.
- Rapilly F. (1991). *L'épidémiologie en pathologie végétale. Mycoses aériennes*. I.N.R.A. 317 pp.
- Rouxel T. (1989). Les phytoalexines et leur intervention dans la résistance hypersensible aux champignons phytopathogènes. *Agronomie* 9: 529-545.
- Robinson R.A. (1976). *Plant pathosystems*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 184 pp.
- Seguy L. (1970). Influence des facteurs pédologiques et des techniques culturales sur la croissance et la production du riz pluvial en Casamance (Sénégal méridional) (1968-1969), Tome I: Rapport 63 pp.
- Seilleur P. (1989). Amélioration génétique de la résistance aux agents pathogènes. In: *Traité de pathologie végétale*. Les Presses Agronomiques de Gembloux, A.S.B.L. 620 pp.
- Semal J. (1989). Phytopathologie et bioingénierie. In: *Traité de pathologie végétale*. Press. Agro. de Gembloux, A.S.B.L. 620 pp.
- Silue D., Notteghem J.-L., Tharreau D. (1992). Evidence of gene-for-gene relationship in the *oryza-sativa-magnaprthe grisea* pathosystem. *Phytopathology* (sous presse).
- Somssich I.E., Schmelzer E., Bollmann J. and Hahlbrock K. (1986). Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2427-2430.

- Toriyama K., Hinata K., Sasaki T. (1986). Haploid and diploid plant regeneration from protoplasts of anther callus in rice. *Theor. Appl. Genet.*, 73(1): 16-19.
- Vales M. (1983). Des connaissances sur les relations hôte-parasite aux stratégies de lutte contre la pyriculariose de riz. Thèse Doct. Univ. Paris-Sud, Centre d'Orsay: 310 pp.
- Vales M. (1987a). La résistance durable: cas de la pyriculariose du riz. I. Les qualités associées à la résistance durable. *L'Agron. Trop.* 42 (2): 103-111.
- Vales M. (1987b). La résistance durable: cas de la pyriculariose du riz. II. L'Amélioration variétale de la résistance durable. *L'Agron. Trop.* 42 (2): 112-120.
- Vales M. (1987c). La résistance monogénique: cas de la pyriculariose du riz. I. Les différents effets d'un gène de résistance. *L'Agron. Trop.* 42 (3): 180-185.
- Vales M. (1987d). La résistance monogénique: cas de la pyriculariose du riz. II. Les stratégies d'emploi des résistances monogéniques. *L'Agron. Trop.* 42 (3): 186-193.
- Vales M. (1989). Stratégie pour l'Amélioration de la Résistance à la Pyriculariose du Riz. Symposium International sur le Rôle de la Biologie dans la Solution de la Crise Alimentaire en Afrique. Réseau Africain de Biosciences. 25-29 juillet 1989, Yamoussoukro, Côte d'Ivoire, 12 pp.
- Van der Plank J.E. (1968). *Disease resistance in plants*. Academic Press, New York, London. 206 pp.
- Yamada M. (1979). Distribution and population change in races of blast fungus, *Pyricularia oryzae*, in Japan. *Review of plant protection research* 12: 64-79.

LES BRADYRHIZOBIUM D'ACACIA ALBIDA ET D'AESCHYNOMENE SP. BACTERIES PHOTOSYNTHETIQUES ET NON PHOTOSYNTHETIQUES

N. DUPUY*, J. LORQUIN*, S. N'DIAYE*, D. ALAZARD*,
M. GILLIS** et B. DREYFUS*

*Laboratoire de Microbiologie des Sols, ORSTOM, B.P. 1386, Dakar, Sénégal

**Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Microbienne, Rijksuniversiteit,
Ledeganckstratt 35, B-9000 Gent, Belgique

Résumé: Nous avons récemment découvert que d'importantes populations de Bradyrhizobium vivaient sous l'Acacia albida jusqu'à 34 m de profondeur, au niveau de la nappe phréatique. Ces souches de Bradyrhizobium ont été isolées et comparées pour leur capacité à fixer l'azote à d'autres souches isolées en surface. La proportion de souches non fixatrices d'azote (ineffectives) est élevée (environ 60%) et identique chez les souches de surface et de profondeur. Alors qu'à Louga (200 km au nord de Dakar) environ la moitié des souches isolées jusqu'à 34 m sont effectives, à Diokoul dans la région de Bambey (centre Sénégal), environ 90% des souches sont ineffectives. Malgré la présence de ces Bradyrhizobium dans les sols, nous n'avons pu mettre en évidence de nodules sur les Acacia albida adultes poussant dans la zone sahélienne. Par contre, dans la zone soudano-guinéenne, nous avons découvert de nombreux nodules fixateurs d'azote sur les racines des A. albida adultes qui poussent dans les rizières de Casamance (sud Sénégal). La proportion de souches effectives peut atteindre 90% dans les sols de rizières où la profondeur de la nappe d'eau varie entre 1,5 m et 4,5 m. Une étude de la répartition des Bradyrhizobium nous a montré que leur présence dans les sols de rizières dépend de la présence de racines de l'Acacia albida. A Djinaki les populations de Bradyrhizobium sous A. albida sont très élevées (105 bactéries/g de sol) et comparables aux populations de Rhizobium présentes dans les sols des régions tempérées sous légumineuses. Une étude taxonomique a permis de comparer les souches de l'Acacia albida aux souches isolées de nodules de tige de plusieurs espèces d'Aeschynomene. Parmi ces dernières, nous avons montré que les souches d'Aeschynomene indica et Ae. sensitiva isolées au Sénégal étaient photosynthétiques. Les résultats obtenus ont confirmé l'appartenance au grand groupe des Bradyrhizobium des souches d'Acacia albida et d'Aeschynomene. Les souches photosynthétiques d'Aeschynomene et un grand nombre de souches d'Acacia albida sont très proches taxonomiquement puisqu'elles appartiennent à un même sous-groupe génomique de Bradyrhizobium.

Abstract: We recently discovered that large populations of Bradyrhizobium lived under Acacia albida, as deep down as 34 m, at the level of the phreatic zone. These Bradyrhizobium strains have been isolated and their nitrogen-fixing capacity has been compared to that of other strains isolated from the surface. The percentage of non-nitrogen fixing strains (ineffective) is high (around 60%), and is the same for the surface and the depth strains. In Louga (200 km north of Dakar) about half the strains isolated, as deep down as 34 m, are effective, while in Diokoul, in the Bambey region (central Senegal), some 90% of the strains are ineffective. Despite the presence of Bradyrhizobium in the soil, we have not been able to detect nodules on the adult Acacia albida that grow in the Sahel. On the other hand, in the Sudano-Guinean zone, we found large numbers of nitrogen-fixing nodules on the roots of adult A. albida that grew in the Casamance ricefields (southern Senegal), where there were up to 90% effective strains and the depth of the water was between 1.5 m and 4.5 m. A study on the distribution of Bradyrhizobium showed that their presence in the soils of the ricefields depended on the

presence of Acacia albida roots. In Djinaki Bradyrhizobium populations under A. albida were very high (105 bacteria/g of soil), and was comparable to Rhizobium populations in the soils under legumes grown in temperate regions. We made a taxonomic study to compare the Acacia albida strains with strains isolated from stem-nodules of several species of Aeschynomene. Among them, we showed that strains from Aeschynomene indica and Ae. sensitiva isolated in Senegal were photosynthetic. The results confirmed that all Acacia albida and Aeschynomene strains belonged to the Bradyrhizobium genomic cluster. Photosynthetic strains from Aeschynomene and a large number of Acacia albida strains are taxonomically very close and belong to the same sub-cluster of Bradyrhizobium.

Les rhizobiums capables de former des nodules fixateurs d'azote sur les racines ou les tiges des légumineuses tropicales appartiennent à trois genres différents, le genre *Rhizobium*, le genre *Bradyrhizobium*, et le genre *Azorhizobium*. Moins étudiées que les *Rhizobium*, les bactéries du genre *Bradyrhizobium* (Jordan 1982), caractérisées par une croissance lente en culture pure (temps de génération supérieur à 6 heures), nodulent pourtant la grande majorité des légumineuses tropicales. En effet, le grand groupe des *Bradyrhizobium* ne comporte aujourd'hui qu'une seule espèce définie, *Bradyrhizobium japonicum*, qui comprend toutes les souches à croissance lente nodulant le Soja (*Glycine max*).

Des études de systématiques fondées sur la taxonomie numérique (t'Mannetje 1967, Abdel Basit 1991), les hybridations ADN-ADN ou ADN-ARNr, et le séquençage de l'ARN 16S (Hollis *et al.* 1981, Jarvis *et al.* 1986, Young *et al.* 1991) ont montré que le groupe des *Bradyrhizobium* était très hétérogène et composé de plusieurs sous groupes qui pourraient constituer des espèces séparées. *Bradyrhizobium japonicum* mais aussi d'autres *Bradyrhizobium*, appelés *Bradyrhizobium* sp. ou "cowpea" sont répartis dans ces différents sous groupes. Cependant aucune nouvelle espèce n'a été définie jusqu'à présent.

Parmi les légumineuses tropicales de l'Afrique de l'Ouest nodulées par les *Bradyrhizobium*, on trouve des légumineuses cultivées ayant une grande importance économique comme l'Arachide (*Arachis hypogaeae*), le Niébé (*Vigna unguiculata*), ou encore le Pois Bambara (*Voandzeia subterrannea*). De nombreuses espèces d'arbres (*Acacia albida*, *Pterocarpus erineaceus*, *Erythrophleum guineensis*, *Prosopis africana*, *Dalbergia melanoxylon*...etc), ainsi que les espèces à nodules de racine et de tige du genre *Aeschynomene* (*Ae. elaphroxylon*, *Ae. afraspera*, *Ae. indica*, *Ae. sensitiva*...etc) sont aussi nodulées par des *Bradyrhizobium* (Alazard 1991, de Lajudie 1991). Parmi ces différentes légumineuses, nous avons choisi d'étudier et de comparer les *Bradyrhizobium* nodulant un arbre, l'*Acacia albida*, aux *Bradyrhizobium* isolés des nodules de tige de plusieurs espèces d'*Aeschynomene*.

LES BRADYRHIZOBIUM DE L'ACACIA ALBIDA

Parmi les arbres du Sahel, l'*Acacia albida* présente la particularité unique d'avoir un cycle végétatif inversé (Monographie CTFT 1988). Il améliore la fertilité des sols et est utilisé par les paysans traditionnellement et empiriquement en association avec les cultures, et notamment avec le mil. En outre, pendant la saison sèche, ses feuilles et ses gousses procurent un

excellent fourrage aérien aux animaux. Contrairement à la majorité des *Acacia* sahéliens qui sont associés au genre *Rhizobium* (voir article de Lajudie *et al.*, ce volume), l'*Acacia albida* ne fixe l'azote qu'en association avec les *Bradyrhizobium* (Dreyfus et Dommergues 1981). Dans la région sahélienne, la croissance de l'*Acacia albida* est étroitement liée à la présence d'une nappe d'eau que les racines profondes de l'arbre peuvent atteindre, le rendant ainsi totalement indépendant du cycle annuel des saisons. La profondeur de la nappe varie entre 15 m et 40 m. Curieusement, l'*Acacia albida* peut aussi se développer beaucoup plus au Sud, en particulier dans les rizières de la zone soudanienne où la profondeur de la nappe d'eau varie entre 0,5 m et 4 m.

Par la diversité de ses biotopes, l'*Acacia albida* nous est donc apparu comme une plante hôte très intéressante. C'est ainsi que nous avons prélevé des échantillons de sol dans les zones sahéliennes et soudanienne en effectuant des forages de la surface jusqu'en profondeur (34 m à Louga). Le tableau 1 donne les résultats du dénombrement des *Bradyrhizobium* en fonction de la profondeur dans quatre sites de prélèvement différents. Dans la zone sahélienne, les *Bradyrhizobium* sont plus nombreux au niveau de la nappe d'eau qu'à la surface. En zone soudanienne, les populations de *Bradyrhizobium* sont réparties tout au long des forages et atteignent des chiffres tout à fait comparables à ceux trouvés pour les *Rhizobium* dans les sols sous légumineuses des régions tempérées. A partir des prélèvements de sols des différents forages, 53 souches de *Bradyrhizobium* ont été isolées et leur capacité à fixer l'azote dans les nodules de l'*Acacia albida* testée.

Le tableau 2 donne les mesures de fixation d'azote des souches en fonction de leur profondeur d'origine. Dans la zone sahélienne, à Louga, les souches effectives représentent moins de la moitié des souches et sont plus nombreuses en surface. Par contre, à Diokoul, seulement une souche effective a été isolée. Dans la zone sahélienne, nous n'avons jamais pu trouver de nodules sur des arbres adultes. La fixation d'azote par l'*Acacia albida* pourrait donc être négligeable, d'autant plus que dans certains sites (type Diokoul), les souches de *Bradyrhizobium* sont très largement inefficaces. Par contre, dans la zone soudanienne, la majorité des souches sont efficaces (Tableau 2) et nous avons trouvé des nodules fixateurs d'azote dans les sols des rizières. Les résultats rapportés au tableau 3 montrent que la présence des *Bradyrhizobium* dans les sols de rizières est étroitement liée à celle d'un *Acacia albida*. Ainsi, à partir de 20 cm de profondeur, seuls les sols sous couvert de l'*Acacia albida* renferment un nombre significatif de bactéries. Les résultats que nous avons obtenus diffèrent de ceux de Virginia *et al.* (1986) qui n'avaient pas observé de changement de populations de *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium* hors et sous couvert de *Prosopis glandulosa*.

LES BRADYRHIZOBIUM DU GENRE AESCHYNOMENE

Plusieurs espèces d'*Aeschynomene* poussent pendant la saison des pluies dans les zones inondées du Sénégal. Comme *Sesbania rostrata*, dont elles partagent le même biotope, ces légumineuses aquatiques sont caractérisées par une nodulation de tige qui leur permet de fixer d'importantes quantités d'azote. Moins sensibles à la photopériode que *S. rostrata*, certaines espèces d'*Aeschynomene* comme *Ae. afraspera* sont utilisées comme engrais vert dans les

rizières et peuvent ainsi augmenter considérablement les rendements en riz (Alazard 1991, Ladha *et al.* 1990).

Les sites de nodulation de tige des *Aeschynomene* correspondent, comme chez *Sesbania rostrata*, à des primordia racinaires présents tout au long de la tige ou localisés sous l'épiderme de la tige. La nodulation de la tige n'a lieu que lorsque le primordium est directement accessible à la bactérie. Ainsi Alazard et Duhoux (1988) distinguent parmi les espèces d'*Aeschynomene* trois groupes de plantes. Le groupe I comprend les espèces (*Ae. elaphroxylon*, *Ae. uniflora*, *Ae. americana*...etc) dont les primordia racinaires demeurent toujours inclus dans la tige sous l'épiderme. Le groupe II comprend deux espèces (*Ae. afraspera*, *Ae. nilotica*) dont les primordia racinaires ont percé l'épiderme de la tige. Le groupe III comprend plusieurs espèces (*Ae. indica*, *Ae. sensitiva*, *Ae. tambacoudensis*...etc) dont les primordia, situés juste sous l'épiderme de la tige, souvent au centre de lenticelles, restent sensibles à l'infection. Ainsi, seules les espèces des groupes II et III portent à la fois des nodules de tige et de racine, les plantes du groupe I n'ayant que des nodules racinaires.

Cette classification des *Aeschynomene* en trois groupes correspond aussi pour les rhizobia à trois groupes d'inoculation croisée (Alazard 1991). Ainsi, les bactéries isolées des nodules racinaires du groupe I ne produisent pas de nodules sur les espèces du groupe III et les bactéries isolées des plantes du groupe III n'induisent de nodules effectifs que dans ce même groupe. Le groupe II constitue un groupe intermédiaire dont les bactéries peuvent former des nodules soit sur les plantes du groupe I soit sur celles du groupe III. Malgré ces différences dans la nodulation, une étude taxonomique basée sur l'analyse des caractères nutritionnels ainsi que sur l'analyse des protéines totales en SDS PAGE, a montré que tous les rhizobia isolés des différents groupes d'*Aeschynomene* appartiennent au genre *Bradyrhizobium* (Alazard 1991). De plus, la plupart des souches isolées des groupes d'inoculation croisée II et III présentent la propriété de fixer l'azote en culture pure et forment un groupe taxonomique très homogène (Alazard 1991).

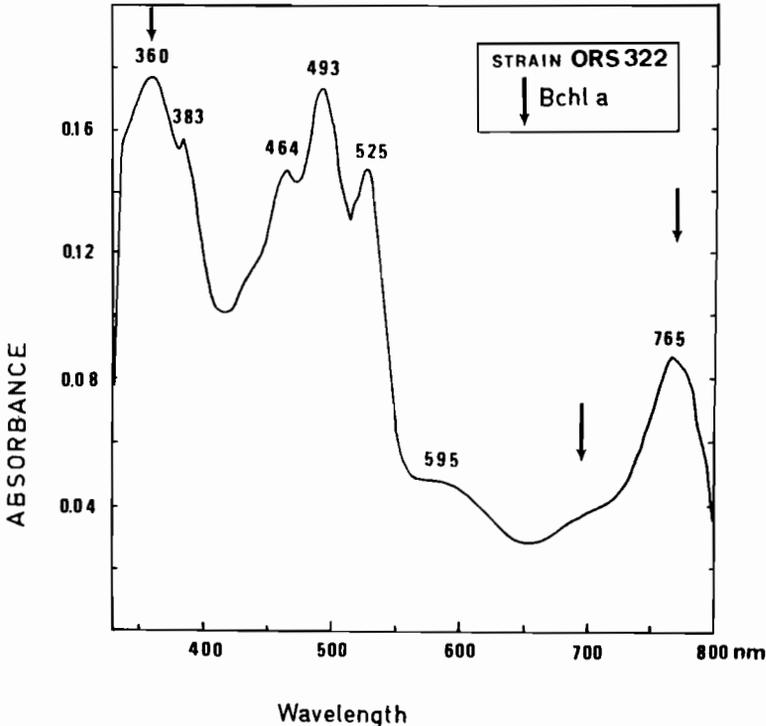
Récemment, Evans *et al.* (1990) ont mis en évidence les propriétés photosynthétiques d'une souche isolée de nodules de tige d'*Aeschynomene indica*, la souche BTAil. Cette souche qui contient de la bactériochlorophylle a ainsi que des centres de réaction de photosynthèse, identiques à ceux des bactéries photosynthétiques pourpres (Pfennig et Trüper 1974). De plus, en présence de lumière, il semble que la photosynthèse soit active, aussi bien en culture pure que dans les nodules de tige (Fleischman *et al.* 1990).

Appelée provisoirement *Photorhizobium thompsonianum*, cette souche appartient en fait au genre *Bradyrhizobium* comme l'ont montré les études de séquençage d'un segment de l'ARNr 16S (Young *et al.* 1991). Bien que totalement nouvelle chez les rhizobia, la capacité de photosynthèse de la souche BTAil n'est pas surprenante du fait de la proximité taxonomique des *Bradyrhizobium* et des bactéries photosynthétiques du genre *Rhodopseudomonas* établie depuis plusieurs années sur la base de comparaisons de séquence de l'ARNr 16S (Hennecke *et al.* 1985) ou d'hybridation ADN-ARNr (Jarvis *et al.* 1986). Cette relation étroite entre *Bradyrhizobium* et *Rhodopseudomonas* a été récemment confirmée par Young *et al.* (1991) qui montrent par analyse de l'ARNr 16S qu'une souche de *Rhodopseudomonas palustris* appartient à un des clusters de *Bradyrhizobium japonicum*.

Nous avons récemment mis en évidence que, comme la souche BTAil, de nombreuses souches isolées de nodules de tige d'*Aeschynomene afraspera*, *Ae. nilotica*, *Ae. indica*, *Ae. sensitiva* sont photosynthétiques. Lorsque ces souches sont cultivées sous un éclairage intermittent riche en rayons infrarouges (14 h de lumière, 8 h d'obscurité) sur un milieu solide ou liquide pauvre en source carbonée, l'induction des pigments qui jouent un rôle dans la photosynthèse (bactériorhodospirine et divers caroténoïdes) se produit en fin de croissance exponentielle. Par contre, aucune coloration des colonies n'apparaît en lumière continue ou à l'obscurité.

Contrairement aux bactéries du genre *Rhodopseudomonas*, ces bactéries symbiotiques et photosynthétiques sont strictement aérobies et jusqu'à présent, aucune croissance en conditions photoautotrophes n'a été obtenue. La Figure 1 montre, après extraction, le spectre d'absorption des pigments de la souche photosynthétique ORS322 isolée de nodules d'*Aeschynomene afraspera*. Ce spectre est très proche de celui observé chez la souche BTAil (Evans *et al.* 1990). On distingue parfaitement la bactériorhodospirine (765, 700, 595, 383-390 et 360 nm) ainsi que le (ou les) caroténoïde(s) (525, 493 et 464 nm). Les propriétés photosynthétiques des *Bradyrhizobium* d'*Aeschynomene* (40 souches isolées par D. Alazard et 90 souches nouvellement isolées) ont été étudiées. Parmi ces 130 souches, 80 sont photosynthétiques, certaines produisant en abondance des caroténoïdes roses, saumon ou orange vif rappelant ceux produits par plusieurs espèces de *Rhodopseudomonas*. Aucune des souches isolées de l'*Acacia albida* n'est photosynthétique.

Figure 1



RELATIONS ENTRE LES BRADYRHIZOBIUM ISOLES DE L'ACACIA ALBIDA ET LES BACTERIES PHOTOSYNTHETIQUES OU NON PHOTOSYNTHETIQUES DES AESCHYNOMENE

Spécificité de nodulation

Nous avons tout d'abord comparé le spectre d'hôte des *Bradyrhizobium* des *Aeschynomene* et de l'*Acacia albida*. Le tableau 4 donne les résultats simplifiés de nodulation et de fixation de l'azote pour quelques souches isolées des trois groupes d'*Aeschynomene* (voir section précédente) et d'une souche d'*Acacia albida*. Les résultats obtenus avec d'autres souches que la souche ORS101 confirment que la plupart des souches d'*Acacia albida* nodulent le groupe I des *Aeschynomene* et vice-versa. Ainsi, l'*Acacia albida* et les *Aeschynomene* du groupe I font partie du même groupe d'inoculation croisée. Aucune nodulation croisée n'est observée entre le groupe I et le groupe III (Tableau 4). D'autre part, nous avons montré que toutes les souches isolées des *Aeschynomene* du groupe III (*Ae. indica*, *Ae. sensitiva*, *Ae. tambacoundensis*), étaient photosynthétiques. Parmi les souches isolées de *Ae. afraspera* (groupe II) on trouve aussi bien des souches non photosynthétiques nodulant les plantes du groupe I que des souches photosynthétiques nodulant le groupe III. Mais ces souches ne forment de nodules effectifs que dans le groupe II.

Résultats de taxonomie

Les *Bradyrhizobium* de l'*Acacia albida* isolés en surface et en profondeur ainsi qu'une partie des souches d'*Aeschynomene* (Alazard 1990) ont tout d'abord été caractérisés par une étude comparative des protéines totales avec la technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Les profils obtenus ont été comparés à la base de données de l'Université de Gand qui contient les profils électrophorétiques de plus de 200 souches de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium*. Les résultats obtenus confirment que toutes les souches isolées de l'*Acacia albida* et des différentes espèces d'*Aeschynomene* appartiennent au grand groupe des *Bradyrhizobium*. Ce grand groupe comprend actuellement cinq sous-groupes (A, B, C, D et E) (Gillis *et al.*, résultats non encore publiés). Les souches d'*Acacia albida* isolées aux différentes profondeurs sont réparties dans les trois sous-groupes A, B et C, principalement dans les sous-groupes B et C.

La grande majorité des souches d'*Aeschynomene* appartient au sous-groupe B. De plus, toutes les souches photosynthétiques appartiennent à un groupe électrophorétique très homogène qui fait partie du sous-groupe B. Ainsi, comme le montre la figure 2, le sous-groupe B contient à la fois des souches d'*Acacia* et d'*Aeschynomene*, les souches photosynthétiques étant toutes regroupées dans le même sous-groupe de B. D'autre part, l'ADN de quelques souches représentatives des souches d'*Acacia* et d'*Aeschynomene* a été utilisé pour les hybridations ADN ARNr avec la sonde ARNr de la souche type de *Bradyrhizobium japonicum*. Les résultats obtenus confirment que toutes les souches photosynthétiques et non photosynthétiques testées jusqu'à présent appartiennent au groupe génomique des *Bradyrhizobium*.

CONCLUSION

Les travaux que nous avons menés au Sénégal nous ont permis de mettre en évidence plusieurs propriétés nouvelles dans le groupe des *Bradyrhizobium*. Les souches de l'*Acacia albida* peuvent vivre en grand nombre jusqu'à 34 m de profondeur sous son couvert. L'étude de taxonomie nous a montré qu'il n'y avait pas de différence entre les souches de profondeur et celles de surface. Ainsi les souches présentes en surface pourraient suivre les racines de l'arbre au cours de leur croissance vers la nappe d'eau.

Ces résultats confirment l'intérêt d'une inoculation en pépinière avec une souche fixatrice d'azote et compétitive, surtout dans les sites comme Diokoul où aucune des souches isolées en profondeur n'est effective. Nous avons d'autre part mis en évidence que l'activité photosynthétique était une propriété commune à de nombreuses souches isolées de nodules de tige des *Aeschynomene*.

Ces souches photosynthétiques et un grand nombre de souches d'*Acacia albida* appartiennent au même sous-groupe génomique de *Bradyrhizobium*, confirmant ainsi la proximité des bactéries symbiotiques et des bactéries photosynthétiques. L'étude des relations entre photosynthèse et fixation d'azote devrait permettre à l'avenir d'améliorer dans les nodules aériens le rendement de la symbiose fixatrice d'azote.

Tableau 1. Distribution des populations de *Bradyrhizobium* dans quatre profils de sol sous le couvert d'un *Acacia albida* de la surface jusqu'à la nappe d'eau

Zone éoclimatique Sahélienne (100 à 500 mm de pluies annuelles)				Zone éoclimatique Soudano-guinéenne (1000 à 1500 mm de pluies annuelles)			
Louga		Diokoul		Djinaki		Kabrousse	
Niveau sol	Nb. de rhizobia par g de sol ^a	Niveau sol	Nb. de rhizobia par g de sol	Niveau sol	Nb. de rhizobia par g de sol	Niveau sol	Nb. de rhizobia par g de sol
0.0 m	70	0.0 m	< 1	0.0 m	13000	0.0 m	230
0.5 m	1270	0.5 m	20	0.5 m	32000	0.5 m	42000
2.5 m	90	2.5 m	20	1.0 m	28000	1.0 m	2300
5.0 m	160	4.0 m	50	1.5 m	28000	1.5 m ^b	9180
7.5 m	< 1	6.0 m	< 1	2.0 m	43000		
11.0 m	< 1	8.0 m	< 1	3.0 m	42400		
14.0 m	< 1	10.0 m	< 1	4.0 m	1500		
17.5 m	90	11.5 m	30	4.5 m ^b	1500		
21.0 m	< 1	14.0 m	80				
24.0 m	40	16.5 m ^b	30				
27.5 m	10						
28.5 m	120						
30.0 m	20						
32.0 m	20						
33.5 m	340						
34.0 m ^b	1320						

a Déterminé par MPN.

b Niveau de la nappe d'eau.

Tableau 2. Répartition des souches de *Bradyrhizobium* d'*Acacia albida* en fonction de leur effectivité

Zone écoclimatique Sahélienne (100 à 500 mm de pluies annuelles)				Zone écoclimatique Soudano-guinéenne (1000 à 1500 mm de pluies annuelles)							
Louga				Diokoul		Djinaki			Kabrousse		
Profondeur	E ^a	I ^b	Profondeur	E	I	Profondeur	E	I	Profondeur	F	I
0.5 m	4	4	0.5 m	1	0	0.0 m	1	0	0.0 m	0	1
2.5 m	3	1	2.5 m	0	1	0.5 m	1	0	0.5 m	1	0
5.0 m	0	2	4.0 m	0	1	1.0 m	2	0	1.0 m	1	0
17.5 m	2	2	11.5 m	0	1	1.5 m	2	0	1.5 m ^c	1	0
24.0 m	1	1	14.0 m	0	2	2.0 m	1	0			
27.5 m	1	0				3.0 m	1	0		3	1
28.5 m	0	2		1	5	4.0 m	2	0			
30.0 m	0	2				4.5 m ^c	2	0			
32.0 m	1	1									
33.5 m	0	2					12	0			
34.0 m ^c	0	2									
	12	19									

^a Effective

^b Ineffective

^c Niveau de la nappe d'eau

Tableau 3. Influence de la présence de l'*Acacia albida* sur la distribution des *Bradyrhizobium* dans les sols

Nombre de *Bradyrhizobium* nodulant *Acacia albida*

Profondeur	Sous couvert		Hors couvert		Sous <i>A. albida</i> mort		Sous <i>P. biglobosa</i>	
	Forage 1	Forage 2	Forage 3	Forage 4	Forage 5	Forage 6	Forage 7	Forage 8
0.1-0.2 m	1481 ^a	850	<1	<1	159	27	382	<1
0.6-0.7 m	6300	12	<1	<1	<1	<1	<1	<1
1.1-1.2 ^b m	42	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

^a Les résultats sont exprimés en nombre de rhizobia par gramme de sol.

^b Niveau de la nappe d'eau.

Figure 2. Classification des *Bradyrhizobium* isolés d'*Acacia albida* et d'*Aeschynomene* par analyse des profils protéiques

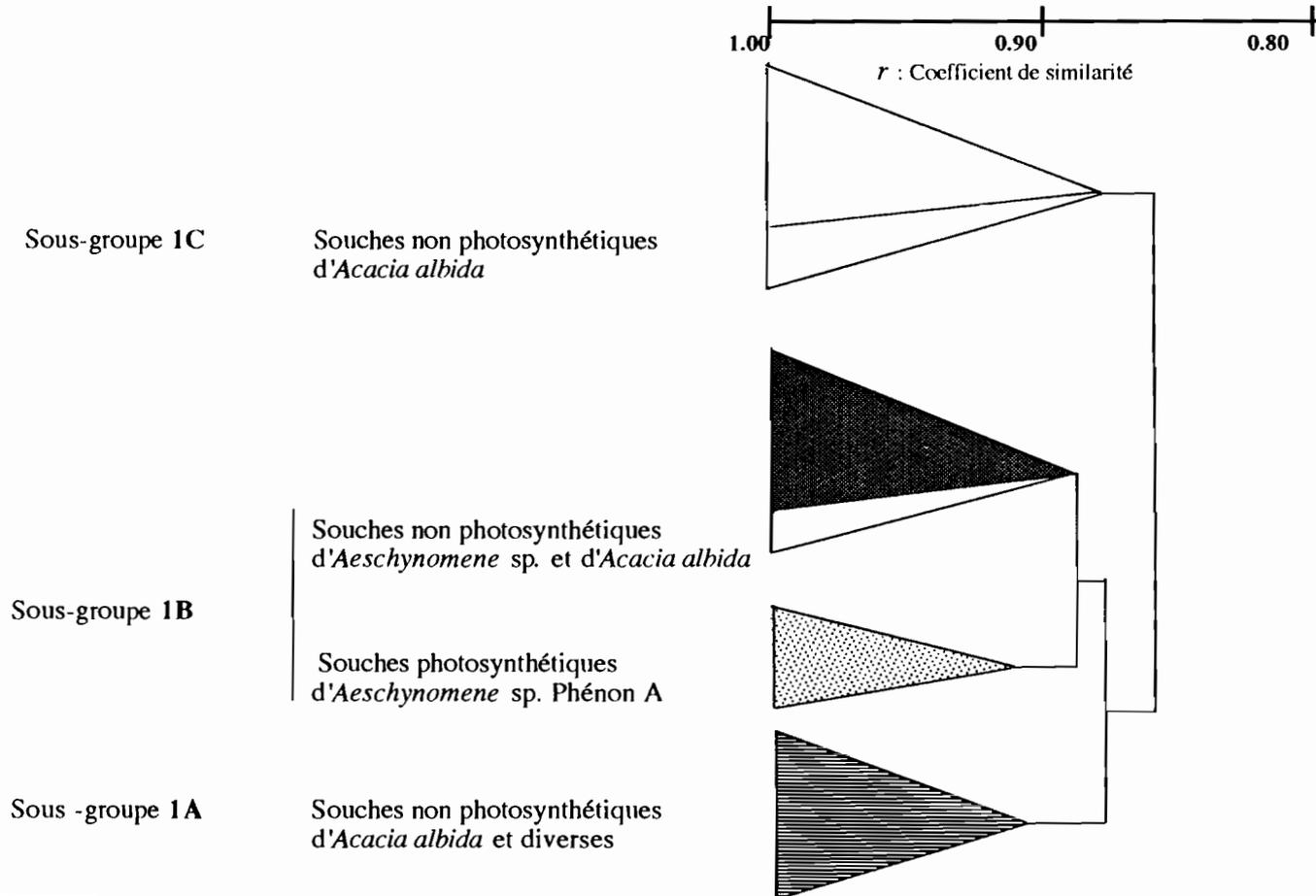


Tableau 4. Infectivité et Effectivité de quelques souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques et non photosynthétiques.

Plante hôte	Souches					
	Non photosynthétiques			Photosynthétiques		
	<i>A. albida</i>	<i>A. elaphrocydon</i>	<i>A. afraspera</i>	<i>A. afraspera</i>	<i>A. indica</i>	<i>A. sensitiva</i>
	ORS101	ORS304	ORS336	ORS322	ORS371	ORS295
Groupe I						
<i>Acacia albida</i>	E	E	I	I	0	0
<i>Aeschynomene elaphrocydon</i>	E	E	I	0	0	0
Groupe II						
<i>Aeschynomene afraspera</i>	I	I	E	E	0	0
Groupe III						
<i>Aeschynomene indica</i>	0	0	0	e	E	E
<i>Aeschynomene sensitiva</i>	0	0	0	e	E	E

E effective, e peu effective, I ineffective, 0 non nodulé

REFERENCES

Abdel Basit H., Angle J.S., Salem S., Gewaily E.M., Kotob S.I. and van Berkum P. (1991). Phenotypic diversities among strains of *Bradyrhizobium japonicum* belonging to serogroup 110. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1570-1572.

Alazard D. (1990). Nitrogen fixation in pure culture by rhizobia isolated from stem nodules of tropical *Aeschynomene* species. *FEMS Microbiol. Letters* 68: 177-182.

Alazard D. (1991). La nodulation caulinaire dans le genre *Aeschynomene*. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard-Lyon I. 176 pp.

Alazard D. and Duhoux E. (1988). Diversity of stem nodulation sites in *Aeschynomene* sp. *J. Plant Physiol.* 132: 123-125.

C.T.F.T. (1988). *Faidherbia albida*. Monographie. Centre Technique Forestier Tropical, CIRAD, Eds. Nogent sur Marne, France. 72 pp.

Dreyfus B. and Dommergues Y.R. (1981). Nodulation of *Acacia* species by fast- and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 97-99.

Evans W.R., Fleischman D.E., Calvert H.E., Pyati R.V., Alter G.M. and Subba Rao N.S. (1990). Bacteriochlorophyll and photosynthetic reaction centers in *Rhizobium* strain BTAi1. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3445-3449.

Fleischman D., Evans W.R., Eaglesham A.R.J., Calvert H.E., Dolan Jr. E., Subba Rao N.S. and Shanmugasundaram S. (1990). Photosynthetic properties of stem nodule *Rhizobia*. In *BNF associated with rice production*. S.K. Dutta and C. Sloger Eds. Oxford & IBH Publishing Co. PVT. LTD., New Delhi. pp. 39-46.

- Hennecke H., Kaluza K., Thöny B., Fuhrmann M., Ludwig W. and Stackebrandt E. (1985). Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen fixing bacteria. *Arch. Microbiol.* 142: 342-348.
- Hollis A.B., Kloos W.E. and Elkan G.H. (1981). DNA DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related Rhizobiaceae. *J. Gen. Microbiol.* 123: 215-222.
- Jarvis B.D.W., Gillis M., and De Ley J. (1986). Intra- and intergeneric similarities between the ribosomal ribonucleic acid citrons of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species and some related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 129-138.
- Jordan D.C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* to *Bradyrhizobium*. A slow-growing root nodule bacterium from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32: 136-139.
- Ladha J.K., Pareek R.P., So R., and Becker M. (1990). Stem nodule symbiosis and its unusual properties. In: *Nitrogen Fixation Achievements and Objectives*. P.M. Gresshoff, L.E. Roth, G. Stacey and W.L. Newton Eds. Chapman and Hall New York, London. pp. 1-8.
- de Lajudie P., Neyra M., Dupuy N., Alazard D., Gillis M. (1991). Diversité des *Rhizobium*, spécificité de nodulation et aptitude à fixer l'azote chez les *Acacias* sahéliens. *Physiologie des Arbres et Arbustes en zones arides et semi-arides*. Groupe d'Etudes de l'Arbre. Paris. France. (sous presse).
- Pfennig N., and Trüper H.G. (1974). Part I. The phototrophic bacteria, In: *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed. R.E. Buchanan and E. Gibbons Eds. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA. pp. 25-75.
- t'Mannetje, L. (1967). A re-examination of the taxonomy of the genus *Rhizobium* and related genera using numerical analysis. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microb. Serol.* 33: 478-491.
- Virginia R.A., Jenkins M.B. and Jarrel W.M. (1986). Depth of root symbiont occurrence in soil. *Biol. Fertility Soils* 2: 127-130.
- Young J.P.W., Downer H.L. and Eardly B.D. (1991). Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* 173: 2271-2277.

**EVALUATION OF AMARANTHUS ACCESSIONS FOR RESISTANCE
TO STEM AND LEAF INFECTIONS CAUSED BY
CHOANEPHORA CUCURBITARUM IN AGO-IWOYE, NIGERIA**

Afolabi ADEBANJO

Department of Biological Sciences Ogun State University
P.M.B. 2002 Ago-Iwoye, Nigeria

Abstract: *Thirty-nine accessions of species and cultivars of Amaranthus were screened in the field for resistance to stem and leaf infections by Choanephora cucurbitarum (Berk. & Rav.) Thaxt. Accessions ranged in resistance from very susceptible (70% weighted infectivity) in a cultivar, NH190-2 to highly resistant (0% weighted infectivity) in Amaranthus varieties: NH 453-1, NH 217 and ED 33-2. Infection of the aforementioned plant parts is suspected to involve a combination of both physical attack and extracellular enzymatic degradation of the host cells by the pathogen, which will ultimately result in the necrosis and death of infected tissues culminating in blighted areas. Cluster analysis was used in an attempt to place the accessions into resistance clusters. Results of the ranking procedure indicated that few, if any, natural clusters exist in the data. It is suggested that accessions that exhibited less than 15% stem infection or 2 cm infected leaf area should be selected for use in breeding programmes to breed in resistance to stem and leaf infection by C. cucurbitarum. Promising accessions included NH 453-1, ED 33-2, NH 217, NH 450-2, and NH 1019A. Accessions NH 441 and NH 1019B may also be included.*

Résumé: *Trente-neuf accessions d'espèces et cultivars d'Amaranthus ont été criblées au champ pour leur résistance aux infections de la tige et de la feuille induites par Choanephora cucurbitarum (Berk. & Rav.) Thaxt. La résistance des accessions variait d'une très grande sensibilité (infectivité pondérée > 100%) pour le cultivar NHA 190-2, à une très grande résistance (infectivité pondérée de 0%) pour A. cruentus, NHA 453-1, NHA 217 et ED 33-2. On a utilisé des techniques de classification statistique pour essayer de regrouper les accessions par classes de résistance. Les résultats de la procédure de classement ont indiqué qu'il y avait peu ou pas de grappes naturelles. On suggère d'utiliser les accessions dont la tige est infectée à moins de 15% ou la surface foliaire à moins de 2,5 cm² dans les programmes de sélection pour la résistance aux infections de la tige et de la feuille causée par C. cucurbitarum. Parmi les accessions prometteuses on trouve NHA 453-1, ED 33-2, NHA 217, NHA 450-2 et NHA 1019A, ainsi que NHA 441 et NHA 1019B.*

The genus *Amaranthus* is comprised of many species, some of which are regarded mainly as weeds (Anon. 1984). Several species of *Amaranthus* are ancient cultivated crops that have recently been rediscovered by western agriculturists. Many species are widely grown and consumed in the tropics (Grubben 1976). In Nigeria, *Amaranthus*, one of the many local vegetables grown, is cultivated throughout the year and consumed as fresh green leaves especially in soup and stew in most areas. It has low caloric value and is a good source of carotene, proteins, vitamins and minerals (Oyenuga 1968). Many species of *Amaranthus* are cultivated for their grains (Pal and Khoshoo 1974), used extensively as ornamentals (Hay and Syngé, 1873), and grown as a source of red dye (Heiser 1964).

The use of resistant cultivars in disease control is most feasible, economic, easy, safe and effective (Agrios 1978). Farmers can thus avoid paying for and using pesticides, which can

also sometimes be risky to use. The major field diseases of *Amaranthus* reported are apical shoot blight, dieback stem and leaf diseases caused by *Choanephora cucurbitarum* (Berk. & Rav.) Thaxt. (Irvine 1969, Maduewesi 1970, Odebunmi-Osikanlu 1977 and Ikediugwu 1981). Thus far, breeders' attention has been focused mainly on increasing yield and other agronomic attributes of *Amaranthus* spp. rather than these major diseases (Denton, pers. comm.). A primary research need in the area of amaranth production is the control of stem and leaf diseases (Odebunmi-Osikanlu 1977). One way to achieve this is to breed for disease-resistance by looking for sources of resistance to these diseases in *Amaranthus* lines from both local and exotic varieties. The objectives of this study were to identify accessions of *Amaranthus* that are resistant to stem and leaf infections by *C. cucurbitarum* and to determine if accessions could be grouped by resistance to shoot infections for use in crop breeding programmes.

MATERIALS AND METHODS

Seed source

All the seeds used for this study were collected from the breeders' seed bank of the National Horticultural Research Institute (NIHORT), Ibadan, Nigeria. The accessions were composed of local and exotic (regional and international sources) varieties of *Amaranthus*. Seeds of 39 *Amaranthus* varieties and breeders' lines were sown in nursery trays by drilling along rows made in the soil and covering them with a thin layer of soil. The accessions were sown in different rows of the trays, appropriately labelled and watered regularly as necessary.

Transplanting was done on 29 May, 1991 four weeks after sowing onto field plots comprised of beds measuring 0.5 x 1 m. The plots consisted of two rows, spaced 50 cm between and within rows and with five plants per row. Altogether, each plot had a total of 10 plants representing each variety. Each plot/variety was replicated twice in a randomized complete block design. Plots were hand weeded whenever necessary during the period of cultivation. Plants were rainfed and there was no fertilizer application. Disease inoculum was from natural sources. Ratings were done on weekly basis for four weeks from five plants randomly selected from each plot on the following parameters: number of stems infected, number of leaves produced, and number of leaves infected. The area of such infected leaves were measured. Percentage of infection was calculated. The incidence of leaf and stem infection of varieties were deduced from the reaction scores and the varieties were placed in categories based on these reactions. The data obtained were subjected to statistical analysis and their means were separated by Duncans Multiple Range Test (DMRT).

RESULTS

Reactions to *C. cucurbitarum* were noted according to disease severity ratings. Among the varieties tested, NH 453-1, ED 33-2 and NH 217 were found to be highly resistant to the pathogen recording no infection either on the leaf or the stem. Two varieties, NH 450-2 and NH 1019A were placed in the resistant category with 9-13% stem infection, eight to nine leaves infected and 3-4 cm infected leaf areas. NH 441 and NH 1019B were categorized as

moderately resistant having 25 and 26% stem infection and eight and 14 infected leaves respectively. Eight other varieties, NH 494, NHA_{C3}(Py), ED 34, NH 46, NH 457, NH 463, NH 493-R and NH 216-2 were moderately susceptible. The percentage stem infection for this group ranged between 29-40%, between three and 12 infected leaves and 3-6 cm infected leaf areas. Among the categories of plants considered so far, NHA_{C3}(Py) (30.0), NH 1019B (19.5) and NH 46 (17.4) were the varieties that produced the highest number of leaves. Further results along these lines appear in Table 1.

Twenty-four of the accessions were susceptible to *C. cucurbitarum*. Out of these, 14 varieties had 40-49% stem infection, 5-21 infected leaves and the lesion size varied between 4-7 cm. Eight varieties recorded 50-59% stem infection, 9-10 of the leaves were infected with lesion size varying between 5-7 cm. Two of the varieties, ALRI and NH 190-2 had 60 and 70% stem infection and lesion size on the leaves were between 2-8 cm. Three varieties, NHA_{C3}, (Bl) ED 1040 and ED 1043 produced the highest number of leaves among the susceptible group (Table 2).

The symptoms of the disease either on the leaf or the stem commenced as a pinhead spot on any portion of the plant parts most often as water-soaked areas. These are often accompanied by a discolouration of the infected zone. The water-soaked areas rapidly spread to other healthy areas causing necrosis of the tissue and tissue death culminating in lesions or blighted areas. Severe attacks usually aided by warm humid weather often resulted in dieback or breaking/snapping of the supportive stem. A diagram of the varieties evaluated is displayed in a histogram to demonstrate the frequency in 10% interval stem infectivity groups. The only trend here is in concentration of number of varieties toward a particular infectivity level with a tendency for the varieties to exhibit intermediate levels of infectivity to stem infection than to exhibit either extreme infectivity level (Fig. 1).

DISCUSSION

The variation in the reaction of the different varieties to leaf and stem infection could be an expression of inherent genetic variability within the varieties. Sealy (1988) similarly observed variability of *Amaranthus* accessions to damping-off caused by *Pythium myriotylum*. Differences in the nutritional status of the soil within the plots which in turn determines plant vigour could also account for differences in infection. The highest percentage infection were recorded on the stem with the exception of the highly resistant varieties. This was to be expected since it has been reported that *C. cucurbitarum* is soil-borne (Adesunloye 1983) rain splashes could get the inoculum of the pathogen from the soil onto stems that were directly in contact with the soil.

Varieties with larger lesion sizes on leaves (mostly the susceptible accessions) should be of interest to breeders since this will adversely affect photosynthetic activity, which in turn will affect growth and productivity either for the leaf or grain. Efforts should be made to reduce the size of lesions. Attempts should also be made to reduce stem infection because severe stem infection could lead to snapping and the eventual death of the entire plant. The cultivars with the highest number of leaves also deserve breeders' attention as the leaves are important

for consumption and are also a major factor in photosynthesis and grain filling. The greater the number of leaves, the higher the output of the crop in both cases.

Table 1. Reactions of some *Amaranthus* varieties of varying intensity⁺ of leaf and stem infections* incited by *Choanophora cucurbitarum* at Ago-Iwoye

Test variety	% stem infected	No. leaves produced	No. leaves infected	Area leaves infected (cm)	Host** reaction
NH 453-1	0.00 o	0.00 n	0.00 n	0.00 k	HR
ED 33-2	0.00 o	0.00 n	0.00 n	0.00 k	HR
NH 217	0.00 o	0.00 n	0.00 n	0.00 k	HR
NH 450-2	9.30 no	10.00 klm	5.00 klm	3.98 fghij	R
NH 1019A	13.40 n	13.00 efg hijkl	8.50 fghijkl	3.40 hij	R
NH 441	25.10 m	15.00 cdefgh	7.75 ghijkl	4.28 defghi	MR
NH 1019B	26.30 ml	19.50 b	14.30 c	5.35 cdefg	MR
NH 494	29.10 klm	16.00 bcdef	9.25 defghij	5.00 cdefgh	MS
NHAC ₃ (Py)	29.80 jklm	30.00 a	3.25 mn	5.83 bcd	MS
ED 34	35.00 ijklm	13.50 efg hijk	10.00 defghij	3.70 ghij	MS
NH 46	35.90 ijklm	17.40 bcd	11.90 cdef	5.68 bcde	MS
NH 457	37.00 hijklm	14.00 defghij	8.75 efg hijk	4.70 cdefgh	MS
NH 463	38.40 ghijkl	11.80 ghijkl	6.88 hijklm	5.13 cdefg	MS
NH 493-R	39.40 fghijk	16.50 bcde	10.50 cdefghi	4.78 cdefgh	S
NH 216-2	40.00 fghijk	13.00 efg hijkl	9.75 defghij	2.88 ij	MS

+ Means having same alphabet(s) within column are not significantly different at 0.05 % probability level by the Duncan's Multiple Range Test (DMRT). * Values are means for 10 plants and four assessment dates. **HR = Highly resistance, R = Resistant, MR = Moderately resistant and MS = Moderately susceptible.

There is an interesting interaction between the plant and the infecting microorganism. The organism had to be in physical contact with the plant parts that were so infected. Spots were formed as a result of mechanical pressure exerted on the plant parts by the infecting hyphae. Agrios (1987) also confirmed mechanical damages by germinating spores on host surfaces. After gaining entrance successfully into the host tissue, the organism secreted enzymes to degrade the cells. This was confirmed by our observations that infection of plant parts appeared as small spots often as water-soaked areas.

Ikediegwu (1981) similarly suspected enzymatic involvement in infection of *Amaranthus* shoot parts. The extracellular enzymatic degradation of the host cells by the pathogen was a device to kill such cells before colonization. These ultimately resulted in necrosis and death of such infested tissues culminating in lesions or blighted areas on the plant parts.

Maintaining a diverse gene pool is clearly desirable in a breeding programme as relatively new as the one for *Amaranthus* in Nigeria and other parts of West Africa. Breeders may thus find it useful to include varieties that exhibit zero or less than 15% stem infection or 2 cm lesion size in the breeding programme. These include many accessions with divergent biochemical, growth and use characteristics, but all with relatively high levels of resistance to stem and leaf infection. Promising varieties included NHA 453-1, ED 33-2, NH 217, NHA 450-2 and NH 1019A. Accessions NH 441 and NH 1019B are also good for inclusion in such a programme.

Table 2. Reactions of some *Amaranthus* varieties of varying intensity⁺ of leaf and stem infections* incited by *Choanophora cucurbitarum* at Ago-Iwoye

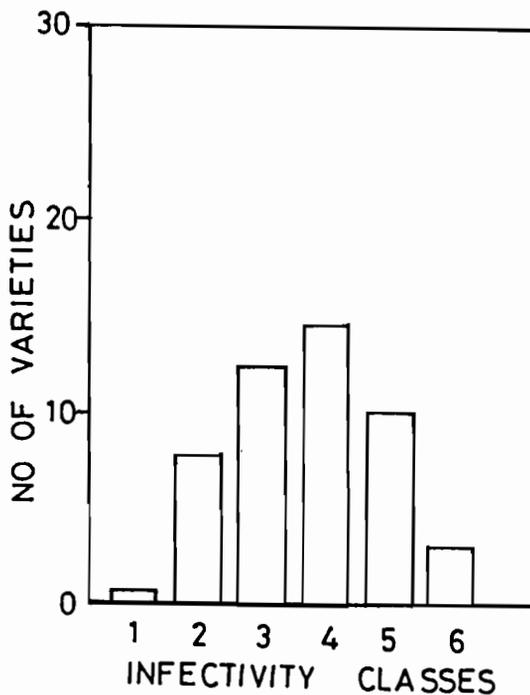
Test variety	% stem infected	No. leaves produced	No. leaves infected	Area leaves infected (cm)	Host** reaction
ED 1043	40.60 efghijk	18.50 bc	12.80 cd	4.13 efghij	S
RL	41.20 efghijk	9.50 lm	6.25 jklm	5.40 cdef	S
ED 1040	42.20 efghij	30.50 a	21.80 a	4.48 cdefghi	S
NH 190-1	42.80 efghij	15.50 cdefg	12.50 cde	4.18 defghij	S
NH 193	43.80 efghi	12.00 ghijkl	7.25 hijkl	5.95 bc	S
NHA _C 49	45.10 defghi	16.50 bcde	11.80 cdef	7.05 ab	S
NH 215-2	45.80 defghi	11.50 hijklm	9.75 defghij	4.85 cdefgh	S
NH 443-1	46.10 cdefghi	12.50 fghijkl	11.50 cdefg	6.03 bc	S
ED 33-1	47.00 bcdefghi	10.50 jklm	9.50 defghij	4.20 defghij	S
NH 191	47.30 bcdefghi	14.50 defghi	12.30 cdef	6.10 bc	S
NHA _{C3} (B1)	47.30 bcdefghi	30.00 a	17.50 b	3.98 fghij	S
NH 445-1	47.30 bcdefghi	14.00 defghij	10.80 cdefgh	5.73 bcde	S
NH 444	48.00 bcdefghi	12.50 fghijkl	10.30 defghi	4.63 cdefgh	S
NH 218	49.80 bcdefgh	8.00 m	4.75 lm	3.90 fghij	S
NH 452	50.40 bcdefgh	13.00 efghijkl	10.50 cdefghi	5.35 cdefg	S
NH 493-1	51.60 bcdefg	10.50 jklm	8.50 fghijkl	5.95 bc	S
NH 445-2	52.70 bcdef	16.50 bcde	9.75 defghij	5.73 bcde	S
NH 216-1E	52.90 bcdef	13.00 efghijkl	10.80 cdefgh	4.93 cdefgh	S
NHA _m 114	53.80 bcde	14.00 defghij	11.50 cdefg	7.03 ab	S
NH 463	57.80 bcd	16.00 bcdef	11.80 cdef	7.05 ab	S
NH 216-IL	59.30 abc	11.00 ijklm	9.25 defgij	5.78 bcde	S
NH 216	59.60 ab	16.00 bcdef	10.00 defghij	4.78 cdefgh	S
ALRI	60.30 ab	15.50 cdefg	12.50 cde	7.80 a	S
NH 190-2	70.30 a	14.00 defghij	6.75 ijklm	2.65 j	S

+ Means having same alphabet(s) within column are not significantly different at 0.05% probability level by the Duncans Multiple Range Test (DMRT). * Values are means for 10 plants and four assessment dates. **S = Susceptible.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial assistance was provided for this study by the International Foundation for Science (IFS). The International Institute of Tropical Agriculture (IITA) allowed the use of its computer facilities. Both are gratefully acknowledged. Mr Deji Ajibola provided technical assistance and the National Horticultural Research Institute (NIHORT) supplied the seeds used for free.

Figure 1. Frequencies of *Amaranthus* stem cultivars infected naturally by *Choanephora cucurbitarum* in weighted classes. The infectivity classes are 1 = 0% infectivity, 2 = > 5% and $\geq 10\%$, 3 = > 10% and < 41%, 4 = > 40% and < 51%, 5 = > 50% and < 61% and 6 > 69% infectivity.



REFERENCES

- Adesunloye, M.O. (1983). Persistence of okra pathogen (*Choanophora cucurbitarum*) in the soil. B.Sc. Project Report, University of Ife, Ile-Ife, Nigeria. 50 pp.
- Agrios, G.N. (1978). *Plant Pathology*. Academic Press, New York. 703 pp.
- Anon. (1984). *Amaranth*. *Modern Prospects for an Ancient Crop*. National Academy Press, Washington, D.C. 81 pp.

- Grubben, G.J.E. (1976). The cultivation of amaranth as a tropical leaf vegetable (with reference to Southern Dahomey): Communication 67, Dept. of Agric. Res., Amsterdam. 207 pp.
- Hay, R. and Synge, P.M. (1873). The colour dictionary of flowers and plants for home and garden. Crown Publishing Inc., New York. 373 pp.
- Heiser, C.B. Jr. (1964). Sangoranche, an amaranth used ceremonially in Ecuador. *Am. Anthropol.* 66: 948-950.
- Ikediegwu, F.E.O. (1981). A shoot disease of *Amaranthus* spp. in Nigeria associated with *Choanephora cucurbitarum*. *J. Hort. Sci.* 56: 289-293.
- Irvine, F.R. (1969). *West African Crops*. 3rd Edition. Oxford University Press, London. 272 pp.
- Maduewesi, J.N.C. (1970). Role of Microbiology and Microbiologists in plant protection. *Symposium Proc. Niger. Soc. Microbiol.* 1: 45-72.
- Odebunmi-Osikanlu, Y.O.K. (1977). The more important diseases of selected local vegetables in Nigeria. *Niger J. Pl. Protec.* 3:79-83.
- Oyenuga, V.A. (1968). Nigeria's foods and feeding stuff: their chemistry and nutritive value. Ibadan University Press, Ibadan, Nigeria. 15 pp.
- Pal, M. and Khoshoo, T.N. (1974). Grain amaranth. *In: Evolutionary Studies in World Crops: Diversity and Change in the Indian Subcontinent.* J. Hutchinsonson, Ed. Cambridge University Press, London, pp 129-137.
- Sealy, R.L. (1988). Evaluation of *Amaranthus* accessions for resistance to damping-off by *Pythium myriotylum*. *Plant Disease.* 72: 985-989.

EVALUATION OF SORGHUM GENOTYPES FOR RESISTANCE TO BACTERIAL LEAF STREAK

Temam HUSSIEN
Alemaya University of Agriculture
P.O. Box 138, Dire Dawa, Ethiopia

Abstract: *Sorghum* genotypes ($n = 120$) were grown at Alemaya Research Centre (Eastern Ethiopia) for initial screening. The materials were grown in clay pots filled with an autoclaved mixture of soil, manure and sand (3:1:1). The clay pots were maintained at 11 to 28° C in a greenhouse. Four-week-old seedlings were inoculated with mixed bacterial suspension of selected virulent isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *holcicola* (Xch). Disease reactions were recorded 14 days post inoculation on a standard rating scale of 1 to 9. The same materials were evaluated under field condition for three consecutive years (1989-91) to confirm results from the initial screening using an infector-row technique. Infected leaves obtained from previously infected plantings were used as inoculum. This was supplemented by spraying the plants with bacterial suspension to enhance disease epidemics. Disease evaluations were made twice during the season, at flowering and soft dough stages. Overall plant performance was also evaluated using the 1-5 rating scale. Out of the 120 sorghum genotypes examined for resistance to Xch in the greenhouse, 31 lines were classified as resistant, 35 moderately resistant and 54 lines susceptible. The susceptible checks performed as expected and the average disease rating on the most susceptible variety ETS 2111 was 6 on the 1 to 9 scale. When studied in the field, favourable conditions for disease development were observed throughout the test period (814 mm precipitation and a temperature range of 10-29°C). The majority of the genotypes (87.5%) were classified as resistant (reaction type ≤ 3); 5% were moderately resistant and 7.5% were susceptible. The mean disease rating on the susceptible checks ranged from 5.0 to 6.3. When the 31 genotypes that showed seedling resistance were considered, a close correlation between the results of greenhouse and field evaluations were obtained. In this study it was possible to identify 25 sorghum genotypes resistant to sorghum bacterial leaf streak both at the seedling and adult stages of growth with the desirable agronomic characteristics. These genotypes could form the basis for a breeding programme to develop sorghum cultivar more resistant to this disease. However, the stability of these sources of resistance should be tested at several hot-spot locations. In addition, the genetic composition of these materials may need to be thoroughly studied in order to understand the mode of inheritance.

Résumé: Lors d'un premier criblage au Centre de recherche Alemaya, dans l'est de l'Ethiopie, 120 génotypes de sorgho ont été cultivés en vases d'argile remplis d'un mélange autoclavé de sol-sable-fumier (3-1-1) et placés dans une serre maintenue à une température de 19 à 28°. Des plantules de quatre semaines ont été inoculées avec des suspensions bactériennes mixtes d'isolats virulents sélectionnés de *Xanthomonas campestris* pv. *holcicola* (Xch). Des infections ont été constatées sept jours après l'inoculation selon un barème de 1 à 9. Ce même matériel a été évalué au champ pendant trois années successives (1989-91) afin de vérifier les résultats du criblage initial en utilisant une technique par bande infectante. Des feuilles infectées à partir de plants précédemment malades ont servi d'inoculum. En outre, une suspension bactérienne a été pulvérisée sur les plantes pour stimuler la propagation de l'épidémie. La maladie a été évaluée à deux reprises au cours de la saison: à la floraison et au stade pâteux, selon un barème de 1 à 9. L'aspect général de la plante a été également évalué selon une notation de 1 à 5. Parmi les 120 génotypes de sorgho examinés pour leur

résistance au Xch en serre, 31 lignées ont été classées comme résistantes, 35 comme modérément résistantes et 54 comme sensibles. Les résultats des témoins sensibles ont été conformes aux prévisions et la note moyenne de la variété la plus sensible ETS 2111 était de 6 sur le barème de 1 à 9. Des conditions favorables au développement de la maladie au champ ont été observées pendant toute la période de l'essai (précipitations 730 mm, températures de 10 à 24°C). La plupart des génotypes (87,5%) ont été classés comme résistants (type de réaction classé inférieur ou équivalent à 3), 5% comme modérément résistant et 7,5% comme sensibles. La note moyenne de maladie des témoins sensibles allait de 5,0 à 6,3. Dans le cas des 31 génotypes ayant une résistance au stade de la plantule, la corrélation était étroite entre les résultats en serre et les évaluations au champ. Dans cette étude, on a identifié 25 génotypes ayant de bonnes caractéristiques agronomiques et une résistance aux stades plantule et plante adulte. Ces génotypes pourraient servir de base à un programme de sélection de cultivars plus résistants à la maladie des stries bactériennes après vérification de la stabilité de la résistance sur plusieurs sites endémiques.

Sorghum (*Sorghum bicolor* [L.] Moench.) is one of the most important cereals grown mainly as a rainfed crop in Ethiopia, where it is widely grown in the highlands, lowlands and semi-arid regions. Over 1.2 million tons of sorghum grain is produced on about 0.9 million hectares. About 90 percent of the produce is used for human consumption and the rest for home-made beverages (Berhane and Yilma 1979, Central Statistics Office 1987). Sorghum is susceptible to a number of pathogens and pests.

Among the many known sorghum diseases, bacterial leaf streak, incited by *Xanthomonas campestris* pv. *holcicola* (Xhc), is a problem of higher magnitude in most sorghum-growing countries, including Ethiopia (Tarr 1962, Frederiksen 1986, Temam 1990). Sudangrass, broomcorn, and johnsongrass are additional hosts (Frederiksen 1986).

This particular disease has been reported to be endemic in many sorghum fields of Ethiopia from year to year and is widely distributed in all sorghum-growing areas of the country (Mengistu 1982, Temam 1990). Severe infection of this disease occurs naturally on susceptible sorghum genotypes in the experimental fields of the Alemaya University of Agriculture (Crop Protection Annual Research Report 1987). The loss due to this disease has not been quantified in Ethiopia. However, considering the leaf damage it can cause under favorable weather conditions, grain losses are thought to be considerable.

Although bacterial leaf streak has the potential to cause heavy losses in sorghum in Ethiopia, little is done to control the disease. Stable broad-spectrum resistance must be located and incorporated into the high yielding genotypes to minimize the possibility that improved high-yielding sorghum will be vulnerable to epidemics of this disease. The presence of resistant factors in agronomically acceptable sorghum varieties was reported in an earlier study (Yeshi and Mengistu 1985) on varietal resistance under greenhouse conditions.

This study was therefore undertaken to investigate and identify sorghum genotypes resistant to bacterial leaf streak such that these materials could be incorporated in the sorghum breeding programme to create a broader and more stable genetic base for the crop.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and characterization of the pathogen

Small slices of tissue (approximately 1 cm²) were removed from the advanced portion of an infected leaf. The tissues were surface-sterilized for three minutes in a 1:9 dilution of household bleach (5.25% active sodium hypochlorite) and washed in sterile distilled water. These sections were triturated in 4 ml of sterile 12.5 mMPO₄ buffer (P^H 7.2) by using a sterile mortar and pestle. The resulting suspension was serially diluted with sterilized PO₄ buffer. The diluted suspensions were streaked with a wire loop onto yeast extract-dextrose-calcium carbonate agar (YDCA) (Schaad 1988).

The plates were incubated at 27 to 28°C for 72 hours and were examined for bacterial colonies. Single colonies of the suspected pathogens were transferred to fresh YDCA plates. Pathogenicity was verified by inoculating 4-week-old sorghum seedlings (cultivar ETS 2111) grown under greenhouse conditions (11 to 28°C). The results were recorded two weeks after inoculation. The preparation of the inoculum and the inoculation method used are described hereafter. The pathogenic isolates were maintained on YDCA slants at 4° C. Yellow pathogenic isolates were used for characterization of the bacteria. Isolates of the suspected pathogen were characterized using the following tests: gram reaction, starch, casein and gelatin hydrolysis, arginine dihydrolase production, oxidase reaction, nitrate reduction, malonate and citrate utilization and acid production from carbohydrates (Dye 1980, Fahy 1983, Schaad 1988, Schaad and Stall 1988).

Greenhouse screening for resistance

Sorghum seeds were planted in clay pots (20 cm diam) filled with an autoclaved mixture of soil: sand: manure (3:1:1) and 400 mg urea per pot. About 10 seeds were planted in drills and thinned to five plants per pot 15 days after planting. Four-week-old seedlings were inoculated with mixed bacterial suspensions of selected virulent isolates of Xhc, namely, AL-27-1, AL-27-3, BAB-3-1, and JIG-4-2 collected from the areas of Alemaya, Babille and Jijiga. Leaves were rubbed with carborandum and sprayed with bacterial suspension. Control plants were inoculated with sterile distilled water using the same method and afterwards the potted seedlings were arranged in a 11 x 11 lattice design in the greenhouse and covered with a transparent perforated plastic sheet. The seedlings were sprayed with water every two hours to maintain high humidity. All inoculations were performed in the greenhouse and were maintained at average day and night temperatures of 28°C and 11°C, with relative humidity ranging from 44 to 90.5% and a mean of 67.25%. The inoculum was prepared by growing cells from YDCA slant cultures in nutrient broth with vigorous agitation at 27°. Cells were suspended in PO₄ buffer and cell concentrations were adjusted to 10⁹ cells/ml prior to inoculation (Schand 1988).

Pathogenicity results and/or disease reactions were determined two weeks after inoculation on a scale of 1 to 9 where 1 = no sign of streaks; 2 = 2.5%; 3 = 5%; 4 = 10%; 5 = 20%; 6 = 35%; 7 = 75%; 9 = 100% leaf area infected (James 1971, Sharma 1980). Individual disease ratings of plants in the three replications were averaged to derive the treatment means.

Cultivars receiving grades 1 to 3 were considered resistant; those scoring 4 to 5 were moderately resistant and those with grades of 6⁺ were susceptible (Sharma 1980).

Field screening for resistance

A set of 120 sorghum genotypes and two susceptible checks were evaluated for resistance to bacterial leaf streak using infector-row technique under artificial infection (Sharma 1980). Entries were planted in two rows of 3.75 m length in a randomized complete block design with three replications. Spacing between rows and plants were 75 and 25 cms, respectively. The trial was fertilized with 150 kg DAP/ha during planting and 100 kg urea/ha at knee height. Cultivation, weed and insect control were done following the recommended standard for the crop. Disease epidemics were enhanced by growing a thick population of two susceptible varieties AL-70 and ETS-2111 around the test entries. ETS-2111 was also sown as an indicator row between plots at a length of approximately 5 m. Infector and indicator rows were inoculated at three growth stages: start of tillering, stem elongation and booting with the pathogen. Inoculation was performed in two ways: the first was done by applying approximately 1 g of dry finely ground infected leaves in the whorl of each plant.

The second inoculation was performed by spraying with bacterial leaf streak suspension of local isolates collected from naturally infected leaves. The suspension was sprayed using a hand-operated sprayer two days after the first inoculation. All inoculations were done late in the evening at about 4:00 to 5:00 p.m. The weather data (temperature, rainfall and relative humidity) during the season was recorded. Disease evaluations were made twice during the season, at flowering and at soft dough development stages. Plants were given a disease rating from 1 (clean) to 9 (100% leaf area infected); then individual disease ratings of plants in the three replications were averaged to derive the treatment means. The number of plants per replicate varied depending on availability and variability of seeds of each entry. Total plants tested per entry ranged from 30 to 60 per plot.

Cultivars were categorized into reaction groups on the basis of treatment means; 1 = highly resistant; 2 to 3 = resistant; 4 to 5 = moderately resistant; 6 to 7 = susceptible and 8 to 9 = highly susceptible. Cultivars were selected not only on the basis of disease resistance but also on their desirable agronomic characteristics using the 1 to 5 scale: 1 = very good; 2 = good; 3 = average; 4 = below average and 5 = poor (House 1985).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and characterization of the pathogen

Twenty yellow bacterial colonies were isolated from infected sorghum leaves collected from three different places; 10 isolates were from Alemaya, six were from Babille and the rest from the Jijiga area. As a result of pathogenicity, morphological, physiological and biochemical tests only four isolates, namely, AL-27-1, AL-27-3, BAB-3-1 and Jij-4-2 fit the characteristics of *Xanthomonas campestris* P.v. *holcicola* (Elliott) Dye (Table 1). These isolates were used for greenhouse screening.

Greenhouse screening for resistance

Under greenhouse conditions, about 26 percent (31 entries) of the material tested was found resistant; 35 entries (about 29 percent) were moderately resistant and the rest were susceptible. The difference in disease intensity among the 120 sorghum lines was significant ($P < 0.05$). Comparison of pairs between test entries and the control indicated that 35 percent of the test entries had lower levels of infection as compared with the susceptible control (ETS-2111). Most of the resistant lines were derived from either exotic x exotic or exotic x indigenous crosses while some were indigenous collections. Most of the resistant materials were selected for cool growing conditions of the highlands (> 1900 m.a.s.l) of Ethiopia.

One cultivar, IS 158 x(ETS 2113)⁴, with highly resistant reaction was among advanced sorghum lines selected for agronomic excellence and apparent resistance to most of foliar diseases at different locations including Alemaya (Abebe Menkir 1986). The exotic sorghums were lowland types introduced from ICRISAT, the Middle East, and the Near East and were characterized by tan plant colour (Mashilla Dejene 1988). According to Frederikson and Franklin (1980) characteristics such as tan plant colour, thick waxy leaves, erect leaves and the like, are believed to be associated with leaf disease resistance. These characteristics, particularly tan plant colour, has effectively been used in sorghum breeding. The susceptible genotypes included cross derivatives from exotic x exotic and exotic x indigenous crosses as well as local collections. The highly susceptible accessions were either purely local materials, susceptible introductions or crosses between the two groups. For instance, WB77, Muyra White, PGRC/E Acc. No. 262, Meta Hara Collection, Wegere, AL-70, etc. were among the local collections.

Field screening for resistance

In the field, conditions favourable for disease development were observed throughout the test period (814 mm precipitation, and temperature range of 10 to 29°C). Most of the genotypes (87.5 percent) were apparently resistant (reaction type, < 3). Five percent of the materials were classified as moderately resistant and the rest (7.5 %) were susceptible. The mean disease rating on the susceptible checks, AL-70 and ETS 2111, ranged from 5 to 6.30 on the scale of 1 to 9.

Among the 31 sorghum genotypes selected for their resistance in the greenhouse, five lines showed highly resistant reactions while 26 lines were resistant under field conditions. In this study it was noted that the assessment for resistance in seedlings was positively correlated ($r = 0.60$) with ratings of adult plants in the field. All the genotypes that were resistant under greenhouse conditions were also resistant under field conditions. However, those that were susceptible under greenhouse conditions showed variable degrees of reaction, ranging from resistant to susceptible, under field conditions. The higher percentage of resistant reaction observed under field conditions as compared with that of the greenhouse test, could be due to the use of less virulent isolates from Alemaya which were used for field inoculation as opposed to the mixture of isolates from three locations (Alemaya, Babille and Jijiga) used for greenhouse inoculation. Sorghums such as IS 158, 79 SEPON # 391, etc and the local

collections 17 BGM 117, etc appear to be good sources of resistance against bacterial leaf streak, as shown by the pedigrees or parental lines of some of the resistant genotypes.

This study generally revealed 25 sorghum genotypes (Table 2) with desirable agronomic characteristics as well as seedling and adult plant resistance to sorghum bacterial leaf streak. These genotypes could form the basis for a breeding programme to develop sorghum cultivars resistant to this disease.

Table 1. Biochemical and physiological characteristics of *X. campestris* pv. *holcicola*

Characteristic	I s o l a t e s			
	AL-27-1	AL-27-3	BAB-3-1	JJJ-4-2
Gram reaction	-	-	-	-
- Motility	+	+	+	+
- Yellow colonies on YDC	+	+	+	+
- Mucoid growth on YDC	+	+	+	+
- Starch hydrolysis	-	-	-	-
- Casein hydrolysis	+	+	+	+
- Gelatin liquifaction	-	-	-	-
- Arginine dihydrolase	-	-	-	-
- Oxidase reaction	-	-	-	-
- Nitrate reduction	-	-	-	-
- Citrate utilization	-	-	-	-
- Malonate utilization	+	+	+	+
Acid production form:				
. Arabinose	+	+	+	+
. Fructose	+	+	+	+
. Galactose	+	+	+	+
. Glucose	+	+	+	+
. Glycerol	-	-	-	-
. Maltose	-	-	-	-
. Mannose	+	+	+	+
. Sucrose	+	+	+	+

+ = Positive reaction

- = Negative reaction

However, the present work alone cannot be considered conclusive, although it will hopefully contribute to future work for the satisfactory control of sorghum bacterial leaf streak in Ethiopia. Moreover, current work at the AUA must be strengthened to ensure a sound conclusion. It is therefore suggested that the stability of these resistant genotypes be tested at several hot-spot locations in Ethiopia in future work. In addition, the genetic composition of these materials may need to be thoroughly studied in order to understand the mode of inheritance.

Table 2. Reactions of 25 selected sorghum genotypes to *Xanthomonas campestris* pv *holcicola* under greenhouse and field conditions at Alemaya

No.	Identification/ pedigree	Disease score (1-9 scale)		Agronomic characteristics (1-5 scale)
		Greenhouse*	Field**	
1	ETS-02454	1.00	2.33	2.0
2	87 AL-4069	1.00	1.33	1.5
3	Jaru # 5	1.00	1.67	2.5
4	G.P.C.AL-1987 # 460	1.00	1.67	2.0
5	IS 158 x (ETS 3235) ⁴	1.00	2.00	3.0
6	ETS - 3235	1.00	2.00	3.0
7	IS 158 x (ETS 2113) ⁴	1.00	1.00	1.0
8	85 PGRC/E Acc. # 105	1.00	1.00	2.0
9	86 MW # 5228 (YE - 126x17 BGM 117 x IS 9439)	1.00	2.00	2.0
10	85 MW # 5354 (RS/R-20- 8614-2 x IS 9521)	1.00	2.00	2.0
11	85 MW # 5606 (RS/R-20- 8614-2 x IS 9293)	1.00	2.00	2.5
12	85 PGRC/E Acc # 166	2.00	1.67	2.0
13	ETS - 2247	2.33	1.67	1.5
14	G.P.C AL-1987 # 54	2.20	1.67	3.0
15	G.P.C AL-1987 # 715	2.20	1.67	2.0
16	G.P.C AL-1987 # 716	2.50	1.67	2.5
17	G.P.C AL-1987 # 725	2.20	2.00	2.0
18	AL - 1988 NVT - 2 # 5	2.20	1.67	2.5
19	AL - 1988 NVT - 2 # 8	2.30	1.33	2.5
20	85 PGRC/E Acc. # 278	2.20	1.00	2.0
21	1989 AL - HESPVT - 2 # 1	3.10	2.00	2.0
22	AL - 1988 NVT - 2 # 11	3.20	1.67	2.0
23	Muyra Red	3.33	1.67	2.0
24	AL - 1988 HESPVT - 1 # 21	4.67	1.00	2.0
25	Al - 1988 HESPVT - 1 # 15	5.00	1.33	2.0

G.P.C. = Germplasm Collection * = averages of two experiments

** = averages of three replications in three years test

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to express his sincere thanks to Ato Abeselom Seyoum and other research assistants of the Crop Protection Section, Department of Plant Sciences, Alemaya University of Agriculture for their diligent effort in conducting trials and collecting data. The material and financial support provided by the Alemaya University of Agriculture and the International Foundation for Science (IFS) is also gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Abebe Menkir and Yilma Kebede. (1986). Incorporating anthracnose resistance into indigenous sorghums. *Eth. J. Agric. Sci.* 7: 99-107
- Berhane G/Kidan and Yilma Kebede. 1979. The traditional culture and yield potential of the Ethiopian high lysine sorghum. *Eth. J. Agric. Sci.* 1: 29-40.
- Central Statistical Authority. (1987). Time Series Data on Area, Production and Yield of Major Crops 1979/80 - 1985/86. Statistical Bulletin 56. Addis Ababa, Ethiopia.
- Crop Protection Annual Research Report. (1987). Alemaya University of Agriculture, Department of Plant Sciences. Alemaya, Ethiopia.
- Dye D.W. (1980). *Xanthomonas*. In: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. N.W. Schaad, Ed. American Phytopathological Society. St. Paul, MN. pp. 45-49.
- Fahy P.C. and Persley G.J., Eds. (1983). *Plant Bacterial Diseases: A Diagnostic Guide*. Academic Press, Inc., New York. 393 pp.
- Frederiksen R.A. and Franklin D. (1980). Sources of resistance to foliar diseases of sorghum in the International Disease and Insect Nursery. In: *Sorghum diseases - A world review*. Proceedings of the International Workshop on Sorghum Diseases, 11-15 December 1978. ICRISAT, Patancheru, A.P., India. pp 265 - 268.
- Frederiksen R.A., Ed. (1986). *Compendium of Sorghum Diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 82 pp.
- House L.R. (1985). A Guide to Sorghum Breeding, 2nd Edn. Patancheru, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- James W.C. (1971). A Manual of Disease Assessment Keys for Plant Diseases. Can. Dept. Agric. Pub. 1458. 80 pp.
- Dejene Mashilla. (1988). Evaluation of sorghum (*Sorghum bicolor*) lines for resistance to leaf anthracnose and characterization of *Colletotrichum graminicola* isolates. M.Sc. Thesis Alemaya University of Agriculture.
- Mengistu Huluka (1982). Diseases of sorghum at some locations in Ethiopia. *Eth. J. Agric. Sci.* 4: 45-53.
- Schaad N.W. (1988). Initial identification of common genra. In: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 2nd Edition. N.W. Schaad, Ed. The American Phytopathological Society, St. Paul. MN. 164 pp.
- Schaad N.W. and Stall R.E. (1988). *Xanthomonas*. In: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 2nd Edition. N.W. Schaad, Ed. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN 164 pp.
- Sharma H.C. (1980). Screening of sorghum for leaf disease resistance in India. In: *Sorghum Diseases- A World Review*. Proceedings of the International Workshop on Sorghum Diseases, 11-15 December 1978. ICRISAT, Patancheru, A.P, India. pp. 249-264
- Tarr S.A.J. (1962). Diseases of Sorghum, Sudan Grass and Broom Corn. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 380 pp.
- Temam Hussien (1990). A review of sorghum disease research in Ethiopia. In: *IFS (International Foundation for Science) 1990. Proceedings of a Regional Seminar on Cereals of the Semi-Arid Tropics*. September 12-16, 1989, Garoua, Cameroon. pp. 253-257.
- Yeshi Adnew and Mengistu Huluka (1985). Characterization of isolates of bacterial streak (*Xanthomonas campestris* pv. *holcicola* (Elliot) Starr and Bruk.) and reaction of some sorghum varieties to the disease. *Eth. J. Agric. Sci.* 7: 99-107.

INDUCTION DE LA TOLERANCE AU *PSEUDOMONAS SOLANACEARUM* CHEZ LA TOMATE PAR L'UTILISATION DE LA VARIATION SOMACLONALE EN CULTURE *IN VITRO*

Elie NSIKA-MIKOKO

Laboratoire de Phytopathologie Département de Biologie et Physiologie Végétales
Faculté des Sciences B.P. 69 Brazzaville, Congo

Résumé: Dans le but d'exploiter la variation somaclonale produite après mise en culture *in vitro*, et induire une tolérance au flétrissement bactérien de la tomate causé par *Pseudomonas solanacearum*, il a été mis au point une méthode d'inoculation artificielle des bactéries sur cals avant la régénération des plantes. Après avoir mis en place un milieu de culture permettant la régénération des cals obtenus après la mise en culture *in vitro* des cotylédons excisés des jeunes plants de tomate, après avoir isolé une souche bactérienne et mis au point des conditions permettant la conservation et le maintien du pouvoir pathogène, des tests d'inoculations artificielles ont été réalisés avec l'objectif de sélectionner après régénération, des plants plus ou moins tolérants en utilisant la variation somaclonale, accompagnée d'une forte pression de sélection imposée par la présence des bactéries dans le milieu de régénération. La néoformation des plantules a été possible, clonées par bouturage, et ces plantules seront testées en serre en présence de bactérie. Ce programme sera complété par une étude histologique comparée de jeunes plants *in vitro*.

Abstract: In order to capitalize on the somaclonal variation produced through *in vitro* growth and induce tolerance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in tomatoes, an artificial method is used to inoculate bacteria in the callus before the regeneration of the plant. A culture medium was used that provided for the regeneration of callus obtained from *in vitro* culturing of cotyledons excised from young tomato plants. A bacterial strain was isolated, and conditions that maintained the pathogenic capacity were developed. Then, artificial inoculation tests were carried out for the purpose of the post-regeneration selection of plants that were more or less tolerant. Somaclonal variation was used, but selection played an important role because of the presence of bacteria in the regeneration medium. Seedling neoformation was possible. Seedlings were cloned by way of cuttings and then tested in the greenhouse in the presence of bacteria. This programme will be completed by a comparative histological study of the young *in vitro* plants.

Jusqu'à il y a une vingtaine d'années, les lois de Mendel et leurs conséquences immédiates ont constitué la base cohérente sur laquelle ont reposé les différents programmes d'amélioration génétique des plantes. Les sélectionneurs portaient leur attention sur les croisements entre les différents génotypes au sein des espèces cultivées et la fixation de nouveaux génotypes obtenus en vue de faire les variétés les plus homogènes possibles. Les progrès en génétique quantitative ont permis des extrapolations sur les caractères polygéniques, alors que les connaissances en cytogénétique ouvraient la voie vers les hybridations interspécifiques (Sprague *et al.* 1959, Demarly 1977).

Ces différentes techniques souvent combinées aux connaissances extensives des objectifs des programmes et aux réactions des plantes ont été à la base de la création des nouvelles variétés. C'est à partir des progrès dans ce sens que les rendements de maïs ont augmenté de 25 % ces 10 dernières années alors que la productivité en huile de palme est passée à

600%. Ces 10 dernières années, la possibilité d'obtenir des plantes entières à partir de la mise en culture *in vitro* des tissus et d'organes de certaines espèces végétales, et surtout les possibilités de créer parmi les plantes régénérées une variation dite somaclonale (Sibi 1976, Deshayes 1976, 1978, Nsika-Mikoko 1982, Chagvar Dieff 1985, Schlyah 1990, Aaouine 1990) n'a pas laissé indifférent les responsables des programmes d'amélioration des plantes. Parmi ces variations après passage par le stade cal en culture *in vitro*, on a signalé les modifications sur les caractères morphologiques, forme, texture, couleur; les caractères physiologiques: aptitude aux modifications de milieu de culture; et accroissement de la résistance aux herbicides, aux maladies virales bactériennes et aux nématodes. Dans ce sens, nous avons entrepris la culture *in vitro* des cotylédons excisés des jeunes plants de tomate âgés de quatre semaines afin d'y pratiquer des tests sur cals.

MATERIEL ET METHODES

Sur les jeunes plants de trois variétés de tomate dont les caractéristiques ont été décrites (Nsika-Mikoko 1989) des cotylédons ont été excisés et mis en culture sur un milieu de culture synthétique (Murashige et Skoog 1962). Des cals ont pu être obtenus dans des conditions axéniques, les repiquages se faisant tous les 15 jours d'une part. D'autre part nous avons à partir d'une tige de plante infectée par la bactérie *Pseudomonas solanacearum*, isolé la bactérie qui a été caractérisée de la manière suivante: c'est une bactérie dont le métabolisme respiratoire est oxydatif, elle possède une catalase, ne produit pas de levane et n'hydrolyse pas l'amidon. La réaction d'hypersensibilité sur le tabac donne une réponse positive au bout de 24 heures (Boukoulou 1987, Nsika-Mikoko 1989). L'isolat a été conservé dans des conditions permettant le maintien du pouvoir pathogène.

Disposant d'une part des cals sur milieu nutritif gelosé et d'une souche bactérienne, nous avons introduit dans le milieu de culture après dilution, un millilitre de suspension bactérienne, la solution ainsi préparée est susceptible de renfermer 5000 bactéries au ml (Boher, 1987). Après régénération des plantes, ces dernières ont été multipliées par bouturage dans des pots en terre cuite de 12 cm de haut sur 14 cm de diamètre du côté de l'ouverture.

RESULTATS

Plusieurs plantes ont pu être régénérées à partir des milieux ne contenant pas de bactéries, la variation que se produit s'exprime surtout du point de vue morphologique à savoir: opposition des feuilles 3 et 4, se traduisant par l'absence d'un entrenoeud et qui conduit à des plantes plus courtes par rapport au phénotype normal ceci pour la variété TM103. En présence de bactéries, sept plantes seulement ont été régénérées ceci à partir des cals de la variété locale (5) et la variété PT778 (2).

Ces plantes régénérées ont été mises en terre puis multipliées par bouturage avant leur mise à fleurs. Le tableau no. 1 indique les principaux résultats obtenus sur la régénération.

Tableau 1. Résultats des régénérations après inoculation des bactéries

Variétés	TC 103			PT 778			Locale My 104		
Nbre de repiquages	1	5	8	1	5	8	1	5	8
Nbre de plantes régénérées (témoins)	36	43	21	28	35	17	19	15	23
Nbre de plantes régénérées tolérantes				-	2	0	-	-	5

Après la mise à fruits, les graines ont été prélevées et mises en terre dans les conditions naturelles de culture. Au stade 7 feuilles, des inoculations artificielles ont été réalisées. Sur les descendances par l'autofécondation de plantes régénérées en présence de bactéries, et jusqu'au stade premier bouquet floral (qui est en général le stade d'apparition des symptômes du flétrissement bactérien), nous n'avons noté aucun signe de flétrissement, ce qui traduit une certaine mémorisation du caractère "Tolérance au flétrissement bactérien".

Si au cours des autofécondations suivantes, le phénomène pouvait se maintenir, la culture *in vitro* pourrait donc apparaître comme une source par laquelle on pourrait induire une tolérance au flétrissement bactérien provoqué par *Pseudomonas solanacearum*. Pilowsky et Zutra (1986) sont arrivés à des résultats similaires en travaillant sur tomate avec une souche de *Pseudomonas syringae* PV tomato. Signalons que dans notre cas, ne sont présentés ici que les résultats préliminaires, il nous faudra par la suite examiner au niveau des descendances après autofécondations s'il s'agit des mutations qui ont conduit à la manifestation de cette tolérance ou alors si c'est le phénomène variation somaclonale qui s'est réellement manifestée.

Nsika-Mikoko (1982), montrait qu'il pouvait se produire des mutations après une certaine durée de vie du matériel sur milieu en culture synthétique. Dans tous les cas qu'il s'agisse d'une mutation ou de l'expression d'une variation somaclonale après passage en culture *in vitro*, ceci témoigne de la souplesse de l'expression des gènes sur le chromosome, dans le noyau et la cellule entière (Demarly, 1989). En effet, l'existence des introns, des exons des éléments d'insertion, les transposons, ainsi qu'une coopération des *Pseudogènes* dans une séquence, peut faire apparaître des séries d'adaptations à des situations données.

Ces études qui doivent être complétées par une partie histologique quant à l'impossibilité de pénétration ou de multiplication de la bactérie, devraient conduire à la mise au point d'une variété résistante susceptible de passer dans le processus de culture dans les régions aux sols contaminés. Cette technique de contamination artificielle de cals avant la régénération des plantes présente plusieurs avantages. C'est un modèle simple, reproductible et rapide, ne présentant aucun danger pour la dissémination du pathogène, mais encore permettant de travailler sur un espace réduit avec une grande quantité de matériel.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aaouine M. (1990). Cours sur les Cultures *in vitro*.
- Boher B. (1967). Les bactéries des plantes cultivées en République Populaire du Congo. Communication présentée lors du séminaire sur la Plante et l'Homme. Brazzaville 4-6 mars 1987. 6 pp.
- Boukoulou A. (1987). Comportement de quelques variétés de tomate vis à vis d'un ennemi tellurique *Pseudomonas solanacearum*. Mémoire de Diplôme d'Ingénieur de Développement Rural. I.D.R. Université Marien NGouabi/B/ville 42 pp.
- Chagvardieff P. (1985). L'utilisation de la variabilité exprimée spontanément en culture, en vue de l'amélioration des plantes. *Bull. soc. bot., Fr.*, 132, Actual. bot., 3/4, 37-103.
- Demarly Y. (1977). Génétique et Amélioration des Plantes. Masson éditeur Paris.
- Demarly Y. (1989). Technical aspects of plant biotechnologies in Plant Biotechnologies for Developing Countries. Proceedings of an International Symposium organized by CTA and FAO. 26-30 June 1989. Luxembourg. pp. 47-58.
- Deshayes A. (1976). Effet des cycles successifs de néoformations de bourgeons *in vitro* sur l'aptitude à la variation somatique chez un mutant chlorophyllien de *Nicotiana tabacum* var Samsun. *Mutation Research* 35: 221-246.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* Vol. 15: 473-497.
- Nsika-Mikoko E. (1982). Analyse de la variabilité dans la descendance des plantes obtenues par culture *in vitro* de tissus somatiques de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Thèse de 3e cycle. Université de Paris Sud Orsay. 118 pp.
- Nsika-Mikoko E. (1987). La bactériose de la tomate en République Populaire du Congo. Communication présentée lors du séminaire sur la Plante et l'Homme. Brazzaville 4-6 mars 1987. 9 pp.
- Nsika-Mikoko E. (1989). Le flétrissement bactérien: un handicap à la culture de la tomate au Congo. Annales de l'Université du Bénin. Série Sciences Tome IX: 36-48.
- Pilowsky M. and Zutra D. (1986). Reaction of different tomato genotypes to the bacterial speck pathogen (*Pseudomonas syringae* Pv tomato). *Phytoparasitica* 14 (1): 39-42.
- Schlyah H. (1990). Cours sur les cultures *in vitro*. IAVHII Agadir Maroc 7 mai. 15 juin.
- Sibi M. (1976). La notion de programme génétique chez les végétaux supérieurs: Aspect expérimental obtention de variants par culture *in vitro* sur *Lactuca sativa* L. Apparition de vigueur chez les croisements. Annales amélior. Plantes 26.
- Sprague, G.F. *et al.* (1959). Recurrent selection for specific combining ability and type of gene action involved in yield heterosis in corn. *Agron. Jour.* 51: 992-994.

**THE EFFECTS OF HEIGHT OF STAKING AND SIZE
OF PLANTING SETT ON SOME ASPECTS OF GROWTH
OF WATER YAM (*DIOSCOREA ALATA* L.)
AND ANTHRACNOSE DISEASE SEVERITY**

A.O. NWANKITI

University of Agriculture P.M.B 2373 Makurdi, Nigeria

Abstract: The effects of five planting sett sizes (100, 150, 200, 250 and 300 g) and five staking heights (0, 1, 2, 3 and 4 m) on anthracnose disease severity, vine length, LAI, tuber yield and tuber size of anthracnose disease-susceptible cultivar of water yam, *D. alata* were investigated. The trial was conducted on a sandy loam soil at Umudike in Eastern Nigeria. Tuber yields increased while disease severity decreased with increasing size of planting setts. Sett sizes of 250 g with staking to 4 m reduced anthracnose severity significantly and resulted in optimum tuber yield.

Résumé: Cette étude est relative à l'effet du poids des semenceaux (100, 150, 200, 250 et 300 g) et de la hauteur de palissage (0, 1, 2, 3 et 4 m) sur plusieurs caractéristiques d'un cultivar de l'igname de palissage, *Dioscorea alata*, sensible à l'anthracnose: intensité de la maladie, longueur des ramifications de la plante, indice de surface foliaire, rendement et taille des tubercules. L'essai a été conduit sur sol sablo-limoneux à Umudike dans l'est du Nigéria. On a constaté que les rendements des tubercules croissaient et l'intensité de la maladie diminuait à mesure que le poids des semis augmentait. Des poids de semenceaux de 250 g et des tuteurs de 4 m entraînaient une diminution significative de la maladie et un rendement optimum des tubercules.

Nigeria produces about 13.6 million tons of yams from 1.344 million hectares. This accounts for 76% of the world yam production. One of the most serious problems encountered in yam production is the intensive labour requirement of the crop, especially with regard to staking.

Another major constraint (especially for the water yam *D. alata*) is the anthracnose disease. This disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* Penz affects the foliar part of the crop causing the defoliation and complete death of the stand (Nwankiti 1980, 1984).

Early planting and early staking have been reported as control measures for the disease. It has been reported that non-staking of yam causes drastic reductions in yield (Waitt 1960, 1961; Lyonga, Fayemi and Agboola 1973; Okigbo 1973). The taller the stake, the greater the yield, up to a stake height of about three metres.

The yield increases that result from staking have been attributed to better leaf display and to the more efficient hand-weeding in staked than unstaked crops (Onwueme 1978).

Moreover, staking keeps the shoots away from the soil surface from which the shoots may pick up pathogens (Onwueme 1978, Nwankiti 1984). Brown (1981) had shown that staked yams gave yields over 60% higher than those that were not staked.

A number of people have shown that the sett size of the yam (*Dioscorea* spp.) affects growth (Enyi 1972, Onwueme 1972) and yield (Miege 1957, Baker 1964, Enyi 1972, Onwueme

1978). Yield generally tends to increase with increasing sett growth size. Larger setts emerge earlier, grow more vigorously, and produce greater plant dry weights and higher mean tuber bulking rates (Onwueme 1972, Nwoke *et al.* 1972, Enyi 1972).

The objective of this experiment is to study the effect of sett size and height of stakes on the growth and yield of susceptible cultivar of *Dioscorea alata* cv Obunaenyi and their subsequent effect on anthracnose disease.

MATERIALS AND METHODS

Five staking heights (0, 1, 2, 3 and 4 m) and five sett sizes (100, 150, 200, 250 and 300 g) were investigated in a 5 x 5 factorial design arranged in three randomized complete blocks, using *D. alata* cv Obunaenyi as a test crop. The experiment was conducted in 1983 and 1984 on a sandy loam soil at the experimental farm of the National Root Crops Research Institute, Umudike, Nigeria.

The soil had been in bush fallow for three years. Setts were planted at approximate depths of 9 cm on the crest of 1-metre ridges at a spacing of 100 cm within ridges. No fertilizer was applied. Nett plot size was 6 m x 6 m. The number of plants emerging from each plot was recorded at two and four weeks after planting in the 1984 trial.

Two complete plants taken at random were harvested from each plot at two and four months for growth analyses. The crop was scored for severity of anthracnose disease at three and five months on a scale of 0-5. Tuber yield and yield components were determined at eight months when the crop was finally harvested.

RESULTS

Emergence and foliage development

The effects of height of staking and sett size on plant emergence and foliage development are summarized in Table 1. While the height of staking did not affect percentage sprouting significantly, the effect of sett size was significant at ($P=0.01$). In 1984, at both two weeks and four weeks after planting, sprouting was higher at larger sett sizes (≥ 200 g) than at smaller sett sizes ≤ 200 g).

The number of leaves per stand was not significantly influenced by either of the factors in 1983, but the effects in 1984 were highly significant ($P=0.01$) particularly at four months after planting, at which time the number increased from 192 per stand to 504 per stand at 100 and 300 g sett sizes, respectively.

Leaf number also increased from 236 per stand with no staking to 427 per stand at the three metre staking height. Similarly, there was a highly significant ($P = 0.01$) increase in LAI

from 0.94 at 100 g to 2.56 at 300 g, giving up to 172% increase. Staking increased LAI significantly from a mean of 1.24 for unstaked plots to 2.13 for plots staked at a height of four metres.

The length of vine increased significantly with an increase in staking height (Fig. 1A) although differences between staked plots and the unstaked control were not significant except in 1983 when the unstaked control plots had significantly longer vines than the yams staked to a height of one metre.

The only significant differences ($P=0.5$) in length of vine among sett sizes were obtained between the 100 gm and 300 g sett sizes (Fig. 1B).

Disease development

Spots had been noticed on the lower leaves in all plots irrespective of treatments but subsequent development of the anthracnose disease was more rapid in unstaked plots and those staked to a height of one metre, particularly on stands originating from small sett sizes.

Differences in disease severity scores at five months between the unstaked and staked plots were significant in 1983 and 1984 ($P=0.001$). However, differences among the staked plots were significant only in 1983, though in both years severity decreased with the height of staking (Fig. 1C).

Yams from smaller setts had significantly more severe incidence than those from larger setts (Fig. 1D).

Tuber yield and yield components

Tuber yields were generally higher in 1983 than in 1984; mean yields were 9.45 and 5.86 t/ha, respectively. Though differences among staked plots were not significant, staked plots significantly outyielded the unstaked controls (Fig. 2A). Tuber yields significantly increased with increases in sett size ($P = 0.001$) (Fig. 2B).

Mean yields at 100 g and 300 g sett sizes in 1983 were 7.2 and 11.1 t/ha, respectively, while in 1984 they were 3.1 and 8.4 t/ha, respectively.

Tuber size both years was significantly influenced by staking height and the response was more marked in 1983 than in the 1984 planting seasons. Tuber size in 1984 increased from 216 g/tuber at 100 g sett size to 418 g/tuber at 300 g. As with tuber yield, tuber sizes were larger in 1983 than in 1984 for identical sett sizes.

Means for 1983 and 1984 were 482 and 325 g/tuber, respectively. Tuber numbers were significantly influenced by sett size ($P = 0.01$) but not by staking height (Table 1). Generally,

more tubers/stand and higher number of marketable tubers (≥ 100 g) were harvested at higher sett sizes up to the 200 g sett size.

DISCUSSION

The essence of an integrated management of pests and diseases is the combination of several methods of control, each of which may be ineffective when employed alone. Such an integrated control measure was investigated in this study - the control of anthracnose disease of water yam by the use of optimum staking height and planting sett size.

An earlier experiment (Nwankiti, Okpala and Odurukwe 1984) had advocated control by planting in early March when the incidence of the disease is low. Also, adequate fertilization, particularly with K reduces incidence of the disease.

In this trial the higher tuber yields and generally more vigorous development of the crop in 1983 than in 1984 may be due to differences in time of planting. Planting was done in early March in 1983 but in late April in 1984.

The results of this study show an increase in yield and a decrease in the severity of attack of the disease with increasing planting sett size. This decreased severity may be partially due to the more vigorous growth and resistance of plants from larger sett sizes.

Again, the increased yields with larger setts may be due to the earlier emergence and more vigorous development of plants originating from larger setts (Ferguson *et al.* 1984) and also the longer period for tuber bulking and tuber development.

According to Onwueme (1973) large setts sprout more and produce more sprouts per sett than smaller setts. These ensure that at least a shoot takes over as the main shoot when one or more of the sprouts is damaged during emergence. Hence the greater percentage emergence in larger setts.

Vine diameter, number of leaves per stand and leaf area per stand are also greater for the larger setts, perhaps a consequence of the greater amount of the food material initially available to the large sett plant (Onwueme 1978).

These give the plant a vigorous initial growth which is an advantage that lasts throughout the season (Nwoke *et al.* 1973). Also, plants from larger setts produce a greater number of sprouts, each of which can develop into a separate plant after the connecting material rots away (Onwueme 1973).

Increased yields with staking are consistent with earlier reports (Waite 1960; Lyonga, Fayemi and Agboola 1973; Okigbo 1973). This may be partially attributed to the greater leaf display to the sun and the higher efficiency in conversion of the incident solar radiation. Also the

lower incidence of disease may be due to the fact that the vines are raised from the ground to reduce contact with soil-borne pathogens.

The response of yams to the height of staking is both cultivar- and location-specific. In Ghana, it has been shown that extra long stakes had no special advantage. De Gens (1973) cites work in Ghana in which yields were increased from 4 t/ha without stakes to 11.8t/ha with 3.7 m stakes and to 12.6 t/ ha with 1.8 m stakes.

A shortage of stakes and high labour demands of staking have been identified as major constraints in yam production, next to availability of planting material, in many parts of the yam- producing areas of West Africa.

In the savanna areas of Nigeria, stakes are a luxury. The height of staking is low, usually less than one metre as the broken and bent stalks of the previous year's guinea corn serve as stakes. In the rainforest areas, the reduction of length of fallows as a consequence of the rapid increase in population and development projects has contributed to the scarcity of staking materials.

It is suggested that the appropriate optimum seeding rate should be 2500-3000 kg/ha which is more in line with the rates used in Trinidad. Onwueme (1978) recommends setts weighing 150-300 g for commercial yam production.

Though larger setts provide greater yields per stand, the yields per unit weight of planting material tends to decrease as the sett size increases. It is also suggested that planting 250 g setts with the early rains and staking to a height of at least three metres would reduce the incidence of anthracnose, and increase yields and farmers returns on their investment.

ACKNOWLEDGEMENTS

I gratefully acknowledge the International Foundation for Science (IFS) for providing funds for this work.

REFERENCES

- Baker E.F.I. (1964). Plant population and crop yield. *Nature* 204: 856-857.
Brown D.H. (1931). The cultivation of yams. *Trop. Agric. Trin.* 8(9): 231-6.
Enyi B.A.C. (1972). The effects of seed size and spacine on growth and yield of lesser yam: *Dioscorea esculenta*. *Ann. Appl. Biol.* 72: 221-229.
Enyi B.A.C. (1973). Growth, development and yield of some tropical root crops. Third Symp. Trop. Root Crops, Ibadan, Nigeria.
Ferguson T.U., Haynes P.H. and Spence J.A. (1984). The effect of sett size, sett type and spacing on some aspects of growth, development and yield in White Lisbon Yams (*D. alata* L.). In: *Proceedings, 6th Symposium Tropical Root Crops, Lima, Peru.* pp. 649-655.
Lan de Gens (1973). Root crops: Yams. In: *Fertilizer guide for the tropics and subtropics.* Centre d'Etude de l'Azote. Zurich. pp. 215.

- Lyonga S.N., Fayemi A.A. and Agboola A.A. (1973). Agronomic studies on edible yams (*Dioscorea* spp.) in the grassland plateau region of the United Republic of the Cameroons. *Proceedings of the Third Symposium of the International Society for Tropical Root Crops*. pp. 240-346.
- Miege J. (1957). Influence de quelques caractères des tubercules semences sur la levée et le rendement des ignames cultivées. *J. Agric. Trop. Bot. Appl.* 4: 315-342.
- Nwankiti A.O. and Okpala E.U. (1980). Anthracnose of water yam in Nigeria. In: *Tropical Root Crops, Research Strategies for the 1980s*. E. Terry, K. Oduro, and F. Caveness, Eds. pp. 166-172.
- Nwankiti A.O. (1984). Effect of time of staking on the development of anthracnose disease and yield of water yam (*Dioscorea alata*). *Ann. Appl. Biol.* 104: 575-576.
- Nwankiti A.O., Okpala E.U. and Odurukwe S.O. (1984). Effect of planting dates on the incidence and severity of anthracnose/blotch disease complex of *Dioscorea alata* L. caused by *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. and subsequent effect on the yield. *Beitrag trop. zur Landwirtschaft und Veterinarmedizin* 22 H.3, 285-292.
- Nwoke F.I.O., Njoku E. and Okonkwo S.N.C. (1973). The effect of size of seed yams on yield of individual plants of *Dioscorea rotundata*. Third Int. Symposium Trop Root Crops, Ibadan, Nigeria.
- Okigbo B.N. (1973). Effects of cultivations and heights and directions of staking on yield and general performance of eight yam cultivars. *Proceedings of the Third Symposium of the International Society of Tropical Root Crops*. pp. 347-358.
- Onwueme I.C. (1972). Influence of the weight of the planted tuber on the vegetative performance of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir) plants. *Niger. Agric. J.* 9: 170-173.
- Onwueme I.C. (1978). Sett weight effects on time of tuber formation and tuber yield characteristics in water yam (*Dioscorea alata* L.). *J. Agric. Sc. Camb.* 91: 317-319.
- Perrin R.K., Winkelmann D.K., Moscardi E.R. and Anderson J.R. (1976). From Agronomic data to farmer recommendations. An Economic Training Manual. Information Bulletin 27, International Maize and Wheat Improvement Centre, Apartado Postal 6-641. Mexico.
- Waitt A.W. (1960). *Yam trials. Report of the Department of Agricultural Research, Nigeria*. 1958-59. pp. 13-14.
- Waitt A.W. (1961). *Yams. Report of the Department of Agricultural Research, Nigeria 1959-60*: pp. 16-19.

Figure 1. Influence of height of staking and size of planting sett on vine lengths and severity of anthracnose disease of *D. alata*

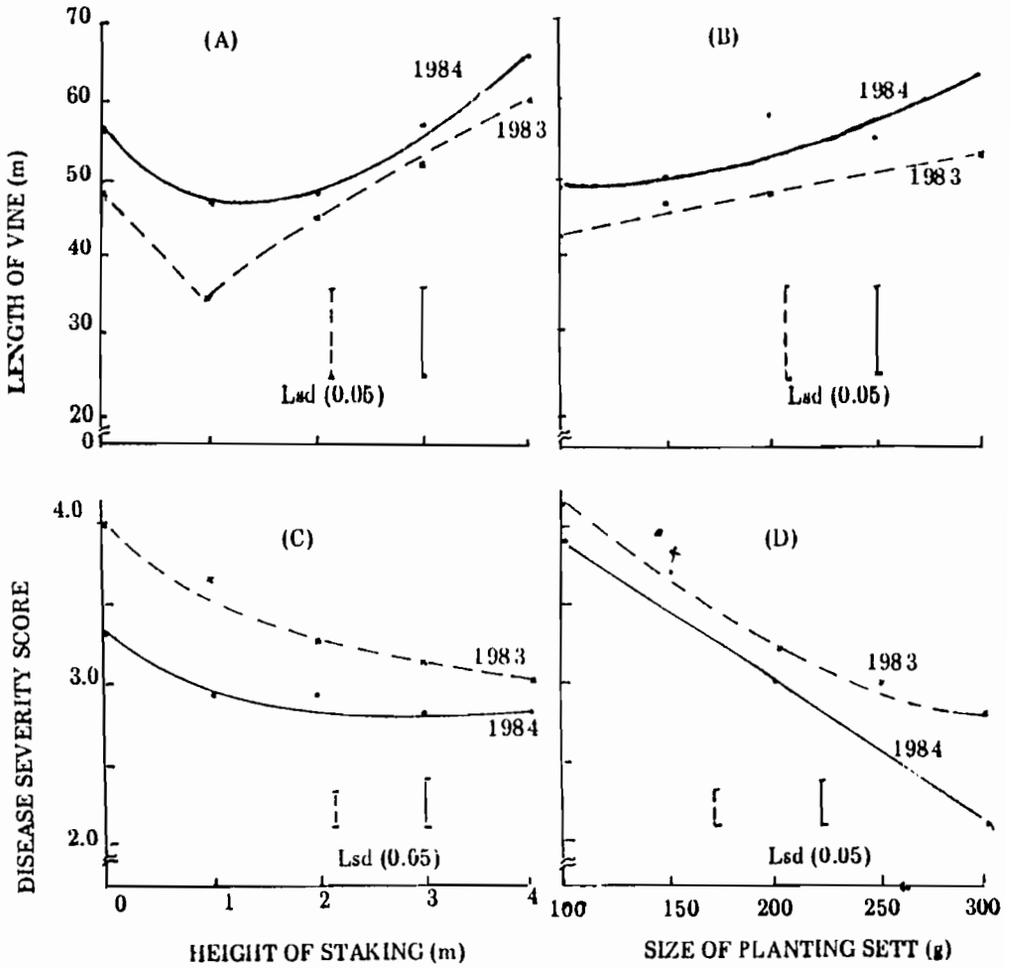


Figure 2. Influence of height of staking and size of planting sett on tuber yield and size in *D. alata*

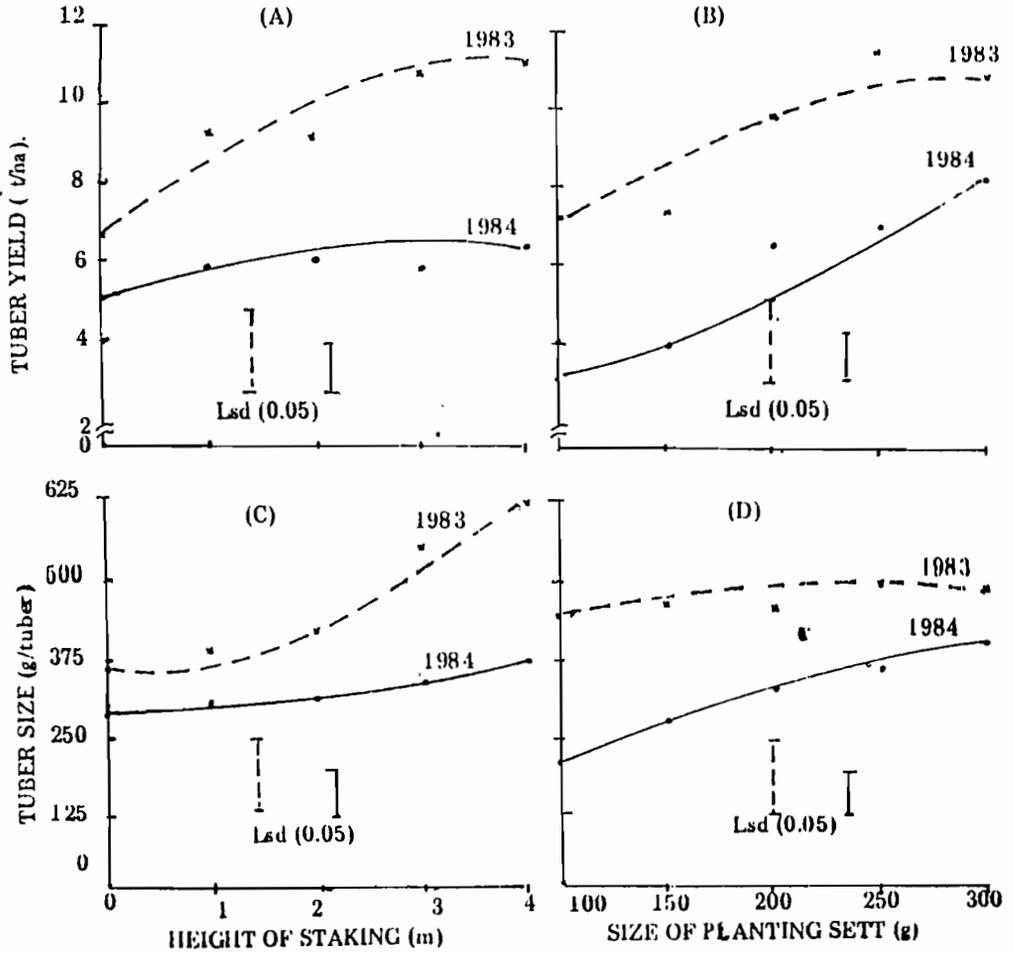


Table 1. Effects of staking height and sett size on sprouting and canopy development and number of tubers/stands in *D. alata* (1984)

Factors and Level Staking height (m)	(A) % Sprouting		(B) No. of Leaves/Stand		(C) LAI	(D) Number of Tubers/Stand
	2 weeks	4 weeks	2 months	4 months		
0	36.8	66.3	108	236	1.24	1.41
1	34.6	66.8	165	314	1.43	1.43
2	38.4	63.3	167	364	1.94	1.37
3	35.6	65.1	168	423	2.31	1.45
4	37.8	65.9	162	427	2.13	1.37
Sett size (g)						
100	22.9	54.7	94	192	0.94	1.21
150	29.1	62.6	151	217	1.16	1.41
200	27.5	62.0	102	414	2.25	1.46
250	53.2	72.8	190	438	2.34	1.39
300	56.5	65.9	233	504	2.56	1.57
LSD (0.05)	5.1	7.2	65	89	0.51	0.13
LSD (0.01)	7.4	9.6	87	129	0.68	0.18

FLUTED PUMPKIN LEAF-SPOT DISEASE MANAGEMENT IN SOUTHEASTERN NIGERIA

Martin I. NWUFO

Department of Crop Protection - Federal University of Technology
P.M.B. 1526 Owerri Nigeria

Abstract: Five fungicides, Anvil, Benlate, Captaf, Difolatan and Dethane M45 were evaluated in the laboratory for controlling spore germination and mycelial growth of *Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema, Dorenb and Van Kest, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz and *Corynospora casiicola* (Berk. and Curt.) Wei, the fungi causing leaf-spot diseases of fluted pumpkin, *Telfairia occidentalis* Hook. f. in Southeastern Nigeria. The fungicides were also tested in the greenhouse and field for their effectiveness in controlling leaf-spot diseases of fluted pumpkin. A field study was conducted to determine the effects of planting dates, staking heights, fertilizer treatments and sprinkler irrigation on the leaf spot diseases of fluted pumpkin. The fungicides inhibited the spore germination and mycelial growth of the three fungi to varying degrees. Spraying at bi-weekly intervals with Benlate, Captaf and Anvil significantly reduced leaf-spot diseases of fluted pumpkin in the field trials. Although all the fungicides reduced disease significantly and increased yield over control, Benlate was highly cost effective and beneficial in on-farm trials. Plant growth and marketable yields were observed to be better for April crops than with June, August and September crops. Similarly, the incidence and severity of leaf-spot diseases were higher for the April planting dates than the others. Crops planted in September seemed to escape the disease. Staking of the crops at two metres was found to reduce the incidence and severity of the diseases and was also found to be best for marketable yield, fruit size and number. Urea resulted in the least disease severity while sulphate of ammonia resulted in the highest disease severity. Crop canopy was denser and soil moisture content was higher with irrigation regimes. Incidence and severity of the leaf-spot diseases increased with sprinkler irrigation.

Résumé: Cinq fongicides, (Anvil, Benlate, Captaf, Difolatan et Dithan M45) ont été évalués en laboratoire en vue d'inhiber la germination des spores et la croissance mycélienne de *Phoma sorghina* (Sacc) Boerema, Dorenb et Van Kest, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz et *Corynospora casiicola* (Berk. et Curt.) Wei, agents pathogènes de la maladie des taches foliaires du *Telfairia occidentalis* Hook f. dans le sud-est du Nigéria. Les fongicides ont aussi été testés en serre et au champ pour évaluer leur efficacité comme moyen de contrôle, et une étude de terrain a été conduite pour déterminer l'effet de la date de semis, de la hauteur des piquets, des traitements de fertilisation, et de l'irrigation par aspersion sur l'évolution de ces maladies. Les fongicides inhibent la germination des spores et la croissance mycélienne des trois champignons à des degrés divers. La pulvérisation bi-hebdomadaire de Benlate, Captaf, et Anvil entraîne une diminution significative des taches foliaires de *T. occidentalis* sur les parcelles d'essai. Bien que tous les fongicides permettent une diminution significative de la maladie et un rendement accru par rapport au témoin, le Benlate s'est avéré le plus efficace et rentable lors des essais en parcelles paysannes. On a constaté que la croissance de la plante et les rendements commercialisables étaient meilleurs pour les récoltes du mois d'avril que pour celles de juin, août, et septembre. De même, l'incidence et la sévérité des maladies foliaires était plus élevée en avril qu'à d'autres périodes de semis. Il est apparu que les semis de septembre échappaient à la maladie. Il semble que le piquetage à 2 m d'intervalle ait permis d'atténuer l'incidence et l'intensité des maladies, et d'accroître le rendement commercialisable, ainsi que le nombre et la taille des fruits. L'application d'urée réduit au

maximum l'intensité de la maladie alors que le sulfate d'ammonium provoque l'effet contraire. La densité du couvert végétal et l'humidité du sol croissent en fonction de l'intensification des apports d'irrigation; l'irrigation par aspersion augmente l'incidence et la sévérité des maladies foliaires.

Leaf-spot diseases of fluted pumpkin, *Telfairia occidentalis* Hook f. caused by *Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema, Dorenb. and van Kest, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. and *Corynospora casiicola* (Berk. and Curt.) Wei are the most important foliar diseases of fluted pumpkin in Southeastern Nigeria (Maduewesi 1977, Nwifo and Atu 1987). The diseases were observed to be very severe in Southeastern Nigeria during the peak of the rainy season (June-September). Nwifo and Atu (1987) reported that the incidence and severity of the diseases were high in all the locations surveyed in that part of the country, varying from 26.4-52.2% and 28.2-65.4%, respectively.

The most economical and effective method to control leaf-spots is to use agronomically acceptable resistant varieties. This strategy is particularly suitable for the peasant farmers in Nigeria who generally lack financial resources. Unfortunately, such cultivars are not available at present. The diseases can be controlled to some extent by plant hygiene and balanced nutrition, but other methods of controlling the disease, such as fungicide applications, must also be used. The only available records of investigation on the control of the leaf-spot diseases of fluted pumpkin in Southeastern Nigeria is that of Maduewesi (1977). He reported that bi-weekly foliar sprays of Dithan M45 or Antracol at 500 ppm a.i./l significantly reduced leaf-spot disease of fluted pumpkin in naturally infected field-grown plants. Now that more fungicides are available in the Nigerian market, it is necessary to determine their effectiveness in controlling leaf-spot diseases of fluted pumpkin.

The time of planting the seeds of *T. occidentalis* in Southeastern Nigeria depends mainly on the onset of the rainy season. The rains usually start in April in that part of the country, a period that coincides with the initial infection by most foliar pathogens. Nwankiti (1984) reported that planting yam in March or February decreased the incidence of anthracnose blotch disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Such investigations have not been carried out on fluted pumpkin which is widely cultivated in Nigeria for its edible and nutritious leaves and seeds.

Nutrition is known to affect the incidence and severity of foliage diseases. Nitrogen, which is a major element required for vegetative growth, is known to affect the development of plant diseases. Huber and Watson (1974) reported that in some cases, disease incidence and severity increase with the nitrogen supply, while the opposite is true for others. Excess nitrogen supply has been reported to increase blight diseases of potato (Hide and Lapwood 1975). It is also known that the form of N available to the host or pathogen affects the disease severity or resistance rather than the amount.

Fluted pumpkin is considered to be drought-tolerant, but in Southeastern Nigeria it is a rainfed crop and water deficiency during the dry season reduces its productivity. Asoegwu (1988) reported that irrigation prolonged the productive life of the crop and enhanced leaf and pod

yields. Porter *et al.* (1987) reported that sclerotinia blight, pod rot and early leaf-spot of peanut increased with sprinkler irrigation.

This paper reports on the relative performance of Anvil, Benlate, Captaf, Difolatan and Dithane M45 against *P. sorghina*, *C. gloeosporioides* and *C. asiicola*. The effects of time of planting, staking height, fertilizer treatment and sprinkler irrigation on the incidence and severity of leaf-spot diseases of fluted pumpkin were also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Chemical control studies

The trade, common and chemical names of the fungicides tested are given in Table 1. The fungicides include Benlate (methyl - 1 - butyl carbamonyl) - 2- benzimidazole - carbamate; Captaf (N - trichlorozimide, 50% w.p.); Dithane M45 (80% zinc and manganese ethylene bis-dithio carbamate); Difolatan (cis - N - 1, 1, 2, 2 - tetra chloroethyl - 4 - cyclonezene - 1, 2 dicarboximide) and Anvil (25% w/v Hexaconazole).

Laboratory tests

The method described by Fajola and Nwugo (1985) was used in laboratory evaluations. Water suspension or solution of each fungicide was made and diluted to give eight concentrations: 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 and 1000 ppm of the formulated fungicide. An untreated check/control was included. Each plate of potato dextrose agar medium (PDA) was inoculated at the center with a 5 mm culture disc of the microorganism and incubated at 30°C.

Twelve plates replicated three times were used for each concentration. The colony diameter was measured every day for five days. The percentage inhibition of mycelial growth, relative to the control was then calculated. For the conidia germination test, 1 ml of each of the fungicide concentrations or of sterile water (control) was sprayed to cover the solidified surface of potato dextrose agar (PDA) medium in Petri dishes. After 4 h, one drop of a suspension containing 15×10^4 conidia/ml was placed at each of four points midway between the centre and rim of each Petri dish. Three Petri dishes/concentrations were used. The dishes were incubated at 26°C for 6 h and then fixed with formalin acetic alcohol (FAA). The conidia that germinated and those that did not were counted in a 5.5 mm^2 area/inoculated site. LD₅₀ values were determined for the fungicides used.

Greenhouse test

In the greenhouse trials, the method used was that of Fawcett *et al.* (1958). The five lowest leaves of the 12-week-old potted plants were sprayed with one of the following concentrations of each fungicide: 25, 50, 100, 250, 500, 1000 and 10 000 ppm a.i. Five pots were used for each concentration. The leaves were then sprayed using a hand sprayer with a 15×10^4 /ml conidial concentration of the pathogens or sterile water as control. The degree of protection

was assessed 21 days after inoculation by counting the number of diseased spots or leaves on a 4 cm² area nearest to the tip. Disease severity scores were recorded. The results are expressed as percentage protection against the disease in relation to the control. LD₅₀ values were determined for the fungicides used.

Field test

Experiments were conducted at the farms of the Federal University of Technology (05° 27'N; 07°02'E) during the 1988 and 1989 seasons. A local variety "Mgbirichi" susceptible to all the foliar diseases was grown in a randomized block design with three replications. Six treatments (including the non-sprayed control) consisted of the application of the five fungicides by spraying. The fungicides were applied 84 days after seedling emergence when the first signs of disease incidence were observed. Each fungicide was tested at five concentrations (100, 250, 500, 1000 and 2500 ppm a.i.) and was dispensed onto foliage from a knapsack sprayer. Spraying started in June when the plants were 12 weeks old and was repeated at intervals of two, four, six and eight weeks.

Treatments were arranged in a randomized block split plot design with three replications. Each plot consisted of four rows 10 m long and 1 m apart with plants spaced at 2 m intervals. The trial was carried out over a 24-week period during which there was about 220 mm rainfall and average temperature was 24-27°C. Leaf-spot evaluations were made at monthly intervals during the treatment period. Disease symptoms were rated on a subjective scale of 0 to 3 with 0 = healthy, 0.75 = mild infection with 1-10 spots/leaf; 1.0 = moderate infection with 11-20 spots/leaf; 2.0 = severe infection with 21-40 spots/leaf and 3 = very severe infection with more than 40 spots/leaf. Ten leaves/plant and 20 plants/plot were used. The disease severity index (DSI) was calculated as:

$$\text{DSI} = \frac{\text{Sum of all numerical ratings}}{\text{Total number of plants}} \times \frac{100}{\text{maximum disease category}}$$

Yield and yield components were also recorded.

Cultural control studies

The experiments on the effects of time of planting, staking height, fertilizer treatments and sprinkler irrigation on the incidence and severity of leaf-spot diseases of fluted pumpkin were conducted in 1988 and 1989 in a sandy loam soil at the experimental farm of the Federal University of Technology, Owerri, Nigeria (05° 27'N, 07° 02'E). For the experiment on the effects of planting dates and staking heights on the incidence and severity of the disease, the seeds were sown on site in April, June, August and September in plots measuring 10 x 10m with 25 plants/plot spaced 2 x 2 m apart.

The trial was laid out in a randomized complete block design with four planting dates and three staking heights 0, 1 and 2 m. Four weeks after sowing, a basal dressing of N (60 kg ha⁻¹ as NH₃ 504, P (60kg ha⁻¹ as P₂O₅) and K (80 kg ha⁻¹ as K₂O) was applied to all plots

and stakes were provided to support the shoots at heights of 1 and 2 metres. The plots were handweeded five times during the growth of the crop. The time of disease appearance was recorded for each plot; the general expression of the disease was scored at intervals on a three point scale (1 - 30 where 0= healthy, 0.75= mild infection, 1.0= moderate infection, 2= severe infection and 3.0 very severe infection).

For the experiment on the effect of different nitrogen fertilizer treatment on the incidence and severity of leaf-spot disease, the three nitrogen sources: urea, sulphate of ammonia (S/A) and calcium ammonium nitrate (CAN) were used to supply 20, 40, 80 and 120 kg N/ha. A control (0 kg N/ha) was included in the treatments. The fertilizers were supplied at planting. There was a blanket application of single superphosphate to all the plots at the rate of 100 kg P₂O₅/ha. The experiment was laid out in a randomized complete block with three replications. The scores were based on a scale of 0-3 with 3 representing the highest severity score and 0 indicating that there was no attack.

For the irrigation experiment the trial was laid out in a randomized complete block design with three irrigation frequencies at 3, 6 and 9-day intervals (I₃, I₆ and I₉) and a non-irrigated control (I₀) each replicated three times. At each application, 20 mm of water was applied using a single-nozzle slow rotating sprinkler system with short risers. Irrigation began on 15 October and ended in February of the following year. Soil moisture was measured before each application.

Five female plants were used per plot and leaf analysis. Marketable leaves were harvested by pruning from two months after sowing, and on a monthly basis thereafter. Harvested leaves were analyzed for fresh and dry weights and whole plants were uprooted for dry matter partitioning after 60 days of water supply. Pods were harvested at maturity for all the experiments and analyzed for pod weight, number of seeds per pod and seed weight per pod. Seeds were extracted from the pods, washed, surface-dried with blotting paper and weighed.

RESULTS

Chemical control

Laboratory test: The five fungicides were found to be effective in suppressing the mycelial growth of the three pathogens (Table 1). The LD₅₀ values on mycelial growth for the five fungicides in ppm were as follows: for *P. sorghina* - Captaf 74, Benlate 32, Anvil 46, Dithane M 45, 846 and Difolatan 86; for *C. gloeosporioides* - Captaf 126, Benlate 36, Anvil 42, Dithane M 45 864 and Difolatan, 186; for *C. asiicola* - Captaf 132, Benlate 34, Anvil 54, Dithane M 45 1236 and Difolatan 78.

The results of the laboratory evaluations of the fungicides on spore germination of *P. sorghina*, *C. asiicola* and *C. gloeosporioides* showed that Benlate, Captaf and Anvil consistently proved better than Dithane M 45 and Difolatan (Table 2) The LD₅₀ values of the fungicides in ppm were as follows: for *P. sorghina*: Captaf 56, Benlate, 128, Anvil 164, Dithane M 45 634 and Difolatan 248; for *C. gloeosporioides*, Captaf 76, Benlate 118, Anvil 348, Dithane M 45, 748, and Difolatan 834; and for *C. asiicola*, Captaf 85, Benlate 48,

Anvil 328, Dithane M45, 960 and Difolatan 420. This indicates that Captaf, Benlate and Anvil were the most effective of the fungicides tested while Dithane M45 and Difolatan were the least effective.

Greenhouse test: Benlate, Captaf and Anvil proved to be as effective as Dithane M45 and Difolatan in the greenhouse trial using artificial infection on potted plants (Table 3). However, the former were found to be phytotoxic at 10 000 ppm.

Field test: Anvil, Benlate and Captaf were found to be more effective in controlling leaf-spot diseases than Dithane M45 and Difolatan. The disease severity index was lower in plants that were sprayed every two weeks with Benlate, Captaf and Anvil for all the concentrations tested (Table 4). The results showed a decrease in disease development as the concentration of the fungicides increased. Fresh weight yields of marketable leaves ($P=0.05$) of plants sprayed every two weeks were significantly higher than the non-sprayed control plots. Anvil was found to be phytotoxic at 2500 ppm while plants sprayed with Dithane M45 at the same concentration showed marked luxuriant growth.

Cultural control

Yields in terms of marketable fresh leaf weight, pod yield and number of seeds per pod were very significantly influenced by the time of planting, with the mean yields decreasing with the delay in time of planting (Table 5). Marketable fresh weight yield decreased from 9.6 kg for April planting to 1.2 kg for September planting. Staking of crops up to 2 m high also favoured yield more than crops staked at a height of 1 m. The disease severity and incidence scores were a function of the time of planting. Fluted pumpkins planted in April were more susceptible to infection than crops planted in September. The scores for early planting were higher than those for late planting. Crops planted in September did not produce pods. Disease severity and incidence were higher for plants staked at one metre than those staked at a height of two metres.

The results of the effects of different levels of Urea, sulphate of ammonia and calcium ammonium nitrate (Table 6) showed that Urea significantly affected the yield of fluted pumpkin more than sulphate of ammonia and calcium ammonium nitrate. High levels of nitrogen did not favour the production of pods by the crop, however, the marketable fresh weight of leaves increased with increasing levels of applied N. Urea resulted in the least severity and lowest incidence of leaf-spot disease, while sulphate of ammonia treatment resulted in the highest disease severity, which increased with increasing levels of applied N.

The results of the effect of irrigation on the incidence and severity of leaf-spot disease (Table 7) showed that they were significantly affected by irrigation treatments. Incidence and severity of leaf-spot diseases increased with sprinkler irrigation. The plant canopy was denser and soil moisture content was higher with irrigation production regimes. The mean marketable fresh weight and total leaf dry weight were significantly affected by high irrigation frequencies I_3 and I_6 . High irrigation frequencies also influenced plant survival, while no irrigation resulted in a 75% reduction of surviving plants.

Table 1. Mean percentage inhibition of mycelial growth of three leaf-spot pathogens in potato dextrose agar by different concentrations of fungicide

Concentration of fungicide - ppm	DITHANE M45			DIFOLATAN			BENLATE			CAPTAF			ANVIL		
	CG	CC	PS	CG	CC	PS	CG	CC	PS	CG	CC	PS	CG	CC	PS
1	2.4±1.12*	1.2±.24	1.6±.22	2.3±.21	1.4±.21	1.8±.32	6.2±1.2	4.8±.29	8.4±.32	2.4±.14	2.6±.32	1.2±.22	24.4±.38	3.2±.28	2.4±.24
5	4.8±1.4	2.4±.16	2.8±.38	4.6±.24	6.2±1.2	4.2±.38	8.4±2.4	8.6±2.2	12.6±2.4	3.2±.16	4.2±1.2	2.4±.42	12.6±2.4	14.2±4.2	11.2±2.8
10	8.6±1.4	6.4±1.4	7.2±1.2	14.2±2.21	12.8±2.3	14.2±1.4	12.6±2.2	14.2±1.2	14.8±1.8	6.2±1.2	8.6±2.4	4.2±1.2	28.4±4.8	32.6±5.6	14.8±3.4
25	14.2±2.4	12.4±1.2	24.2±3.4	28.5±3.2	38.4±4.2	28.6±2.6	24.8±3.2	32.6±4.2	42.6±2.2	22.4±3.2	18.6±3.2	12.8±1.4	32.6±5.6	48.6±2.4	32.4±4.2
50	18.6±1.4	14.6±2.2	26.2±4.8	32.4±4.8	48.4±2.8	38.6±4.2	60.8±4.2	76.4±3.8	86.4±2.8	48.4±2.4	32.4±4.2	46.4±3.2	68.2±4.4	54.2±3.2	68.4±5.6
100	28.4±3.8	24.4±3.8	34.2±3.6	48.5±4.6	52.4±3.2	54.2±3.8	78.6±3.8	86.4±4.2	96.4±6.2	56.2±1.4	48.2±7.6	58.4±4.2	76.4±4.8	84.2±4.2	88.4±4.6
250	32.4±2.4	28.6±4.2	38.4±4.2	58.6±3.8	62.4±4.2	54.6±2.8	96.4±4.8	98.4±2.6	100	64.8±2.4	86.4±2.4	86.4±2.4	100	100	100
500	48.6±3.6	44.2±2.8	42.6±2.8	68.4±4.2	72.4±4.8	64.8±1.6	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1000	52.4±4.2	48.6±2.2	54.6±4.2	78.4±4.4	86.4±4.2	74.6±4.2	100	100	100	100	100	100	100	100	100

The data are the means of 36 determinations from three separate experiments

* Standard error.

CG = *Colletotrichum gloeosporioides*

CC = *Corynospora cassicola*

PS = *Phoma sorghina*

Table 2. Mean percentage inhibition of germination of conidia of three leaf-spot pathogens on PDA by different concentrations of fungicides

Concentration of fungicide PPM a.i.	DITHANE M45			DIFOLATAN			BENLATE			CAPTAF			ANVIL		
	CG	CC	PS	CG	CC	PS	CG	CC	PS	CG	CC	PS	CG	CC	PS
°(Control)	2.8±.12*	2.4±.12	2.4±.12	2.6±.46	3.2±.12	4.2±.12	6.4±1.2	7.4±1.2	12.2±1.4	4.8±1.4	5.2±1.2	8.6±1.2	3.2±2.3	3.4±1.4	6.2±1.2
5	3.2±.24	2.8±.14	3.2±.24	3.8±.24	3.6±.14	5.6±1.2	8.6±1.4	9.6±1.6	16.4±1.2	7.2±1.2	6.2±1.2	9.2±2.1	4.8±1.6	3.8±1.2	10.8±1.6
10	4.0±.24	5.2±.16	4.8±.42	5.4±1.2	4.8±2.4	6.4±1.4	12.4±1.2	14.2±2.4	18.2±2.2	12.2±3.4	6.8±1.8	12.4±2.4	5.2±1.4	4.2±1.16	26.3±1.4
25	5.1±.24	7.8±1.20	5.2±.64	6.2±1.4	5.4±1.2	8.6±3.2	18.6±2.4	16.4±2.4	24.2±2.4	16.8±2.2	18.4±2.4	16.4±3.2	6.2±1.2	8.4±1.4	28.4±3.2
50	7.8±.38	8.4±0.82	6.8±1.2	12.2±2.4	14.8±2.4	16.2±1.4	28.4±1.2	24.8±2.8	32.6±2.6	24.8±2.4	24.8±2.6	18.2±2.4	8.4±2.6	11.2±2.2	32.6±4.2
100	11.4±.24	12.6±1.2	7.2±1.4	14.8±1.6	21.2±1.3	24.6±1.6	48.6±2.4	100	100	54.6±1.2	62.4±2.4	24.6±3.2	20.6±2.2	24.8±2.4	44.5±3.6
250	16.8±.36	18.2±1.4	11.4±1.2	32.4±2.4	42.4±2.4	54.6±2.4	58.4±1.6	100	100	64.8±1.4	68.4±1.8	32.8±4.2	42.4±2.4	32.6±3.2	68.6±4.5
500	32.4±.48	36.4±2.6	24.6±1.4	46.4±4.2	54.4±1.2	62.4±1.7	100	100	100	78.4±1.8	82.6±1.4	100	68.4±4.2	74.4±4.8	86.4±4.8
1000	64.6±2.4	58.4±3.2	72.5±6.8	80.6±5.6	78.4±2.8	86.8±2.4	100	100	100	100	100	100	78.6±3.8	86.4±2.4	100

The data are the means of 36 determinations from three separate experiments

* Standard error.

CG = *Colletotrichum gloeosporioides*

CC = *Corynospora cassicola*

PS = *Phoma sorghina*

Table 3. Percentage protection against leaf-spot infection in the greenhouse by the different concentrations of fungicides

Concentration of fungicide (ppm a.i)	BENLATE	CAPTAF	ANVIL	DITHANE M45	DIFOLATAN
25	56.4	42.2	28.2	26.6	23.4
50	76.4	68.5	42.6	32.4	36.2
100	86.2	84.8	65.4	36.4	46.4
250	94.6	92.6	76.8	42.5	48.5
500	100.0	98.4	84.5	46.6	52.2
100	100.0	100.0	96.2	48.2	54.4
10 000	+	++	++	56.4	62.4

The data are means of four replications.

+ = Slightly phytotoxic ++ = Severely phytotoxic Control = 2.4%

Table 4. The effect of foliar spray with five fungicides on the development of leaf-spores on fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis*) and on fresh weight yield of marketable leaves

Concentration of fungicide (ppm)	Interval of application (weeks)	No. of sprays applied	----- ANVIL -----		----- BENLATE -----		----- CAPTAF -----		--- DITHANE M45 ---		--- DIFOLATAN ---	
			mean yield (kg)	% disease severity	mean yield (kg)	% disease severity	mean yield (kg)	% disease severity	mean yield (kg)	% disease severity	mean yield (kg)	% disease severity
100	2	12	2.8	24.2	3.2	16.4	3.2	18.4	3.6	52.4	2.6	48.6
	4	6	2.4	32.4	2.8	22.6	2.8	24.6	3.4	54.5	2.2	50.2
	6	4	2.6	58.2	2.6	24.4	2.6	28.8	3.8	56.2	2.8	54.6
	8	3	2.5	62.6	2.2	28.2	2.4	38.2	3.6	54.4	2.6	52.4
250	2	12	3.4	18.4	3.6	8.4	3.6	12.4	4.2	42.4	3.2	48.6
	4	6	4.0	26.4	3.1	12.6	3.4	18.2	4.2	44.2	2.8	44.6
	6	4	3.2	42.6	3.0	16.4	3.4	26.4	3.8	46.4	3.4	43.6
	8	3	2.8	56.4	4.2	14.4	3.2	34.6	4.4	48.5	2.8	49.4
500	2	12	3.6	0	4.2	0	4.2	0	4.4	22.4	3.6	32.4
	4	6	2.4	0	2.8	0	2.8	0	3.8	26.4	3.4	36.4
	6	4	2.8	0	1.4	0	2.4	0	3.6	28.2	3.2	30.6
	8	3	2.0	0	2.2	0	2.2	0	3.4	29.4	3.4	28.6
1000	2	12	3.4	0	3.8	0	4.2	0	4.2	24.4	3.8	32.6
	4	6	2.2	0	2.5	0	2.8	0	4.4	26.2	3.6	34.2
	6	4	2.6	0	1.3	0	2.6	0	5.8	26.4	3.4	28.6
	9	3	2.2	0	2.0	0	2.0	0	5.2	25.6	3.6	38.4
2500	2	12	2.8	++	2.8	0	3.2	0	6.4	18.6	2.2	22.4
	4	6	1.8	++	2.0	0	2.8	0	5.8	12.4	2.4	28.4
	6	4	2.4	++	1.2	0	2.2	0	5.4	14.2	2.6	32.4
	8	3	1.8	++	1.8	0	1.8	0	4.8	13.6	2.4	34.6
CONTROL			1.8	86.4								

++ Severely phytotoxic

Table 5. Effect of the time of planting and staking heights on mean yield parameters (per plant), disease incidence and severity of leaf-spot of fluted pumpkin

Parameters	TIME OF PLANTING AND STAKING HEIGHTS (M)											
	--- APRIL ---			--- JUNE ---			--- AUGUST ---			--- SEPTEMBER ---		
	0m	1m	2m	0m	1m	2m	0m	1m	2m	0m	1m	2m
Marketable fresh												
leaf weight (kg)	6.8	7.8	9.6	6.2	5.8	6.6	6.2	5.6	5.8	1.2	1.2	1.4
Pod yield (kg)	8.8	9.4	10.4	8.8	8.6	8.8	4.2	3.4	4.2	0	0	0
Number of seeds per pod	92.4	96.4	108.6	86.5	86.4	92.4	46.8	42.6	54.6	0	0	0
Disease severity score	3.2	2.36	2.12	2.8	1.46	1.28	2.4	1.42	1.22	1.2	0.96	0.75
% disease incidence	85.8	64.6	42.4	72.4	54.6	38.6	56.8	32.6	28.4	4.6	2.4	1.8

Table 6. Effect of different levels of three nitrogen sources on the yield components (per plant), severity and incidence of leaf-spot diseases of fluted pumpkin

Parameters	--- UREA---				--SULPHATE OF AMMONIA (S/A)--				----CALCIUM AMMONIUM---- ----NITRATE (CAN)---				CONTROL
	20kg/ha	40kg/ha	80kg/ha	120kg/ha	20kg/ha	40kg/ha	80kg/ha	120kg/ha	20kg/ha	40kg/ha	80kg/ha	120kg/ha	0kg/ha
Marketable fresh weight (kg)	6.4	7.8	9.6	9.4	5.8	6.8	8.6	8.4	6.2	7.4	8.9	8.8	5.8
Pod yield (kg)	10.4	9.8	4.4	3.4	9.6	7.4	2.8	4.6	8.4	6.8	4.4	2.8	4.6
Number of seeds per pod	108.4	96.2	43.2	38.5	86.6	74.4	44.2	36.8	74.2	62.8	46.4	38.6	42.8
Total leaf dry weight	586.2	986.4	988.6	984.2	546.6	896.4	882.4	904.2	624.8	846.5	864.6	884.5	424.6
Disease severity score	1.2	1.4	2.2	2.4	2.2	2.6	2.7	2.8	1.4	2.2	2.4	2.4	2.6
% Disease incidence	12.4	16.6	32.8	34.6	14.6	18.4	42.8	48.6	18.2	16.4	24.8	48.6	42.8

Table 7. Effect of irrigation on mean yield components (per plant), disease incidence and severity of leaf-spot of fluted pumpkin

Parameters	Frequency of irrigation (days)				LSD (0.05)
	0	3	6	9	
Marketable fresh weight (kg)	1.2	6.4	4.4	2.4	1.64
Pod yield (kg)	4.4	6.8	4.8	3.6	0.64
Number of seeds/pod	32.4	86.2	84.4	76.0	4.2
Total leaf dry weight (gm)	396.4	742.6	846.2	546.0	48.6
Disease severity score	1.6	2.2	1.5	1.9	0.70
Percentage disease incidence	22.6	56.8	42.5	38.4	2.8
Mean % soil moisture available B/W 0 and 15 cm depth	28.6	94.6	74.8	54.6	3.4
% survival of plants	42.6	92.6	80.4	64.8	4.6

DISCUSSION

The results of the evaluations of the five fungicides in the laboratory closely agree with their effectiveness in the greenhouse and in the field trials. However, information on the phytotoxicity and tenacity of the fungicides is not provided by results from laboratory examinations. The results of the evaluations of the fungicides in the greenhouse and field trials showed that all fungicide treatments significantly reduced disease development compared to the control.

Benlate was found to be the best of the five fungicides tested against the disease. This observation is similar to that reported by Solel (1970a), who showed that the vapour of benomyl was toxic to *Cercospora beticola* Sacc., which caused the leaf-spot of sugar beet. In field spray trials, Solel (1970b) reported that benomyl sprays (421 g a.i./ha) at three-week intervals completely controlled the disease and were superior to thiabendazole and fentin acetate applications. Benomyl sprays (500 ppm) at two-week intervals were found to be very effective in controlling leaf-spot disease of fluted pumpkin in our investigation. Delp and Klopping (1968) also reported that weekly high volume sprays of benomyl (80-560 a.i./ha) controlled late (*Septoria apiicola*) and early (*Cercospora apii*) celery blights more effectively.

INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

The systemic fungicides Benlate and Anvil were found to be more effective than the non-systemic Dithane M45 and Difolatan. Solel (1970b) demonstrated that thiabendazole, benomyl and thiophanate were very effective when sprayed onto the lower surfaces of the leaves of sugar beet inoculated with *C. beticola* spores.

Dithane M45 and Difolatan were found to be slightly effective on the leaf-spot disease of *T. occidentalis*. This observation concurs with that of Maduewesi (1977) who reported that bi-weekly foliar spraying with Dithane M45 and Antracol at a concentration of 500 ppm a.i. significantly reduced leaf-spot disease of fluted pumpkin in naturally infected field-grown plants.

Benlate, Anvil, Captaf and Difolatan reduced the yield of marketable leaves at 2500 ppm a.i while Dithane M 45 was not phytotoxic at that concentration. Rather, the treated plants appeared to exhibit luxuriant growth. These observations are similar to those of Raafat and Elewa (1967) who found that apart from good control of the onion white rot disease, Dithane Z-78 induced a noticeable increase in the yield of onion accompanied by a significant increase in the dry weight of onion leaves and bulb during growth. They concluded that the beneficial result was due to the effects of zinc contained in the fungicide and its relationship with auxin in plant growth. However, in light of the present findings, the spraying of fluted pumpkin with 500 ppm of Benlate, Anvil and Captaf in the field at bi-weekly intervals appears suitable for the effective control of the leaf-spot disease in the fields.

The results of the effect of some cultural factors on the leaf-spot diseases of fluted pumpkin showed that disease incidence, severity and yield components were significantly affected by different planting dates. The fluted pumpkin planted in April was heavily infected while late plantings resulted in mild infection. The results obtained differ from those of Nwankiti (1984) who reported that planting yam early, in March, decreased the incidence of yam blotch and increased crop yield compared to the usual Nigerian planting dates in April or May.

Disease severity was lower with Urea treatments than calcium ammonium nitrate and sulphate of ammonia. Disease severity increased with increasing levels of nitrogen. Although disease severity increased with increasing levels of N, the zero level in most cases gave better control than even the highest level. This result indicates that the disease needs the optimum level of N in the plant to develop fast. Nitrogen in excess is known to generally increase susceptibility and tend to lengthen the vegetative period and delay maturity. Bollenbacher and Fulton (1971) reported that anthracnose of cotton (*Colletotrichum gossypii*) was increased by ammonium sulphate but was not affected by NO_3 - N or NH_4 - N sources. The results of this investigation showed that the form of nitrogen influenced the severity of leaf-spot diseases of fluted pumpkin.

High irrigation frequencies significantly increased the mean marketable fresh leaf weight and total leaf dry weight. Disease incidence and severity were also affected by irrigation treatments. Irrigating every three days influenced the disease severity more than the six and nine day irrigation frequencies. This result concurs with that obtained by Porter *et al.* (1987) who reported that early leaf spot (*Cercospora arachidicola*) of peanut increased with sprinkler irrigation. It is therefore clear that irrigating susceptible cultivars of fluted pumpkin every six days during the dry season could reduce infection and produce reasonable yields.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author is grateful to the International Foundation for Science (IFS) Sweden for providing financial support that made this work possible.

REFERENCES

- Asoegwu S.N. (1988). Effects of irrigation on the leaf and pod production of fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis* Hook f.) in Southern Nigeria. *Scientia Horticultural* 34: 161-168.
- Bollenbacher K. and Fulton N.D. (1971). Effects of nitrogen compounds on resistance of *Gossypium arboreum* seedlings to *Colletotrichum gossypii*. *Phytopath.* 61: 1394-1395.
- Delp C.J. and Klopping H.L. (1968). Performance attributes of a new fungicide and mite candidate. *Pl. Dis. Repr.* 52: 95-97.
- Fajola A.O. and Nwufu M.I. (1985). Control of corm roots of cocoyam (*Colocasia esculentus*) caused by *Botryodiplodia theobromae* and *Sclerotium rolfsii*. *Fitopatologia Bras.* 10: 48-50.
- Fawcette C.H., Spencer D.W. and Wain R.I. (1958). Investigation on fungicides IV (*Aroloxythio*) trichloromethanes. *Ann. Applied Biol.* 46: 651-661.
- Hide G.A. and Lapwood D.A. (1978). Disease aspects of potato production. In: *The Potato Crop*. P.M. Marries, Ed. Chapman and Hall. London. 730 pp.
- Huber D.M. and Watson R.D. (1974). Nitrogen form and plant disease. *Ann. Rev. Phytopath.* 12: 139-165.
- Maduewesi J.N.C. (1977). White leaf-spot disease of fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis*) in Nigeria. *Niger. J. Pl. Prot.* 3: 122-128.
- Maduewesi J.N.C. (1977). Evaluation of Antracol and Dithane M45 for white leaf-spot disease of fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis*). *Niger J. Pl. Prot.* 3: 122-128.
- Nwankiti A.O. (1984). Effect of planting dates on the incidence and severity of anthracnose blotch complex of *Dioscorea alata* L. caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and subsequent effect on the yield. *Beitrage trop Landwirtschaft Veterinarmed* 24: 285-292.
- Nwufu M.I. and Atu U.G. (1987). Survey of the diseases and pests of Ugu (*Telfairia occidentalis*) in Southeastern Nigeria. Proceedings of the 9th Annual Conference of the Horticultural Society of Nigeria held at the Federal University of Technology, Owerri. 8-13 Nov. pp. 43-45.
- Porter D.M., Wright F.S. and Powell N.L. (1987). Effect of sprinkler irrigation on peanut diseases in Virginia. *Plant Dis.* 71(6): 512-513.
- Raafat A. and Elewa T.S. (1967). Treatment of onion seedlings with Dithane Z - 78 and copper fungicides and its effect upon the growth and mineral status of the plant as well as the percentage of infection with white rot disease. *Journal of Botany*. UAR 10: 9-20.
- Solel Z. (1970a). The systemic fungicidal effect of benzimidazole derivatives and thiophanate against *Cercospora* leaf-spot of sugar beet. *Phytopathology* 60: 1186-1188.
- Solel Z. (1970b). The performance of benzimidazole fungicides in the control of *Cercospora* leaf-spot of sugar beet. *J. Ani. Soc. Sug. Beet Technology* 16: 93-96.
- Solel Z. (1971). Vapour phase action of some foliar fungicides. *Pestic. Sci.* 2: 126-128.

ETUDES PRELIMINAIRES SUR LA SELECTION DE CHAMPIGNONS INDIGENES POUR LA MYCORHIZATION CONTROLEE DES EUCALYPTUS AU CONGO

Donatien N'ZALA
Institut de Développement Rural
Université Marien Ngouabi, B.P. 69 Brazzaville, Congo

Résumé: Au Congo, des plantations industrielles d'Eucalyptus hybrides ont été réalisées sur des sols pauvres de la région côtière de Pointe-noire. Bien que la productivité soit élevée à cause d'un climat favorable et du matériel végétal sélectionné, la pauvreté des sols se révèle un facteur limitant. L'inoculation des plants par des souches de champignons mycorrhiziens mieux adaptées à la fois aux conditions locales de sol et de climat et aux Eucalyptus pourrait accroître encore la production. Il est donc envisagé d'isoler et de sélectionner des champignons indigènes en vue de la mycorhization contrôlée des Eucalyptus. Les résultats préliminaires des travaux que nous entreprenons ont permis de confirmer la nature ectomycorhizienne de trois espèces végétales locales: *Gnetum africanum* Welw. (liane), *Uapaca guineensis* Mull. Arg. and *Gilbertiodendron dewevrei* (De Wild) J. Léonard (grands arbres). Les tentatives d'isolement des champignons ectomycorhiziens ont connu peu de succès. Il est suggéré de diversifier et d'améliorer les milieux de culture.

Abstract: Industrial plantations of hybrid eucalyptus have been developed on poor coastal soils near Pointe-noire, Congo. Although productivity is high thanks to a good climate and selected plant matter, poor soils are proving to be a constraint. Productivity could be improved by inoculating plants with mycorrhizal fungus strains that are better adapted to the local soils and climate. A plan to isolate and select indigenous fungi to be used in mycorrhizal control of eucalyptus is now being considered. Preliminary results confirm the ectomycorrhizal nature of the symbiosis observed in three local plant species: *Gnetum africanum* Welw. (liana), *Uapaca guineensis* Mull. Arg. and *Gilbertiodendron dewevrei* (De Wild) J. Léonard (big trees). Attempts to isolate the ectomycorrhizal fungi have not been very successful. It has been suggested that the culture media be diversified and improved.

Le rôle bénéfique des mycorhizes dans la croissance des arbres est actuellement bien établi. Elles permettent en effet d'accroître la production de matière végétale par une meilleure utilisation des ressources du sol surtout en Afrique où les sols sont pauvres en éléments nutritifs assimilables. Au Congo, les plantations clonales d'Eucalyptus hybrides réalisées sur des sols pauvres présentent néanmoins une productivité élevée (30 m³/ha/an). Les performances de ce matériel végétal sélectionné pourraient être encore plus accrues par la sélection aussi et l'inoculation de champignons ectomycorhiziens mieux adaptés à la fois aux Eucalyptus et aux conditions locales de sol et de climat. L'objet de la présente note s'insère dans ce cadre et vise à présenter les résultats préliminaires des travaux entrepris dans ce domaine. Il s'agit pour nous dans ce travail, d'obtenir une collection de souches ectomycorhiziennes isolées localement.

MATERIEL ET METHODES

Le prélèvement des échantillons de systèmes racinaires et de carpophores de champignons a été effectué sur et autour des espèces végétales locales présumées ectomycorhiziennes. Il

s'agit principalement de *Uapaca guineensis* Mull. Arg., *Gilbertiodendron dewevrei* (De Wild) J. Léonard (grands arbres) et *Gnetum africanum* Welw., une liane forestière. La prospection a été menée en saison de pluies (novembre 1990 à avril 1991) dans les deux sites suivants:

L'arboretum de Mbuku-nsitu: Créé en 1937, il est situé en plein dans le massif du Mayombe à proximité de Bilinga (12°14'E, 4°31'S, altitude de 150 m). Le climat est caractérisé par l'existence de deux saisons bien tranchées: une saison sèche de juin à septembre, avec une forte humidité atmosphérique et des températures moyennes assez basses (inférieures à 20°C) et une saison des pluies plus chaude, d'octobre à mai. Les précipitations annuelles totalisent 1600 mm. Elles sont cependant très irrégulières tant en quantité qu'en répartition d'une année sur l'autre. L'arboretum regroupe actuellement sur une vingtaine d'hectares près de 79 essences installées sur des placeaux carrés de 50 m x 50 m.

La forêt riveraine de Kandeko/Ouesso: Cette forêt fait partie du grand massif du nord Congo (15 millions d'hectares) qui intègre l'immense domaine couvrant le sud de la République centrafricaine, le sud-est du Cameroun et le nord du Zaïre. Elle est située au nord-ouest de Brazzaville. La pluviométrie moyenne annuelle est de 2000 mm et la température annuelle moyenne est de 25°C.

La technique de récolte consistait à soulever la litière et à remuer le sol à l'aide d'une petite houë. Les jeunes racines ectomycorhizées étaient prélevées dans plusieurs endroits aux pieds des arbres. Une attention particulière était portée aux carpophores de champignons supérieurs existant sur la litière et sur le sol pour chercher à établir leurs liaisons éventuelles avec certains types de mycorhizes. Des échantillons de radicelles et de carpophores éventuels étaient donc prélevés pour l'examen plus détaillé au laboratoire. Ils étaient conservés dans une glacière, une partie des radicelles ectomycorhizées était fixée dans une solution de FAA (mélange formol, acide acétique et alcool éthylique). Ce matériel a été utilisé pour l'isolement des cultures mycéliennes sous la hotte à flux laminaire.

Des racines triées sous la loupe binoculaire selon les types définis sont désinfectées successivement dans l'eau oxygénée à 10%, l'hypochlorite de sodium à 15% et le chlorure mercurique à 0,1%. Elles sont ensuite rincées à l'eau stérile, séchées sur du papier filtre, excisées en de petits implants qui sont déposés dans des boîtes de Pétri remplies de milieu gelosé MNM (Marx, 1969) autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

Les carpophores sont aussi désinfectés dans de l'hypochlorite de sodium à 1%, rincés dans de l'eau stérile puis séchés. Ils sont alors fragmentés en deux. Des tissus mycéliens sont ensuite prélevés au niveau de la partie centrale du carpophore puis transférés sur le milieu gelosé MNM contenu dans les boîtes de Pétri. Toutes ces boîtes sont placées à l'obscurité dans une armoire à température ambiante (25° à 30°C). Les cultures surveillées régulièrement sont purgées des contaminations et repiquées dans d'autres boîtes de Pétri.

Des coupes transversales à main levée ont été faites aussi dans les racines ectomycorhizées. Elles sont éclaircies dans une solution d'hypochlorite de sodium à 15% puis colorées au rouge congo 1% additionné de glycérol. L'observation a été faite au microscope photonique pour examiner principalement le réseau de Hartig et le manteau fongique.

RESULTATS

Dans les sites visités, nous avons trouvé trois espèces porteuses d'ectomycorhizes: *Uapaca guineensis* (euphorbiacée), *Gilbertiodendron dewevrei* (cesalpiniacée) et *Gnetum africanum* (gnetacée). Le peuplement de *Uapaca guineensis* est très remarquable dans l'arboretum de Mbuku-nsitu par son homogénéité; son couvert est entièrement fermé et les arbres sont âgés de 52 ans.

Gnetum africanum est très disséminé dans les recrûs forestiers du Mayombe. *Gilbertiodendron dewevrei* présente un comportement grégaire et occupe de vastes étendues dans la grande forêt du nord Congo.

Morphologie et anatomie des mycorhizes

Les ectomycorhizes observées sont toutes typiques. Elles se caractérisent en coupe transversale par un manteau fongique et un réseau de Hartig bien différencié. Chez *G. africanum*, les ectomycorhizes sont d'aspect coralloïde présentant un manteau épais et cotonneux, de couleur jaune vif caractéristique avec des cordons jaunes.

Ceux-ci parcourent le sol et en saison des pluies on note souvent la présence de petits carpophores jaunes et globuleux de 1,5 cm de diamètre non loin des *Gnetum*. La structure du manteau est de type pseudoparenchymateux. Le champignon responsable de la symbiose a été identifié, il s'agit de *Scleroderma* sp. (Fassi, communication personnelle).

Les radicelles de *G. dewevrei* prélevées dans la litière en voie de décomposition et à la base des arbres montrent des ectomycorhizes bien visibles (Tableau 1). La plupart possèdent des cordons mycéliens associés au manteau. Les cordons plus différenciés sont formés d'hyphes à paroi épaisse ou mince, avec ou sans boucles (types 1 et 2). Un autre type de mycorhize est caractérisé par un manteau feutré abondant ressemblant à du coton (type 3) et un autre type encore présente un feutre mycélien grêle (type 4).

Nous avons observé aussi d'autres types de mycorhizes dont le manteau est lisse ou revêtu de cystides ou d'autres ornements plus complexes (types 5 et 6). Le Pr Fassi (communication personnelle) pense que le type 1 serait lié aux champignons du genre *Inocybe*. Nous n'avons pas trouvé de carpophores autour des pieds de *G. dewevrei*, ce qui n'a pas aidé à l'identification de ces champignons.

Plusieurs types de mycorhizes ont été également définis chez *U. guineensis*. Elles montrent un manteau lisse ou à revêtement de soies simples. Elles se caractérisent presque toutes par des manteaux de structure prosenchymateuse mais d'épaisseur variable.

On note aussi la présence de cordons jaunes pâles parcourant les radicelles et la litière. Les carpophores bruns violacés récoltés autour des arbres ont été supposés comme ceux de russules d'après des descriptions dans la littérature (Fassi 1960, Agerer 1986).

Tableau 1. Caractéristiques morphologiques et anatomiques des ectomycorhizes de trois espèces végétales locales

	Type	Forme	Réseau de Hartig	M a n t e a u		Structure	Rhizomorphe
				Couleur	Texture		
<i>G. africanum</i>		Coralloïde	Net	Jaune	cotonneux	Pseudo-parenchyme	Hyphes cloisonnés avec boucles
	1	Dichotomique	Net	Blanc crème	feutré	Prosenchyme	Hyphes cloisonnés avec boucles
	2	Monopodique	Net	Brun	lisse	Prosenchyme	Hyphes cloisonnés sans boucles
	3	Monopodique	Net	Blanc	cotonneux	Prosenchyme	Hyphes cloisonnés sans boucles
<i>G. dewevrei</i>	4	Courbe non ramifié	Net	Blanc	feutré	Prosenchyme	Absent
	5	Monopodique	Net	Brun	lisse	Prosenchyme	Hyphes cloisonnés avec boucles
	6	Monopodique	Net	Brun	feutré	Prosenchyme	Hyphes cloisonnés avec boucles
<i>U. guineensis</i>	1	Monopodique	Net	Blanc	lisse	Prosenchyme	Hyphes cloisonnés sans boucles
	2	Monopodique	Net	Blanc	chevelu	Pseudo-parenchyme	Hyphes cloisonnés sans boucles
	3	Monopodique	Net	Jaune	Grumeleuse	Prosenchyme	Hyphes cloisonnés sans boucles

Tentatives d'isolement

Nous sommes parvenus à isoler le *Scleroderma* des jeunes carpophores récoltés autour de *G. africanum* sur milieu gélifié MNM. En culture solide, le champignon présente un mycélium abondant cotonneux de couleur jaune pâle semblable à celui du champignon à l'état naturel. Celui-ci présente des hyphes septés avec boucles.

Les isollements à partir de carpophores de "russules" et à partir de mycorhizes n'ont pas connu de succès. Dans ce dernier cas les boîtes de Pétri contenant les mycorhizes excisées ont été souvent infectées. Bien que nous ayons utilisé la streptomycine à 2% par la suite pour lutter contre les bactéries envahissantes, très peu de boîtes étaient demeurées intactes de contamination notamment due aux moisissures dont la croissance est rapide.

DISCUSSION

Nos observations permettent de confirmer la nature ectomycorhizienne des espèces étudiées: *U. guineensis*, *G. dewevrei* et *G. africanum* (Fassi 1960, Ba 1986). Si une seule mycorhize a été observée chez *G. africanum*, par contre il est certain que plusieurs champignons mycorhizent les espèces de *U. guineensis* et *G. dewevrei*. La diversité spécifique des champignons apparaît plus élevée sous les espèces constituant des peuplements homogènes que sous les espèces plus dispersées. Des résultats analogues ont été observés au Fouta-Djalou (Thoën et Ducouso 1989).

Nous avons noté l'absence de développement de mycélium à partir des mycorhizes et même d'un type de carpophore. L'isolement à partir de carpophores fermes et à l'état jeune a connu plus de succès que les carpophores déjà épanouis. Le milieu MNM semble propice au développement des contaminations par les moisissures et les bactéries. On devrait essayer d'autres milieux de culture notamment ceux de Pachlewski, de Hagem ou d'autres déjà éprouvés ailleurs (Menez 1984). Il est possible aussi que certains types de mycorhizes appartiennent effectivement aux champignons dont les milieux de culture ne sont pas encore mis au point: *Russula*, *Inocybe*.

Les résultats de ces travaux préliminaires indiquent que l'isolement des champignons indigènes peut être obtenu par une meilleure connaissance des symbiotes et par une maîtrise des conditions de culture. De nombreux travaux ont déjà mis en évidence l'influence de l'inoculation ectomycorhizienne qui permet une croissance accrue, plus homogène et mieux organisée des jeunes plants élevés en pépinière. A cet égard, la nécessité d'un inventaire des ectomycorhizes des espèces végétales locales et de leur isolement est reconnue. La sélection de souches indigènes très performantes et bien adaptées devrait permettre de réaliser la mycorhization systématique des plants d'Eucalyptus dans les pépinières locales. On devrait ensuite comparer l'efficacité relative des souches indigènes isolées de celles introduites.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agerer R. (1986). Studies on ectomycorrhizae III. Mycorrhizae formed by four fungi in the genera *Lactarius* and *Russula* on Spruce. *Mycotaxon* 27: 1-59.

Ba A.M. (1986). Premiers résultats sur l'infection ectomycorhizienne chez deux essences forestières locales du sud du Sénégal: *Azelia africana* Sm et *Uapaca guineensis* Mull. Arg. Séminaire sur les arbres fixateurs d'azote (CRDI-NFTA) et sur l'amélioration biologique de la fertilité du sol (FIS-ORSTOM), Dakar. pp. 243-254.

Fassi B. (1960). La distribution des mycorhizes ectotrophes dans la litière et la couche superficielle du sol des forêts à *Gilbertiodendron dewevrei* (césalpiniacées) au Congo belge. Mikorrhiza, internationales mykorrhiza symposium, Weimar. pp. 297-302.

Marx D.H. (1969). The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-163.

Menez, J. (1984). La mycorhization contrôlée du chêne: éléments pour la sélection de souches fongiques. Mémoire de fin d'études. INRA-CNRF Nancy. 50 pp.

Thoën D. et Ducouso M. (1989). Champignons et ectomycorhizes du Fouta-Djalou. *Bois et forêts des tropiques* 221: 45-63.

LA CULTURE *IN VITRO*: UN OUTIL PRIVILEGIE DE PRODUCTION D'INOCULA DE MYCORHIZES A VESICULES ET ARBUSCULES

T.A. DIOP*, M. GUEYE*, G. BECARD**, Y. PICHE*** et J.A. FORTIN****

*Centre de Recherche ISRA-ORSTOM, B.P. 1386 Dakar Sénégal

**U.S.D.A. Philadelphia, Pennsylvania 199118 USA

***C.R.B.F. - Université Laval, Québec, Canada G1K 7P4

****University of Montréal, Québec, Canada

Résumé: La culture d'un champignon endomycorhizien à vésicules et arbuscules, Gigaspora margarita en association avec des racines transformés de carotte, en conditions axéniques et sur un même milieu, a permis d'obtenir un inoculum de qualité selon un modèle simple et reproductible. Ce système de culture permet de produire massivement des hyphes mycéliens, de nombreuses unités d'infection, des spores matures et viables. Ce modèle axénique a permis aussi de calculer d'une manière originale le degré de colonisation racinaire en relation avec les autres paramètres de la mycorrhization étudiés. Les racines génétiquement transformés par le plasmide Ri T-DNA d'Agrobacterium rhizogenes méritent donc d'être prises en considération dans les techniques de production d'endomycorhizes.

Abstract: Culturing Gigaspora margarita, a VA endomycorrhizal fungus in association with transformed carrot roots, under axenic conditions, in a single medium, produces good quality inoculum; the model is simple and can be reproduced. This culture system allows for massive production of mycelium hypha, large numbers of infection units, and mature, viable spores. This axenic model can also be used to make a most original calculation of the degree of root colonization in relation to other mycorrhizal parameters being studied. The use of roots genetically transformed by the Ri T-ADN plasmide of Agrobacterium rhizogenes is worth bearing in mind when developing techniques for the production of endomycorrhiza.

Les mycorhizes à vésicules et arbuscules (MVA) constituent une association symbiotique entre les champignons obligatoires et les racines de la grande majorité des plantes d'importance économique considérable. Cette association se rencontre dans des sites écologiques très contrastés allant des arctiques aux tropiques (Gerdeman 1968, Mosse 1973). Le rôle bénéfique des MVA dans la nutrition phosphatée de la plante-hôte ainsi que dans d'autres aspects de la nutrition minérale, de la protection contre le potentiel infectieux du sol, de l'absorption en eau et de l'interaction positive avec les bactéries fixatrices d'azote a été largement démontré (Azcon-Aguillar and Barea 1981, Nelson and Safir 1982, Francis *et al.* 1986).

Actuellement les connaissances écophysiologiques acquises permettent d'envisager l'utilisation à grande échelle des mycorhizes endotrophes. De nombreuses techniques culturales (en pots, aux champs, en serres, en hydroponie, en aéroponie, en conditions axéniques...) tenant compte du caractère de symbiote obligatoire, sont utilisées pour produire massivement de l'inoculum MVA.

Ce présent article décrit l'utilisation de la culture *in vitro* pour produire dans des boîtes de Pétri contenant un milieu minéral solide, de l'inoculum d'un champignon mycorhizien à vésicules et arbuscules associé à des racines génétiquement transformées de carotte.

MATERIEL ET METHODES

Production, extraction et purification de l'inoculum

Gigaspora margarita Becker et Hall, identifié sous le numéro DAOM 194757, et déposé au Centre de Recherche en Biosystématique d'Ottawa au Canada a été utilisé comme symbiote fongique pour la production d'inoculum. Les spores de *G. margarita* ont été produites de façon massive au bout de six mois en conditions de serre en association avec le poireau (*Allium porum*) dans le Turface (montmorillonite calcinée). Ce support physique est produit par International Minerals and Chemical Corporation, Industrial Minerals Division, 421 East Hawley Street, Mundelein, Illinois 60060, USA, et vendu à Québec par le Groupe vert, 76, de la Pointe-aux-Lièvres Sud, Québec. Après six mois de croissance, le poireau a été enlevé et le Turface a été lavé sous un filet d'eau à travers trois tamis superposés ayant respectivement 500, 250 et 106 μm de diamètre. Les agrégats déposés sur les tamis 250 et 106 μm sont récupérés et centrifugés selon un gradient de densité constitué d'une solution de Rénographine-60 à quatre concentrations (10%, 20%, 40% et 60%) à une vitesse de 1800 tours/min. Les spores de *Gigaspora margarita* blanches, jaunes, ou oranges présentes aux interfaces, sont recueillies et mises en germination dans des boîtes de Pétri (100 x 15 mm) contenant du milieu minimal M de White solidifié à 0.4% avec la gélose Gel gro. Les spores viables germaient entre trois et six jours dans un incubateur à 27°C.

Culture de racines isolées

Les racines de carotte, génétiquement transformées par le plasmide Ri T-DNA d'*Agrobacterium rhizogenes* selon la méthode de Bécard et Fortin (1988) sont cultivées dans le milieu M de White. Ce matériel racinaire cultivé *in vitro* est une source de matériel végétal inépuisable pour des études aseptiques de mycorhization et sans apport exogène de régulateurs de croissance.

Inoculation des racines isolées

L'unité expérimentale consistait en une culture d'un segment racinaire (mesurant 7 cm, âgé de 17 j et pesant environ 0,05 g) non inoculé de façon dirigée par trois spores prégermées de *G. margarita* dans une boîte de Pétri carrée (9 x 9 cm) contenant 40 ml de milieu M solidifié à 0,4% de Gel gro (Fig. 1). Les boîtes de Pétri étaient placées verticalement à l'obscurité dans un incubateur à 27°C. Deux bandes de coton (Cotons absorbants, Helthco DD1, Montréal, Québec) stériles placées en bas de chaque boîte de Pétri absorbaient les condensations d'eau dues à cette position.

Evaluation de l'endomycorhization

L'établissement de la symbiose endomycorhizienne était évalué périodiquement pendant 12 mois par des observations et mensurations sur les paramètres suivants: poids frais racinaire, densité du mycélium extramatriciel, nombre de spores matures produites, nombre et longueur

d'unités d'infection, degré de colonisation racinaire, viabilité des spores matures néoformées. La présence du champignon était observée après un éclaircissement des racines au KOH 10%, rinçage à l'eau distillée et coloration au noir de Chlorazol E selon la méthode de Brundrett *et al.* (1984). Les racines colorées ont été écrasées délicatement entre lames et lamelles et observées dans le glycérol au microscope photonique de type Zeiss.

Le pourcentage ou degré de colonisation racinaire a été évalué après coloration racinaire suivant deux méthodes différentes. La première méthode de calcul était celle décrite par Furlan et Fortin (1973). Des segments racinaires (1,5 à 2 cm) placés à intervalles réguliers entre lames et lamelles sont observés au grossissement 16 X. Dans le champ optique du microscope, le segment renfermant des hyphes indépendamment du stade ou de l'intensité de la mycorhization était comptabilisé. Le rapport entre le nombre de points colonisés et le nombre total de points observés représente le degré de colonisation racinaire. La deuxième méthode est une méthode directe de calcul du degré de colonisation racinaire. Elle est obtenue par un rapport entre la longueur totale des unités d'infection et la longueur de l'ensemble du système racinaire. Une unité d'infection est constituée d'un segment racinaire massivement envahi par les arbuscules intracellulaires. Dans nos conditions, la croissance moyenne des racines transformées atteignait en moyenne 23 m de long après deux à quatre mois de culture, juste avant la perturbation des corrélations trophiques.

Le comptage de spores matures a été effectué facilement sous la loupe binoculaire à cause de la transparence de la gélose Gel gro. La viabilité des spores matures néoformées *in vitro* a été testée selon quatre procédés de mise en germination durant une période de 10 jours, sur un milieu minimal M de White gélosé. Ces essais de germination se faisaient suivant les conditions suivantes: germination directe des spores produites en milieu fermé, germination des spores en association avec des racines isolées, germination directe des spores ayant subi des stérilisations de surface selon la méthode de Mertz *et al.* (1979), germination des spores ayant préalablement séjourné au froid pendant une semaine.

Analyse statistique

Toutes les expériences ont été effectuées dans un incubateur suivant un dispositif complètement aléatoire. Une boîte de Pétri (9 x 9 cm) contenant un segment de racine de carotte transformée inoculée ou non constituait une unité expérimentale. Tous les deux mois de culture, le poids frais des racines, le nombre de spores matures néoformées, le pourcentage de colonisation estimé selon la méthode de Furlan et Fortin (1973), ont été obtenus à partir de valeurs moyennes de 10 répétitions par traitement pendant les six premiers mois et de trois répétitions par traitement à la récolte finale du douzième mois. Les autres paramètres (pourcentage de colonisation racinaire calculé selon la méthode directe, nombre et longueur d'unités d'infection mycorhizienne) ont été déterminés dans trois boîtes de Pétri inoculées à chaque période de récolte durant toute l'expérience.

Le test statistique de comparaisons multiples de Waller Duncan ($P < 0.05$) a permis d'analyser les paramètres moyens étudiés. Les données du poids frais et de la croissance racinaire ont été interprétées par période de récolte et les autres variables, en fonction du temps. L'homogénéité de la variance a été vérifiée par le test de Bartlett (Anderson and McLean

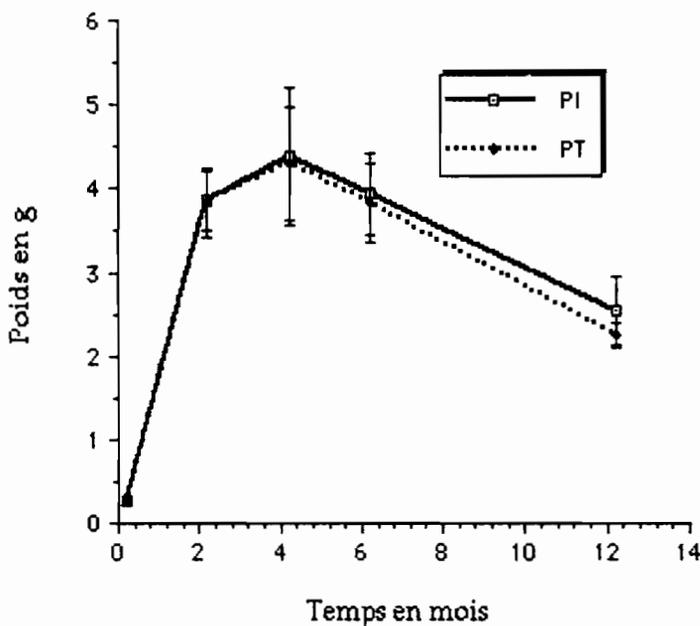
1974). Une transformation logarithmique des données du pourcentage de mycorhization calculé selon la méthode directe et une autre transformation racine carrée sur les spores matures produites ont été nécessaires pour obtenir une distribution normale. A la fin de l'expérience des corrélations linéaires (coefficients de Pearson au seuil de probabilité 0.05) ont été établies entre toutes les variables suivies durant un an de culture. La viabilité des spores produites était le pourcentage de germination de 15 spores testées par traitement sur une période de culture de 10 jours.

RESULTATS

Poids frais des racines transformées inoculées et non inoculées

Le poids frais des racines transformées inoculées a été identique à celui des racines transformées non inoculées (Fig. 1). Le poids frais des racines a augmenté rapidement durant les deux premiers mois de culture, jusqu'à une valeur maximale au quatrième mois et a diminué progressivement jusqu'au douzième mois. Le poids frais des racines a été aussi négativement corrélée à tous les autres paramètres mycorhiziens (Tableau 3).

Figure 1. Evolution du poids frais des racines en boîtes de Pétri inoculées (PI) et non inoculées (PT). Les barres verticales représentent l'écart type de la moyenne.



Propagation in vitro du symbiote fongique

Nos conditions axéniques de culture ont permis un développement très rapide des structures macroscopiques du champignon *G. margarita*. Une semaine après l'inoculation, les hyphes mycéliens de *G. margarita* avaient une morphologie ondulatoire et pouvaient entrer en contact avec les racines isolées ou croître le long de celles-ci.

Après deux mois d'incubation, le mycélium était très dense et couvrait toutes les boîtes de Pétri. Cette propagation active du *G. margarita* a été aussi ponctuée de multiples cellules auxiliaires ornementées typiques de l'espèce qui se formaient en surface par grappes.

La sporulation *in vitro* du *G. margarita* en présence des racines transformées de carotte était effective vers le deuxième mois de culture. Les spores matures néoformées avaient une forme régulière, elles étaient globuleuses et blanchâtres.

Elles apparaissaient isolément en surface dans les boîtes de Pétri et ne semblaient pas avoir de zones préférentielles de formation. Elles pouvaient apparaître à l'intérieur des racines, loin de celles-ci ou dans les bordures de pastilles d'inoculation. Par contre les spores d'origine devenaient de plus en plus brunâtres avec le temps.

En moyenne on enregistrait trois spores matures produites au deuxième mois et un rendement de plus de 400 spores par boîte de Pétri à la fin de l'expérience. A partir du quatrième mois de culture toutes les boîtes de Pétri observées englobaient des nouvelles spores avec un taux de présence allant de 15 à 39 propagules du champignon endomycorhizien.

Cette sporulation variable dans le temps se réalisait suivant deux grandes périodes: la première était lente pendant toute la phase active de développement des racines isolées et la deuxième était rapide avec une perte accentuée du poids frais de ces mêmes racines (Fig. 2). La production axénique de nouvelles spores matures était corrélée positivement à 89% et à 92% respectivement à la longueur et au nombre d'unités d'infection (Tableau 3).

L'influence de l'inoculation en milieu fermé stérile était aussi visible par l'observation de structures microscopiques typiques du *G. margarita* dans les cellules intraracinaires. Les segments de racines colorées pouvaient présenter en même temps divers stades de colonisation.

Les unités d'infection ou segments racinaires massivement envahis par le symbiote fongique s'établissaient de manière variable dans le temps par une augmentation en nombre et en longueur. Entre le deuxième et le douzième mois de culture, le nombre moyen d'unités d'infection passait de 71 à 479 et mesurait respectivement 1,75 et 5,10 mm.

L'évolution de ces derniers paramètres suivait la même allure dans le temps (Fig. 3). En observant les unités d'infection, on était aussi frappé par le nombre élevé des points d'adhérences du *G. margarita* sur les racines isolées.

Viabilité des spores néoformées en conditions in vitro

Le champignon *G. margarita* en association avec les racines génétiquement transformées de carotte a produit de nouvelles spores matures et viables (Tableau 1). Les tests de germination réalisés pour constater cette viabilité ont montré des taux différents. Quarante pour cent des spores ont germé directement sur milieu M gélosé sans la présence de racines ou aucun traitement préalable.

En présence de l'hôte végétal ou après une stérilisation superficielle des spores le taux de germination était de 26,70%. Le séjour au froid d'une semaine des spores avant leur incubation à 27°C a induit un taux de germination de 33,33% au terme des 10 jours d'expérimentation.

Figure 2. Evolution du nombre de spores matures néoformées (Sp) et du poids frais des racines inoculées (Pi) en milieu fermé

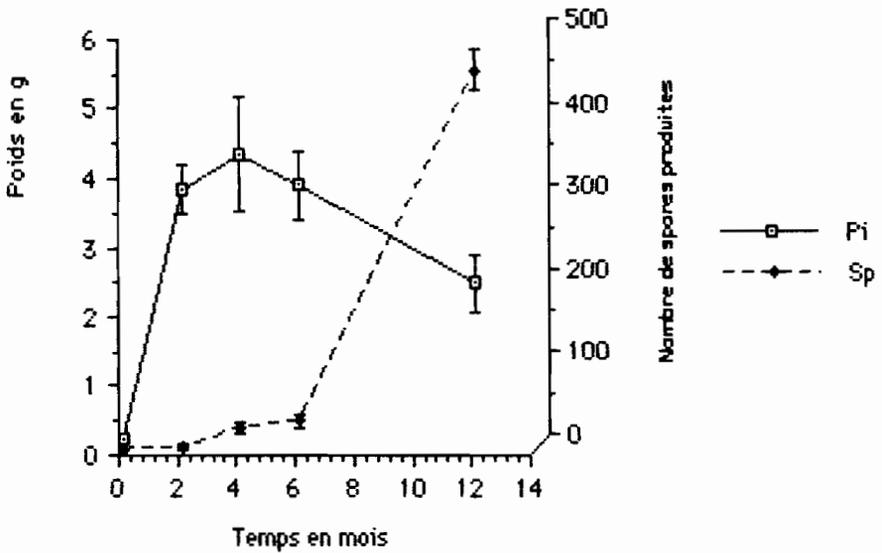
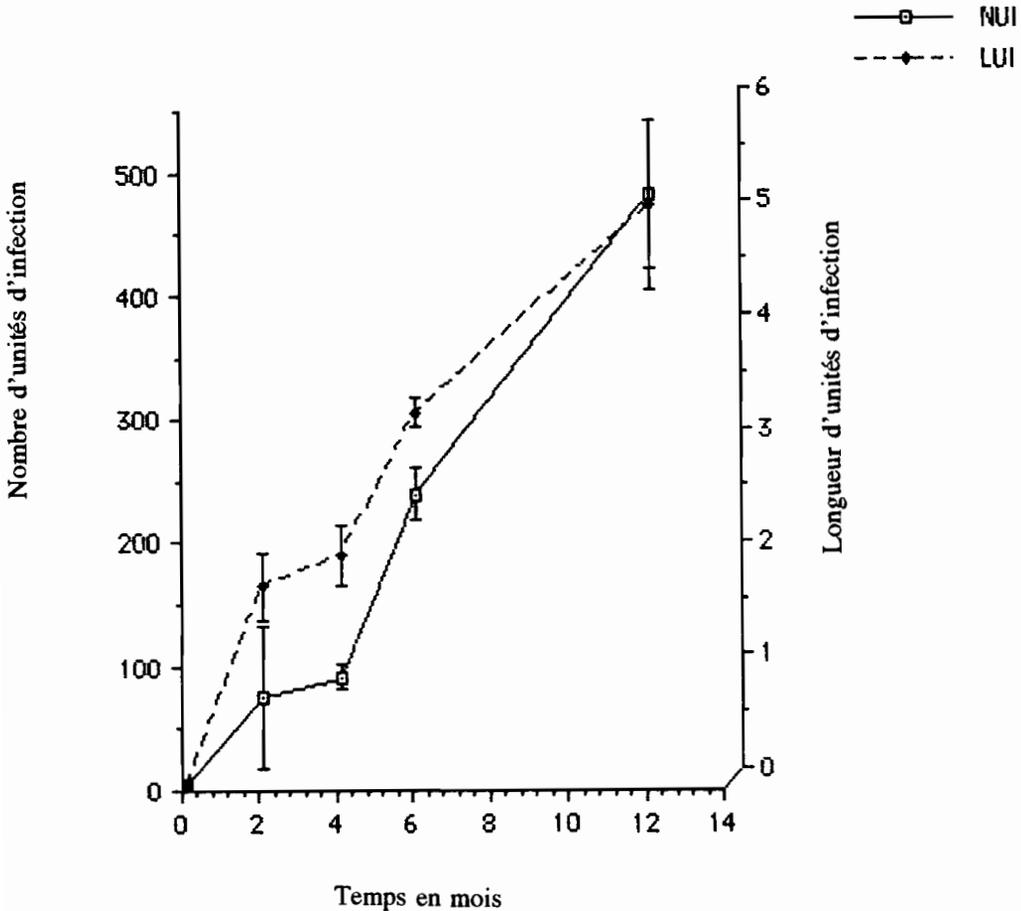


Figure 3. Evolution du nombre et de la longueur des unités d'infection en boîtes de Pétri.
 Nombre moyen d'unités d'infection (NUI), Longueur moyenne d'unités d'infection.
 Chaque point représente la valeur moyenne de trois répétitions.



Degré de colonisation racinaire

Les deux méthodes d'évaluation du taux de colonisation racinaire ont donné des résultats très distincts: a) la méthode Furlan et Fortin (1973) a montré que pendant les quatre premiers mois de culture, les racines transformées de carotte étaient faiblement colonisées par le symbiote fongique. Le degré de colonisation était inférieur à 20%. La présence du champignon était plus importante à partir du sixième mois avec un taux de présence de *G. margarita* estimé à 89,80% au sixième mois et 93,57% en fin d'expérience. b) le degré de colonisation racinaire estimé par la méthode directe de calcul durant les deux et quatre premiers mois était en dessous de 1%, puis était approximativement égal à 3,35 au sixième

mois de culture et à 10,57% après douze mois, ce qui signifiait aussi qu'avec une production fixe de 23 m de racines, seulement un peu plus de 2,43 m ont été réellement colonisés par les arbuscules ou structures fongiques intraracinaires après un an de vie symbiotique. Mais ce pourcentage calculé correspondait en fin d'expérience à près de 500 unités d'infection avec un nombre important de points de pénétration du *G. margarita*.

Les deux méthodes d'estimation du pourcentage de colonisation racinaire étaient aussi corrélées de façon différente à tous les autres paramètres mycorhiziens (Tableau 3). Le pourcentage de mycorhization obtenu selon la méthode directe de calcul a été très positivement corrélé à toutes les autres variables. A titre comparatif et sous nos conditions expérimentales, le pourcentage de colonisation racinaire calculé à partir de cette dernière méthode pouvait expliquer jusqu'à 95% la sporulation et à 97% la présence du nombre d'unités d'infection.

D'autre part, le pourcentage de mycorhization estimé selon la méthode Furlan et Fortin (1973) se liait avec ces mêmes variables selon les taux respectifs de 47 et 84%. On remarquait aussi que les unités mycorhiziennes d'infection étaient positivement corrélées ($r > 0,80$) aux différentes méthodes d'évaluation de la colonisation racinaire.

Tableau 1. Pourcentage de germination des spores néoformées de *G. margarita* en présence des racines transformées de carotte

Matériel	% de germination
spores isolées	40,0
spores + racines	26,70
spores isolées après stérilisation	26,70
spores isolées après choc thermique*	33,33

* Le choc thermique consiste à faire séjourner les spores à 4°C pendant une semaine avant leur incubation à 27°C.

Tableau 2. Pourcentage de colonisation racinaire évaluée par deux méthodes différentes sur une période de 12 mois de culture

Période de culture	Première méthode	Deuxième méthode
2 mois	14,90 d	0,54 c
4 mois	16,25 c	0,77 c
6 mois	89,80 b	3,35 b
12 mois	93,57 a	10,57 a

Dans les colonnes les valeurs non suivies par la même lettre sont significativement différentes au seuil de probabilité 5% (Test de Waller-Duncan).

DISCUSSION

Nos conditions axéniques de coculture du *G. margarita* avec des racines transformées de carotte ont permis l'obtention d'une importante biomasse racinaire, d'une dissémination active du champignon avec des infections typiques et de nombreuses spores néoformées et viables. L'évolution du poids frais des racines transformées de carotte inoculées avec *G. margarita* et non inoculées était sensiblement identique pendant toute l'expérience. En effet, les cellules des tissus racinaires transformées de carotte comme celle d'une tumeur végétale sont douées naturellement d'un potentiel énorme de croissance sans apport hormonal (Tepfer 1984, Nester et al. 1982). De plus ces racines isolées bénéficiaient dans le milieu M gélosé des facteurs physico-chimiques favorables à leur développement. Dans ce milieu de culture, les concentrations critiques de carbone, d'azote et de phosphore ont été calculées suite à des études comparatives avec le milieu d'origine de White. La grande stabilité thermique de la gélose Gel gro contribuait aussi efficacement à l'établissement d'un système racinaire sain et moins nécrosé, ce qui confère à ces racines une indépendance fonctionnelle vis à vis de la colonisation progressive du champignon endomycorhizien.

Tableau 3. Corrélation linéaire entre les différentes variables mesurées

	% est.	Spores	Long UI	Nomb. UI	% calc.	PFR
% est.	1 000	0,476	0,857	0,825	0,772	-0,336
Spores		1 000	0,899	0,921	0,956	-0,579
Long. UI			1 000	0,949	0,969	-0,759
Nom. UI				1 000	0,977	-0,766
% calc.					1 000	-0,807
PFR						1 000

Pourcentage de mycorhization calculé (% calc.); Pourcentage de mycorhization estimé (% est.); Longueur d'Unité d'infection (Long. UI); Nombre d'Unités d'infection (Nomb. UI); Poids Frais des Racines (PFR). NB: Les coefficients r de Pearson sont significatifs au seuil de probabilité 0.05.

La présence d'un important réseau mycélien extramatriciel dans les boîtes de Pétri contenant des racines inoculées était conforme avec les mesures calculées de la croissance hyphale de *G. margarita* (Bécard et Piché 1989a). D'autre part, la prolifération de cellules auxiliaires typiques du champignon à la surface de la gélose avait déjà été mentionnée par Pons et Gianinazzi-Pearson (1985) lors d'observation *in vitro* de la phase extramatricielle du *G. margarita*.

La production de nouvelles spores matures en conditions aseptiques débute vers le deuxième mois de culture. Ces spores produites *in vitro* avaient des tailles plus homogènes comparativement à celles des propagules habituellement récoltées en conditions de serres. L'évaluation de trois nouvelles spores produites après deux mois, rejoignait les résultats des seules études aseptiques faites antérieurement sur *G. margarita* en association avec les racines

de tomate par Miller-Wideman et Watrub (1984) qui avaient utilisé dix spores prégermées du *G. margarita* comme inoculant potentiel.

Nos résultats obtenus dans des conditions axéniques, confirmaient que l'infectivité endomycorhizienne dépend de la viabilité et de la physiologie des spores. La multiplication des spores du *G. margarita* sous nos conditions de culture, était accélérée à partir de six mois pour atteindre un rendement de 449 spores. La formation de ces nouvelles propagules, exigeait au préalable la prolifération d'une grande biomasse végétative matérialisée par un réseau extramatriciel très dense et par l'importance en longueur et en nombre des unités d'infection intraracinaires. Cette sporulation accélérée coïncidait aussi avec une chute aussi accélérée du poids frais des racines et un ralentissement de la croissance racinaire. La forte corrélation négative entre ces deux variables ($r=-0,58$) signifiait leur développement asynchrone. Certains chercheurs (Hall 1976, Tommerup and Abott 1981) ont rapporté la viabilité des hyphes endomycorhiziens dans les racines sénescentes ou mortes. Nos résultats ont confirmé l'existence d'une vie symbiotique active en conditions *in vitro* après un an de culture. Le brunissement des spores "mères d'origine" révélait que ces derniers utilisaient activement leurs réserves lipidiques au cours du temps.

L'observation microscopique des racines transformées de carotte après coloration, montrait que le processus d'infection n'était pas synchronisé au niveau tissulaire. Les différentes étapes de ce phénomène (formation d'appressorium, pénétration intercellulaire ou intracellulaire) pouvaient être visualisées dans le même segment racinaire. L'établissement mycorhizien en conditions aseptiques se manifestait par la présence d'unités d'infection. Ces sites d'échanges nutritionnels préférentiels entre les deux partenaires symbiotiques devenaient importantes avec le temps. Les données relatives aux unités d'infection expliquaient amplement le processus de colonisation racinaire qui se réalisait de deux façons synchronisées dans le temps: par une augmentation du nombre d'unités d'infection et par leur accroissement en longueur.

L'évaluation de l'effet des symbioses mycorhiziennes est basée sur la quantification de paramètres relatifs au macrosymbiote végétal (incidence sur la biomasse et la croissance des systèmes racinaires, éléments nutritifs, vigueur...) et ceux liés au microsymbiote fongique (importance de la phase extramatricielle, nombre de points d'infection, activité reproductrice, pourcentage de colonisation racinaire...). Le degré de colonisation racinaire reste le paramètre le plus employé. Récemment, Giovannetti et Mosse (1980) ont discuté des différentes techniques d'évaluation des racines mycorhizées. Toutes les méthodes se révèlent subjectives donc pouvant induire des surestimations erronées. La méthode de quantification des chitines semble appropriée pour les cultures sur milieux synthétiques stériles pour empêcher la mesure de parasites racinaires renfermant la substance. Une des contraintes à son utilisation réside en la nécessité absolue d'utilisation d'une technologie complexe et destructive pour aboutir à cette fin.

Les deux méthodes de calcul de pourcentage de mycorhization évaluées durant l'expérience ont montré des résultats très différents. La première explication à ces faits, serait liée à leur façon spécifique d'évaluation. Notre méthode directe de calcul (2ème méthode), contrairement à celle de Furlan et Fortin (1973) (1ère méthode), était étroitement corrélée à la formation des spores, des unités d'infection et au développement des racines isolées. Cette

méthode direct axée sur le stade ultime de la mycorhization, caractérisait fortement l'activité métabolique du *G. margarita* en association avec les racines isolées. Ainsi, un pourcentage de colonisation racinaire inférieur à 1% calculé avec cette dernière méthode directe, était suffisant pour l'établissement d'une importante biomasse hyphale et pour déclencher la sporulation du *G. margarita*.

Les spores des champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules peuvent présenter de bonnes caractéristiques morphologiques et être non viables (Miller-Wideman and Watrub 1984, Mugnier and Mosse 1987). Ceci confirme la nécessité de vérifier leur viabilité avant une utilisation à des fins pratiques ou fondamentales. Les nouvelles spores produites dans nos conditions germaient selon quatre procédés de culture. Elles présentaient un meilleur taux de germination (40%), quand elles étaient délicatement transférées dans un autre milieu gélosé M neuf. Ce résultat est en désaccord avec les tests de Miller-Wideman et Watrub (1984) qui mentionnaient la présence absolue de l'hôte végétal pour déclencher la germination de ces spores. Les exsudations racinaires, la stérilisation de surface et les chocs thermiques avaient aussi une influence sur la germination des spores sous nos conditions de culture. Il serait intéressant de comparer le pouvoir germinatif de ces quatre procédés à plus long terme. Des microorganismes non pathogènes pourraient aussi être testés dans la germination de ces spores nouvellement produites (Mosse 1962, Mugnier and Mosse 1987).

La culture mixte *in vitro* de *G. margarita* et des racines isolées est un excellent outil pour comprendre l'évolution de cette association symbiotique. Nos résultats ont montré que *G. margarita* produisait en conditions axéniques de nouvelles spores matures et viables. Cependant, cette capacité de sporulation, n'était seulement possible qu'après l'établissement et le développement de structures extra et intramycéliennes, suivis d'une réduction des activités métaboliques du partenaire végétal. La méthode directe de calcul du pourcentage de colonisation racinaire, est très prometteuse pour évaluer la mycorhization en milieu fermé. D'autre part la possibilité de cultiver en boîtes de Pétri d'autres champignons endomycorhiziens en association avec les racines transformées (Chabot 1990) garantit la diversité des sources d'inocula. Nos travaux ont aussi décrit pour la première fois la productivité à long terme d'une association mycorhizienne dans un même milieu de culture. Des expériences sont en cours pour réduire la période active de sporulation afin de réussir une production axénique d'inoculum à plus grande échelle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anderson V.L. and Mclean R.A. (1974). *Design of experiments. A realistic approach*. Marcel Dekker Inc., Ed. New York. 418 pp.
- Azcon-Aguillar C. and Barea J.M. (1981). Field inoculation of *Medicago* with VA mycorrhiza and *Rhizobium* phosphate-fixing agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry* 13: 19-22.
- Bécard G. and Fortin J.A. (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri-TDNA transformed roots. *New Phytologist* 108: 211-218.
- Bécard G. and Piché Y. (1989a). New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* 112: 77-83.

- Brundrett M.C., Piché Y. and Peterson R.L. (1984). A new method for observing the morphology of vesicular arbuscular mycorrhizae. *Canadian Journal of Botany* 62: 2128-2134.
- Chabot S. (1990). Système axénique de culture en duo comme modèle pour l'étude des endomycorhizes à vésicules et arbuscules. Mémoire M. Sc. Université Laval.
- Francis R., Finlay R.D. and Read D.J. (1986). Vesicular-arbuscular in natural vegetation systems. IV. Transfer of nutrients in inter and intra-specific combinations of host plants. *New Phytologist* 102: 103-111.
- Furlan V. and Fortin J.A. (1973). Formation of endomycorrhizae by *Endogone calospora* on *Allium cepa* under three temperature regimes. *Nat. Can.* 100: 467-477.
- Gerdeman J.W. (1968). Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Annual Review of Phytopathology* 6: 397-418.
- Giovanetti M. and Mosse B. (1980). An evaluation for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84: 489-500.
- Hall I.R. (1976). Response to *Coprosoma robusta* to different forms of endomycorrhizal inoculum. *Transactions of the British Mycological Society* 67: 409-411.
- Mertz S.M., Heitatus III J.J. and Bush R.L. (1979). Mass production of axenic spores of the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Transactions of the British Mycological Society* 72: 167-169.
- Millar-Wideman M.A. and Watrud L.S. (1984). Sporulation of *Gigaspora margarita* on root cultures of tomato. *Canadian Journal of Botany* 30: 642-646.
- Mosse B. (1976). The role of mycorrhiza in legume nutrition on marginal soils. In: Proc. NIFTAL Workshop. Exploiting the legume Rhizobium in tropical agriculture. *Hawaii Coll. Trop. Agric. Misc. Publ.* 145: 275-292.
- Mosse B. (1962). The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *Journal General of Microbiology* 27: 509-520.
- Mosse B. (1973). Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Annual Review of Phytopathology* 11: 171-196.
- Mugnier J. and Mosse B. (1987). Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in transformed Ri T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology* 77: 1045-1050.
- Nelson C.E. and Safir G.R. (1982). Increased drought tolerance of mycorrhizal onion plants caused by improved phosphorus nutrition. *Planta*. 154: 437-443.
- Nester E.W., Gordon M.P., Amasino R.M. and Yanofsky M.F. (1984). Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Annual Reviews of Plant Physiology* 35: 387-413.
- Pons F. and Gianinazzi-Pearson V. (1984). Observations on extra-matrical vesicles of *Gigaspora margarita* *in vitro*. *Transactions of the British Mycological Society* 84(1): 168-170.
- Pons F. et Gianinazzi-Pearson V. (1985). Influence du phosphore, du potassium, de l'azote et du pH sur le comportement *in vitro* de champignons endomycorhizogènes à vésicules et arbuscules. *Cryptogamie mycologie*. Tome 5: 87-100.
- Tepfer D. (1984). Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell*. 37: 959-967.
- Tommerup I.C. and Abbot L.K. (1981). Prolonged survival and viability of VA mycorrhizal hyphae after root death. *Soil Biology & Biochemistry* 13: 431-433.

REGENERATION DE BOURGEONS A PARTIR DE CULTURE DE RACINES D'ACACIA ALBIDA

Yaya ken GASSAMA-DIA* et Emile DUHOUX**

*Département de Biologie Végétale

Faculté des Sciences, Université CAD Dakar, Sénégal

**BSFT (ORSTOM-CTFT)

45 Bis Avenue de la Belle Gabrielle, Nogent sur Marne, France

Résumé: L'utilisation de racines d'*Acacia albida* en vue de clonage "in vitro" constitue une alternative intéressante pour la propagation d'une espèce peu sensible aux autres techniques de multiplication. Des segments de racines prélevés aseptiquement à partir de jeunes individus d'*Acacia albida* et dépourvus de méristème apical ont été utilisés à une fin de clonage.

Des diverses hormones (BAP, zéatine, kinétine et 2ip) et substances de croissance telles que les polyamines (Putrescine, Spermidine, Spermine) testées sur plusieurs milieux de culture en présence d'un gélifiant la gelrite (3,5 g/L), seules la BSP (10 mg/l) et la spermidine (10^5 M) favorisent une prolifération de nombreux bourgeons adventifs en présence d'éléments minéraux de Murashige et Skoog dilués de moitié; au bout de 15 jours de culture, après fissuration des tissus superficiels, les bourgeons émergent directement des tissus internes corticaux de la racine devenus chlorophylliens sans passage par un cal.

Un fragment de racine de 1,5 cm est capable de produire dans les meilleures conditions huit bourgeons adventifs. Ces tissus racinaires présentent une certaine plasticité morphogénétique car ce sont les mêmes groupes de cellules qui sont capables d'évoluer aussi bien vers des structures de racines, de tiges feuillées que de nodules fixateurs d'azote atmosphérique. Les bourgeons évoluent en tigelles qui s'enracinent sur un milieu MS/2 contenant de l'AIA ou l'AIB (0,5 mg/L).

Abstract: The use of *Acacia albida* roots in in vitro cloning is an interesting alternative for the propagation of species that are not very responsive to other techniques. Root segments without apical meristems were taken aseptically from young *Acacia albida* and used for cloning. Out of the various hormones (BAP, Zeatine, Kinetine and 2ip), and growth substances such as polyamines (putrescine, spermidine, spermine) tested on several plant tissue culture media together with gelrite (3,5 g/l), only BAP (10 mg/l) and spermidine (10^5 M) favoured the proliferation of numerous adventitious buds in the presence of mineral elements of Murashige and Skoog diluted to half strength.

After 15 days of culture, and after the superficial tissues became fissured, the buds emerged directly from the internal cortical tissues of the root that had become chlorophyllian without callusing. One isolated root segment measuring 1.5 cm can produce eight adventitious buds under the best conditions. These root tissues show considerable morphogenic flexibility since they can evolve either into root structures, or into shoots with leaves and nodules that fix atmospheric nitrogen. The buds develop into tigella which root in a MS/2 medium supplemented with AIA or AIB (0.5 mg/l).

NODULATION CAULINAIRE ET MORPHOGENESE *IN VITRO* CHEZ *SESBANIA ROSTRATA* BREM (LEGUMINOSEAE) ET DEUX MUTANTS: LE MUTANT "SANS SITE DE NODULATION" ET LE MUTANT "INSENSIBLE A LA PHOTOPERIODE"

M.M. SPENCER-BARRETO*, A. MBODJ*, A.D. SIMA*, A.S. TRAORE*,
P. DELAJUDIE**, K. TOMEKPE**, C. DETREZ**

*Université C.A.D., Faculté des Sciences, Département de Biologie Végétale, Dakar, Sénégal

**Centre de recherche I.S.R.A./O.R.S.T.O.M. Bel-Air,
Laboratoire de Microbiologie des sols, Dakar, Sénégal

Résumé: Une étude comparative de la nodulation et de la croissance a été effectuée chez trois phénotypes de *Sesbania rostrata* Brem: le phénotype sauvage, le mutant "S.S.", sans sites de nodulation apparents sur la tige et le mutant "I.P.", insensible à la photopériode, tous deux obtenus au laboratoire de Microbiologie des sols de l'ORSTOM - Dakar. Par ailleurs, la culture *in vitro* de fragments de cotylédons de *S. rostrata* a été réalisée sur milieu de Murashige et Skoog additionné de divers sucres (saccharose, glucose, lactose et fructose) et régulateurs de croissance (ANA, BAP, Zéatine et Kinétine). Elle a conduit à l'obtention de bourgeons par caulogénèse adventive directe. Le taux de régénération obtenu permet d'envisager l'utilisation de cette voie d'organogénèse dans un programme de transformation génétique par *Agrobacterium tumefaciens* pour, notamment, l'étude de l'expression de gènes impliqués dans la nodulation caulinaire.

Abstract: A comparative study was done on the nodulation and growth of three phenotypes of *Sesbania rostrata* Brem. It included the wild phenotype, the mutant "S.S." (without any obvious nodulation on the stem) and the mutant "I.P.", which is insensitive to photoperiod; both mutants were obtained from the ORSTOM Laboratory for Soil Microbiology in Dakar. Moreover, the *in vitro* culture of fragments of *S. rostrata* cotyledons was realized in a Murashige and Skoog medium, to which various sugars (sucrose, glucose, lactose and fructose) and growth regulators (NAA, BAP, zeatin and kinetin) were added. Buds were thus obtained by direct adventitious caulogenesis. The rate of regeneration obtained enables the use of this method of organogenesis to be envisaged in a programme of genetic processing by *Agrobacterium tumefaciens*, namely for the study of genes involved in caulinary nodulation.

Sesbania rostrata Brem. est une légumineuse tropicale annuelle appartenant à la sous-famille des Papilionoïdeae (Berhaut 1976) et à la tribu des Papilionoïdeae-Robinieae (Golblatt 1981). Cette tribu comprend 21 genres recensés essentiellement au Mexique, en Inde (régions occidentales), en Afrique et dans le Nord de l'Amérique du Sud. Le genre *Sesbania* est particulièrement répandu dans les régions humides et sub-humides des Tropiques. Au Sénégal, *S. rostrata* se rencontre dans les sols humides, aux abords des fleuves (Sénégal, Sine et Saloum et Casamance), dans les Niayes (dépressions interdunaires littorales où la nappe phréatique affleure) et dans les rizières. *Sesbania rostrata* se caractérise essentiellement par la présence sur la tige de nombreux primordia racinaires répartis le long de génératrices verticales, observables depuis le collet jusqu'au sommet de la plante (Duhoux et Dreyfus 1982). Lorsqu'ils sont infectés par *Azorhizobium caulinodans*, ces primordia racinaires se développent en nodules caulinaires fixateurs d'azote atmosphérique (Dreyfus and Dommergues 1981). La position aérienne des nodules confère à la plante la capacité à fixer l'azote en conditions d'inondation du sol et en présence d'azote minéral (Dreyfus and Dommergues

1981). Il a en outre été démontré que la nodulation caulinaire décuple les capacités fixatrices de l'espèce (Rinaudo *et al.* 1983).

Au stade actuel des recherches, une amélioration de l'effectivité de la symbiose *S. rostrata/A. caulinodans* est recherchée en agissant au niveau de la bactérie mais également au niveau de la plante. Dans ce dernier cas, les manipulations visent plus particulièrement à accroître la production de biomasse du *Sesbania* pour l'utilisation comme engrais vert (Allen and Allen 1981, Kapoor and Gupta 1986, Becker *et al.* 1988, Ndoye and Dreyfus 1988), à conforter les résistances de la plante face à certaines contraintes environnementales (photopériode, nématodes...) et à comprendre les phénomènes qui régissent la présence de sites de nodulation caulinaire et leur morphogenèse ultérieure. Notamment, la nature racinaire des sites de nodulation ouvre la voie à d'intéressantes investigations concernant les mécanismes cytophysiologiques de la rhizogenèse, et de l'organogenèse adventive *in vitro* (Duhoux 1984, Spencer-Barreto *et al.* 1989).

Au laboratoire de Microbiologie des sols de Bel-Air, une mutagenèse chimique par trempage des graines dans une solution d'Ethyl Méthane Sulfonate (E.M.S) a permis l'obtention de deux phénotypes mutants de *Sesbania rostrata*: un mutant (SS) sans site de nodulation apparent sur la tige et un mutant (IP) insensible à la photopériode pour la floraison, apte à fleurir quelle que soit la photopériode alors que le sauvage ne fleurit qu'en période de jours courts. Les résultats présentés dans cette communication ont pour but, d'une part, d'identifier et de comparer les caractéristiques de croissance et développement des parties aériennes et racinaires de *Sesbania rostrata* "sauvage" et des deux mutants "SS" et "IP", et d'autre part de proposer une méthode efficace de morphogenèse adventive *in vitro* chez *S. rostrata*.

MATERIEL ET METHODES

Etude comparative de la nodulation et de la croissance des trois phénotypes de S. rostrata

Des graines de *S. rostrata* sont scarifiées à l'acide sulfurique à 96% (30 min.) puis stérilisées à l'aide d'une solution d'hypochlorite de calcium à 7% pendant 20 minutes. Après un rinçage minutieux à l'eau distillée stérile les graines sont mises à germer dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée à 0,6%.

Les jeunes plantes de 2 à 3 cm sont repiquées, soit en pots de 17 cm x 21 cm contenant du sol de Bel-Air stérile, soit en tubes Gibson sur milieu gélosé incliné. Le milieu contient 20 ml de macroéléments et 5 ml de microéléments de la solution de base de Murashige et Skoog (1962) additionnés de fer chélaté (5 ml/l), et de 8 g/l d'agar (Bacto Agar). Le pH est ajusté à 5,7 avant autoclavage à 120° pendant 20 min.

Les cultures sont effectuées d'une part dans la salle de culture avec un éclairage continu de 3000 lux, une température comprise entre 27° et 29°C et une hygrométrie de 70%, d'autre part dans une serre de la station du centre de recherche ISRA/ORSTOM de Bel-Air. Les plantes ont été inoculées par badigeonnage des tiges ou injection dans le sol d'une suspension bactérienne de la souche d'*Azorhizobium caulinodans* (10⁹ cellules/ml) cultivée sur le milieu YL (Vincent 1970).

Morphogénèse in vitro à partir de fragments de cotylédons et d'embryons immatures

Les techniques de culture in vitro

Après germination axénique, les jeunes plantes sont sectionnées stérilement, de manière à isoler les cotylédons qui sont fragmentés et ensemencés sur milieu gélosé à raison de 20 fragments par boîte de Pétri. La base minérale et les vitamines de MS (1962) ont été utilisées, additionné ou non, avant autoclavage, d'un sucre (saccharose, glucose, lactose ou fructose) à différentes concentrations (15, 30 ou 60 g/l) et de phytorégulateurs. Quatre phytorégulateurs ont été testés dans les combinaisons suivantes:

Acide α naphthalène acétique (ANA) 1 mg/l	+	Benzylaminopurine (BAP) 1 mg/l
Acide α naphthalène acétique (ANA) 1 mg/l	+	Zéatine 1 mg/l
Acide α naphthalène acétique (ANA) 1 mg/l	+	Kinéatine 1 mg/l

L'agent gélifiant (Bacto Agar-Difco ou Past Agar A-Pasteur) est additionné à raison de 8 g/l. Le pH est ajusté à 5,4 - 5,6 par addition de soude (0,1N) avant autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. Après ensemencement, les explants sont transférés en chambre de culture à 27+2°C, sous un éclairage continu de 3000 lux.

Les techniques de microscopie électronique à balayage

Les observations ont été réalisées sur des fragments de cotylédons de *S. rostrata* fraîchement prélevés des cultures, puis essuyés délicatement sur du papier absorbant afin d'éviter la formation ultérieure de givre à la surface des échantillons lors du passage au froid. Après immersion dans l'azote liquide pendant 30 sec. à 1 min. les échantillons sont transférés dans le sas du microscope lui-même refroidi par une circulation d'azote liquide. L'observation des échantillons est effectuée sans métallisation préalable, les parois cellulaires renfermant suffisamment d'électrolytes pour assurer la conduction des électrons, sous reste relativement faible et comprise entre 10 à 15 kV (Vartanian 1983).

RESULTATS

Etude comparative de la nodulation et de la croissance des parties aériennes des différents phénotypes de S. rostrata

Les plantes des trois phénotypes cultivées en pots ont subi soit l'inoculation simple des racines séminales soit une double inoculation (racines séminales et sites d'infection de la tige). Ces plantes ainsi inoculées ont été maintenues dans deux conditions d'hydratation du sol: arrosage quotidien à la capacité au champ ou inondation des parties basales des tiges. Les plantes sont

récoltées après 70 jours de culture et plusieurs paramètres, reportés aux Tableau 1 et 2, ont été mesurés: nombre de nodules, poids des nodules, poids de la partie aérienne et hauteur des plantes. Le mutant "SS" présente une croissance nettement supérieure à celle des deux autres en condition non inondée, notamment en ce qui concerne le poids sec des plantes.

Tableau 1. Croissance et nodulation des trois phénotypes de *S. rostrata* en condition d'inondation du sol

Phénotype	Traitement	Nb. de nod./pl.	Poids sec des nod. (g/pl.)	Hauteur des plantes (cm/pl.)	Poids sec des parties aériennes (g/pl.)
Sauvage	Témoin	26,8 a	0,7 ab	166,7	17,6 a
	Rac. inoc.	183,3 bc	0,6 ab	193,3	21 a
	Rac. + tig. inoc.	173,6 c	0,3 a	195,2	19 a
"IP"	Témoin	307 a	0,9 a	180,2	18,4 a
	Rac. inoc.	191 bc	0,2 b	203,5	20 a
	Rac. + tig. inoc.	112,3 cd	0,7 ab	188	17,8 a
"SS"	Témoin	57,4 d	1,3 ab	117,5	10,1b
	Rac. inoc.	67,4 d	1,8 a	167,8	14,1 b

Tableau 2. Croissance et nodulation des trois phénotypes de *S. rostrata* en condition de drainage du sol (= non inondation)

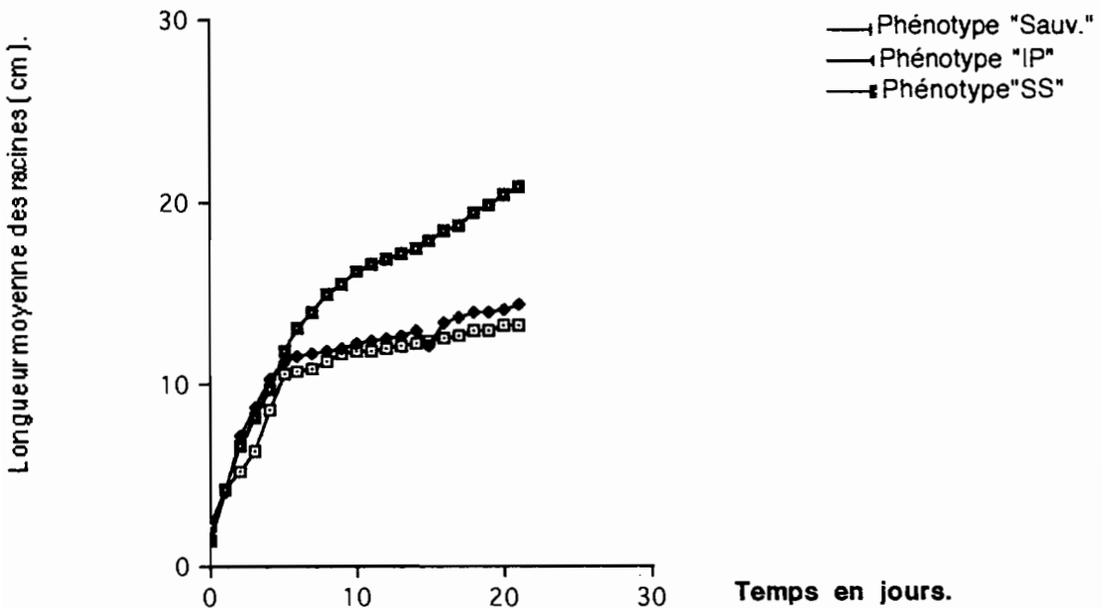
Phénotype	Traitement /plante	Nb. de nod/pl.	Poids sec des nod. (g/pl.)	Hauteur des plantes (cm/pl.)	Poids sec des parties aériennes (g/pl.)
Sauvage	Témoin	124 ab	0,9 a	175	15,8
	Rac. inoc.	103,3 ab	0,5 b	189	16,6 b
	Rac. + tig. inoc.	118,3 a	0,4 bc	187	20,9 b
"IP"	Témoin	131,1 a	0,4 bc	183	15,6 b
	Rac. inoc.	140,1 a	0,3 bc	177	17,7 b
	Rac. + tig. inoc.	112,5 ab	0,2 bc	173	20,4 b
"SS"	Témoin	53,06 b	1,0 ab	152a	19,8 b
	Rac. inoc.	53,6 b	0,7 ab	182	27,1 a

N.B. Chaque chiffre est la moyenne de six répétitions par phénotype. Pour une même colonne les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 5% (Newman and Keuls 1957).

Croissance des racines séminales des différents phénotypes de S. rostrata

Des plantes des trois phénotypes ont été cultivées en tubes Gibson sur milieu gélosé. Des mesures quotidiennes de la longueur des racines ont été effectuées à partir du repiquage jusqu'au 21ème jour. La figure 1 illustre l'élongation racinaire obtenue sur la base de 30 mesures par phénotype. Il n'apparaît pas de différence nette entre l'élongation racinaire du phénotype sauvage et du phénotype "IP". Par contre le phénotype "SS" présente une croissance racinaire significativement plus importante.

Figure 1.



Croissance des racines séminales des 3 phénotypes de *S. rostrata*..

Morphogenèse in vitro des fragments de cotylédons de S. rostrata

Callogenèse et rhizogenèse

La culture *in vitro* de fragments de cotylédons de *S. rostrata* peut conduire à la formation de cals, de structures racinaires, ou encore de bourgeons adventifs. Ces différentes voies de morphogenèse sont directement liées à l'addition à la base minérale et aux vitamines de MS, de sucres et de régulateurs de croissance. A l'exclusion du milieu témoin MS, non supplémenté, des cals se développent quel que soit le milieu de culture testé, dès le 5ème jour de culture. Ils s'initient exclusivement sur les zones de sectionnement des explants. La

formation de structures racinaires ou pseudoracinaires, caractérisées précocément par une base proéminente et une pointe chlorophyllienne, interviennent un peu plus tardivement, vers le 10ème jour. Ces structures n'ont jamais été observées, ni dans le milieu de culture additionné de fructose à 15 g/l, ni dans le milieu témoin.

Etude morphologique et histologique des bourgeons adventifs

Les premières manifestations d'une caulogénèse adventive s'observent à la fin de la première semaine de culture. De petites protubérances fortement chlorophylliennes que nous appelons "points végétatifs" apparaissent alors à la surface des explants, associées ou non à une zone de sectionnement de l'explant. L'observation, en microscopie électronique à balayage, de coupes axiales des points végétatifs montre sous l'assise des cellules épidermiques de l'explant associée à deux à trois assises de cellules sous épidermiques, une zone constituée de petites cellules méristématiques.

La morphogénèse se poursuit en position interne du dôme de cellules épidermiques et sous épidermiques comme on peut l'observer sur une coupe axiale réalisée vers le 12ème jour de culture (Fig. 2). Elle conduit à l'élaboration des premiers primordia foliaires. Au début de la deuxième semaine de culture, des bourgeons émergent de l'épiderme de l'explant, à raison d'un ou plusieurs bourgeons par point végétatif (Fig. 3). Notons que dans aucun cas on n'observe la formation transitoire de cal; il s'agit donc un bourgeonnement adventif direct et d'origine endogène.

Influence de la source de carbone sur le bourgeonnement adventif des fragments de cotylédons de S. rostrata

De nombreux travaux relatifs au bourgeonnement adventif ont montré que l'addition d'une source de carbone, généralement sous la forme d'un sucre, est indispensable à l'induction d'une morphogénèse *in vitro*, parmi les plus récents nous citerons, Niedz *et al.* (1989) et Sharma *et al.* (1990). Il apparaît très nettement sur la figure 3 que le glucose à 15 g/l et le lactose à 30 g/l sont les plus favorables à l'induction d'une caulogénèse adventive chez *S. rostrata*. Ces deux sucres montrent des effets inhibiteurs de la caulogénèse à des concentrations plus élevées (60 g/l).

Influence de l'agent gélifiant

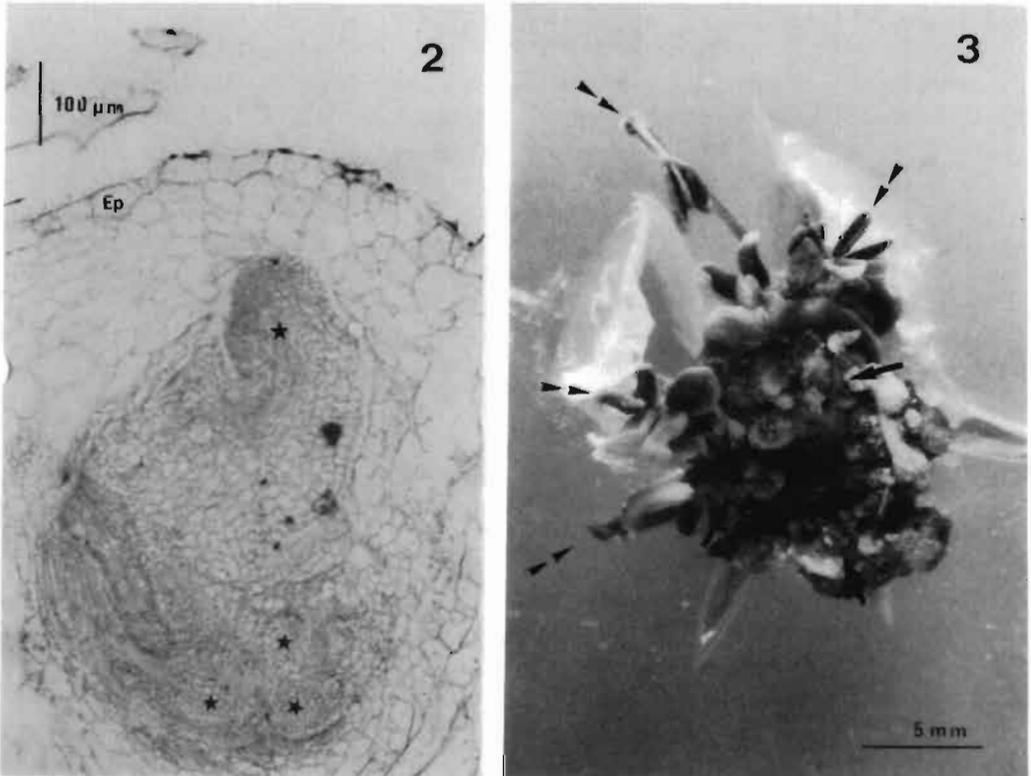
Nous avons ici comparé les taux de caulogénèse en présence de Bacto Agar-Difco ou de Past Agar A-Pasteur. 65% des explants cotylédonnaires ont manifesté une caulogénèse en présence de Bacto agar additionné au milieu MS+lactose 30g/l.

Pour des conditions de culture, par ailleurs identiques, moins de 10% des explants sont caulogènes en présence de Past Agar A. Les taux de bourgeonnement les plus élevés en présence de Past Agar ont été relevés sur le milieu MS+Lactose 30g/l+ glucose 15g/l.

Figure 2. Coupe transversale, observée en microscopie photonique, d'un fragment cotylédonnaire organogène de *Sesbania rostrata*. Noter la présence, au sein des assises sous-épidermiques de l'explant, de zones méristématiques en cours d'organisation (étoiles).

Ep: épiderme du fragment cotylédonnaire.
Inclusion: Paraplast; Coloration: Bleu de méthylène.

Figure 3. Surrection (flèches) et élongation (double flèches) des bourgeons adventifs néoformés par caulogénèse adventive directe sur un fragment cotylédonnaire de *Sesbania rostrata*



Influence de phytorégulateurs de type cytokinique

Trois cytokinines ont été étudiées: la BAP, la Kinétine et la Zéatine à la même concentration de 1 mg/l; elles ont été associées dans chaque expérimentation à 1 mg/l d'ANA et additionnée à la base de MS+lactose 30 g/l+glucose 15 g/l+Past Agar. Le tableau 3 souligne un effet caulogène indiscutable de la BAP à 1 mg/l.

Tableau 3. Influence de trois cytokinines sur le pourcentage de bourgeons adventifs obtenus en culture *in vitro* de fragments de cotylédons

Temps (jours)	BAP + ANA (1 mg + 1 mg/l)	K + ANA (1 mg + 1 mg/l)	Z + ANA (1 mg + 1 mg/l)
5	0	0	0
10	0	0	0
15	19	0	0
20	20	0	0

Additionné à la base MS+lactose 30g/l+Bacto Agar, la Kinétine et la Zéatine se sont révélées inefficaces à induire le bourgeonnement adventif.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Des résultats relatifs à la croissance et la nodulation des trois phénotypes de *S. rostrata*, il ressort que le mutant "IP" présente le même comportement que le phénotype sauvage dans les deux conditions d'hydratation du sol. Par contre le mutant "SS" se développe beaucoup mieux en condition de drainage. Ce phénotype semble donc moins bien adapté que les deux autres aux milieux inondés, sites naturels de ces plantes. Ce comportement pourrait s'expliquer par l'absence de sites de nodulation caulinaire chez le mutant "SS" et confirme le rôle des sites eux-mêmes quant à l'écologie de la plante. Moundiongui (1987) a en effet montré qu'en condition d'inondation, la fixation d'azote au niveau de la plante est assuré en quasi totalité par les nodules aériens, les nodules de racines intervenant pour une part très minime.

Par ailleurs, des travaux antérieurs ont montré que les sites de nodulation de *S. rostrata* qui sont en fait des ébauches de racines adventives, peuvent intervenir dans la nutrition hydrique et minérale de la plante (Spencer-Barreto *et al.* 1989). Ces structures racinaires "en attente" déjà décrites chez d'autres plantes (Vartanian 1971) permettraient à la plante de se développer rapidement en condition d'inondation par l'établissement d'une surface absorbante plus importante.

Le mutant "SS" se caractérise à la fois par l'absence des sites de nodulation aérienne, c'est-à-dire par l'absence d'ébauches racinaires adventives sur la tige et par un développement plus important du pivot racinaire comparé aux deux autres phénotypes de *S. rostrata*. L'étude

génétique et moléculaire de ce mutant pourrait donc permettre l'isolement de gènes impliqués dans l'induction et l'élongation racinaire et l'étude fondamentale de la rhizogenèse zygotique ou adventive. Nos travaux relatifs à l'organogenèse adventive en culture de cotylédons ont permis d'atteindre un taux de bourgeonnement adventif équivalent à 65% d'explants caulogènes et à la néformation de 5 à 10 bourgeons par explant caulogène, ce qui constitue un accroissement très sensible des taux antérieurement rapportés par Vachlova *et al.* (1987).

Les résultats relatifs à l'influence des sucres ouvrent, en outre, des perspectives intéressantes quant aux possibilités d'amélioration des potentialités organogènes de *Sesbania rostrata* en culture *in vitro*. Il est en effet exceptionnel d'utiliser le lactose et non le saccharose ou le glucose, pour promouvoir l'organogenèse adventive et le métabolisme de ce sucre au cours de la culture de cotylédons devra être étudié.

Ainsi, la sensibilité de *S. rostrata* à *Agrobacterium tumefaciens* et *A. rhizogenes* (Vachlova *et al.* 1987) et la mise au point d'une technique efficace et reproductible d'organogenèse *in vitro*, constituent deux acquis fondamentaux pour des expériences futures de transformation, par exemple chez le mutant "sans site" de *S. rostrata*, en vue d'une étude moléculaire de l'expression de gènes impliqués dans la nodulation caulinaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allen O.N. and Allen F.K. (1981). *The Leguminosae. A source of characteristics, uses and nodulation*. Madison Wisconsin (E.U.) University of Wisconsin Press.
- Becker M., Ladha J.K., Watanabe I. and Ottow J.C.G. (1988). Seeding vs vegetative propagation of the stem nodulating green manure *Sesbania rostrata*. *Biol. fertil. Soils*. 6: 279-281.
- Berhaut J. (1976). *Flore illustrée du Sénégal*. Clairafrique éd. Dakar, Tome 5. 1485 pp.
- Dreyfus B.L. and Dommergues Y. (1981). Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. *Microb. Lett.* 10: 313-317.
- 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. Acad. Sc. Paris*. 294: 407-411.
- Duhoux E. (1984). Ontogenèse des nodules caulinaires de *Sesbania rostrata*. *Can. J. Bot.* 62: 982-994.
- Goldblatt P. (1981). Cytology and phylogeny of Leguminosae. In: *Advances in legume systematics*. R.M. Polhill and P.H. Raven, Eds. Royal Botanical Gardens. Kew. 2: 427-463.
- Kapoor S. and Gupta S.C. (1986). Rapid *in vitro* differentiation of *Sesbania bispinosa* plants: a leguminous shrub. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*. 7: 263-268.
- Moundiongui A. (1987). *Sesbania rostrata*, légumineuse à nodules caulinaires: fixation symbiotique de l'azote et utilisation comme engrais vert. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard. Lyon I.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15: 473-497.
- Ndoye I. and Dreyfus B.L. (1988). Nitrogen fixation by *Sesbania rostrata* and *S. sesban* estimated using ¹⁵N and total N difference methods. *Soil Biol. Biochem.* 20: 209-213.
- Niedz R.P., Smith S.S., Dunbar K.B., Stephens C.T. and Murakishi H.H. (1989). Factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants. *Plant, Cell, Tissue, and Organ Culture* 189: 313-319.
- Rinaudo G., Dreyfus B.L. and Dommergues Y.R. (1983). *Sesbania rostrata* green manure and nitrogen content of crop and soil. *Soil Biol. Biochem.* 15: 111-113.

- Sharma K.K., Bhojawani S.S. and Thorpe T.A. (1990). Factors affecting high differentiation of shoots and roots from cotyledon explants of *Brassica juncea* L. *Czern. Plant. Science* 66: 247-253.
- Spencer-Barreto M.M., Gagnaire J., Plebin R., Beaudoin G. et Duhoux E. (1989). Les mamelons caulinares de *Sesbania rostrata* Brem: développement en racines adventives et rôle dans l'absorption minérale. *Acta Oecologia. Oecol. Plant.* 4: 411-422.
- Vachlova M., Metz A. B., Shell J. and Bruijn F.J. (1987). The tropical legume *Sesbania rostrata*: tissue culture, plant regeneration and infection with *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes* strains. *Plant Science.* 50: 213-223.
- Vartanian N. (1971). Action morphogénétique du facteur hydrique sur le système racinaire de *Sinapis alba* L.- Rhizogénèse et potentiel hydrique. *Rev. gén. Bot.* 78: 19-20.
- Vincent J.M. (1970). A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP. Handbook No. 15. Blackwell, Oxford. 164 pp.

**ACACIA ALBIDA, UNE LEGUMINEUSE ARBORESCENTE
A FORT POTENTIEL MYCORHIZIEN
ET FIXATEUR D'AZOTE**

M. GUEYE*, T. DIOP**, B. NDAO*

*MIRCEN Centre ISRA-ORSTOM B.P. 1386 Dakar, Sénégal

**Centre ISRA-ORSTOM B.P. 1386 Dakar, Sénégal

***Résumé:** Dans les zones sahéliennes et soudano-guinéennes du Sénégal, *Acacia albida* révèle une vie symbiotique très active. La symbiose se manifeste pendant les grandes phases de développement de l'arbre (jeunes et adultes) puis sur des drageons et indépendamment des saisons. Des échantillons de racines de *Acacia albida* prélevés à différentes périodes et sur différents sites au Sénégal ont montré la présence simultanée d'endomycorhizes et de nodules. *Acacia albida* présente donc une double infection par les champignons endomycorhiziens et les rhizobiums. Une étude en serre de l'effectivité de trois souches de *Rhizobium* en présence et en absence de *Glomus mossae* a été réalisée sur des semis d'*Acacia albida* cultivés en gaines contenant du sol stérile. Cette étude a montré que l'association symbiotique la plus performante a été *Acacia albida* x Souche de *Rhizobium* MAO 266 pour laquelle il y a un meilleur indice de nodulation, puis une augmentation significative de l'activité nitrogénasique comparativement aux autres associations *Acacia albida* x MAO 222 et *Acacia albida* x MAO 236 (+129% et 223% respectivement).*

***Abstract:** *Acacia albida* shows a very active symbiotic life in the Sahelian and Sudano-Guinean zones of Senegal. Symbiosis is manifested during the different development phases (suckers, youth, adult), and does not depend on the season. *Acacia albida* roots have been sampled at different seasons and at different sites in Senegal. Endomycorrhiza and nodules have been found at the same time. *Acacia albida* thus has a double infection, by endomycorrhizal fungi and by rhizobia. A study was carried out on the effectiveness of three strains of *Rhizobium* -in the presence and absence of *Glomus mossae* - on *Acacia albida* cultivated in the greenhouse in sheaths containing sterile soil. The study showed that the most productive symbiotic association was *Acacia albida* x *Rhizobium* strain MAO 226 which has a better nodulation index, and a significantly greater nitrogenasic activity than other associations such as *Acacia albida* x MAO 222 and *Acacia albida* x MAO 236 (+129% and 223% respectively).*

Acacia albida est un arbre fixateur d'azote très répandu dans les écosystèmes forestiers tropicaux africains. Son cycle végétatif inversé lui confère de multiples avantages parmi lesquels un effet très bénéfique au rendement des cultures pratiquées sous l'arbre. Cependant, le potentiel de *A. albida* dans la gestion de la flore fixatrice d'azote est totalement méconnu.

La présente communication rapporte les résultats des études prospectives conduites au Sénégal, dans le cadre de la lutte contre la désertification, pour l'inoculation de *A. albida* en pépinière avec des souches de *Bradyrhizobium* et des souches d'endomycorhizes.

MATERIEL ET METHODES

Evaluation du potentiel endomycorhizien de Acacia albida

Le potentiel endomycorhizien (nombre et viabilité des spores, infection des racines) a été évalué chez des sujets d'*A. albida* jeunes et adultes puis sur des drageons. Cette évaluation a été effectuée en saison sèche et en saison humide dans quatre localités sélectionnées dans l'aire géographique d'*A. albida* au Sénégal: Louga et Diokoul dans la zone sahélienne et Djinaki et Cabrousse dans la zone soudano-guinéenne.

Nombre et viabilité des spores: Cent grammes d'un échantillon prélevé au pied de chaque arbre ont été mis en suspension dans 900 ml d'eau. Après une agitation vigoureuse et une décantation le surnageant a été recueilli dans un bécher et le culot remis en suspension dans 900 ml d'eau. L'opération a été répétée cinq fois de façon à collecter toutes les spores contenues dans les 100 g de sol. Le surnageant a été ensuite versé à travers un tamis de 50 μm et le dépôt récupéré dans 20 ml d'eau à partir desquels un prélèvement de 5 ml a été effectué. Ce prélèvement a été ensuite déposé sur une lame de verre creuse, graduée pour le dénombrement des spores sous un microscope photonique. Le nombre total de spores a été rapporté aux 100 g de sol. Le nombre de spores viables contenues dans le même échantillon de sol a été évalué dans les mêmes conditions selon la méthode de An *et al.*, (1990a, 1990b).

Infection mycorhizienne: Des fragments racinaires de chaque plante ont été collectés et lavés à l'eau pour éliminer toutes les particules de sol. Ils ont été ensuite colorés au bleu de trypan 10% dans du lactophénol (Phillips et Hayman 1970). Le pourcentage d'infection racinaire selon la formule suivante:

$$\% \text{ d'infection} = \frac{\text{Nombre de fragments racinaires infectés}}{\text{Nombre de fragments racinaires observés}} \times 100$$

Criblage de souches de Rhizobium sur Acacia albida en présence ou en absence de Glomus mossae

Des graines de *A. albida* stérilisées sont mises à germer pendant 2 j dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée stérile. Chaque plantule a été ensuite transplantée dans une gaine contenant 1 kg de sol stérile prélevé à Séo, dans la région centre nord du Sénégal. Le sol de Séo a un pH (eau) de 6,43 et renferme 460 ppm C total, 45 ppm N total, 136 ppm P total et 12 ppm P assimilable (Olsen *et al.* 1954). Au moment de la transplantation, les plantules ont été réparties en deux lots pour deux expériences conduites simultanément.

Dans la première expérience, chaque plantule a été inoculée avec 1 ml d'une suspension de *Rhizobium* sélectionnée au MIRCEN de l'Afrique de l'Ouest (MAO) contenant 10^9 cellules/ml. Trois souches de *Rhizobium* ont été utilisées pour cette expérience: MAO 222, MAO 226, MAO 236. Un traitement non inoculé avec une souche de *Rhizobium* servait de témoin. La deuxième expérience comportait les quatre traitements décrits dans la première expérience. De plus, chaque plantule a été inoculée avec 10 ml d'une suspension d'hyphes et de spores

de *Glomus mossae* préparé comme décrit par Gueye et Bordeleau (1987). Tous les traitements des deux expériences sont répétés cinq fois. Les plantules sont arrosées quotidiennement avec de l'eau de robinet, et une fois par semaine avec 100 ml de solution nutritive Hewitt diluée au 1/4 (Hewitt 1966). Trois mois après la transplantation (MAT), l'infection mycorhizienne a été déterminée comme précédemment; la FBA a été estimée par l'activité réductrice d'acétylène (ARA), (Hardy *et al.* 1968), l'indice de nodulation (I. Nod), (Gueye *et al.* 1988), le poids sec des parties aériennes et des nodules, l'azote total et le phosphore total des parties aériennes.

RESULTATS ET DISCUSSION

Présence de spores de champignons endomycorhiziens

Dans les quatre localités le nombre de spores varie de 1,5 à 2 spores par gramme de sol (Fig. 1) contrairement aux sols du centre-est d'Angleterre (Read *et al.* 1976) et aux sols du Kentucky (An *et al.* 1990). Les spores observées sont généralement jaunes, jaunes-oranges ou noires appartenant au genre *Glomus* ou *Gigaspora*. Dans toutes ces localités, le nombre de spores par gramme de sol (plus important autour des racines des jeunes *A. albida*) augmente en saison des pluies: chez les jeunes, l'augmentation a été de +126%, +145%, +83%, +67% respectivement à Louga, Diokoul, Djinaki et Cabrousse; chez les adultes, les accroissements respectifs ont été de +150%, +530%, +102% et +99% (Fig. 1). Dans les deux cas, l'accroissement du nombre de spores est plus marqué en zone sahélienne qu'en zone soudano-guinéenne: cela s'explique par la réaction des endomycorhizes qui forment beaucoup de spores en condition de stress hydrique (Diop 1990); d'autre part, l'augmentation de spores en zone sahélienne est plus marquée chez *Glomus* sp. que chez *Gigaspora* sp.

Viabilité des spores d'endomycorhizes

Le nombre de spores viables dans tous les sols étudiés est relativement faible, malgré le nombre élevé de spores estimé dans chaque échantillon (Fig. 2). Dans ces conditions, l'inoculation avec un grand nombre de spores viables d'un champignon endomycorhizien convenablement choisi pourrait avoir un effet significatif sur la croissance de jeunes plantules de *Acacia albida*. Chez les *A. albida* (jeunes ou adultes), le nombre de spores viables par gramme de sol augmente dans toutes les localités pendant la saison des pluies. Cette augmentation est plus significative à Louga (localité de la zone sahélienne où l'on observe la faible densité de spores) qu'à Cabrousse (localité de la zone guinéenne où on a observé la plus forte densité de spores dans le sol). Ces résultats montrent qu'il y a aucune corrélation entre le nombre total de spores et le nombre de spores viables confirmant ainsi ceux de Read *et al.* (1976).

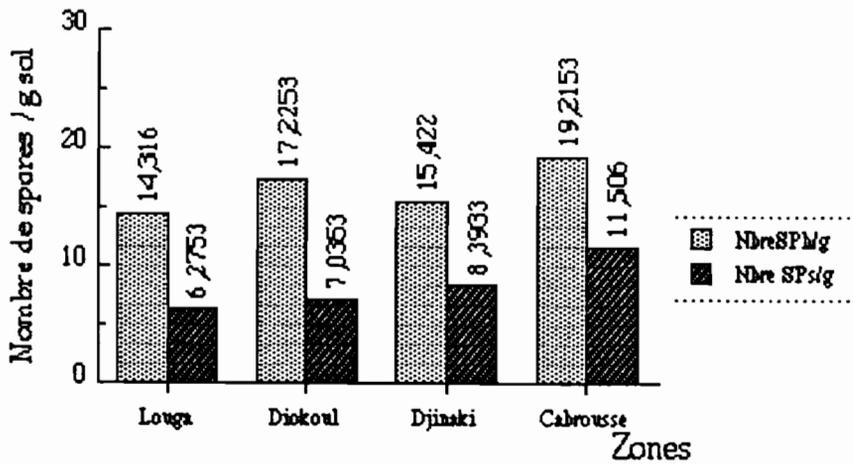
Colonisation des racines de Acacia albida par les endomycorhizes

Chez les *A. albida* jeunes ou adultes, les pluies n'ont pas une action significative sur la colonisation des racines par les endomycorhizes. En saison sèche ou en saison des pluies,

50% des cellules végétales sont envahies par le mycélium endomycorhizien (Fig. 3) malgré le faible nombre de spores viables présentes dans ces sols. Ceci montre que la colonisation des racines de *A. albida* peut être effectuée par les hyphes mycéliens.

Figure 1. Nombre de spores récoltées au pied de *Acacia albida* dans différentes zones du Sénégal. Nombre de spores par gramme de sol en saison des pluies (Nbre SPH/g); nombre de spores par gramme de sol en saison sèche (Nbre SPs/g); chaque colonne représente la valeur moyenne de 15 répétitions.

Acacia albida jeune



Acacia albida adulte

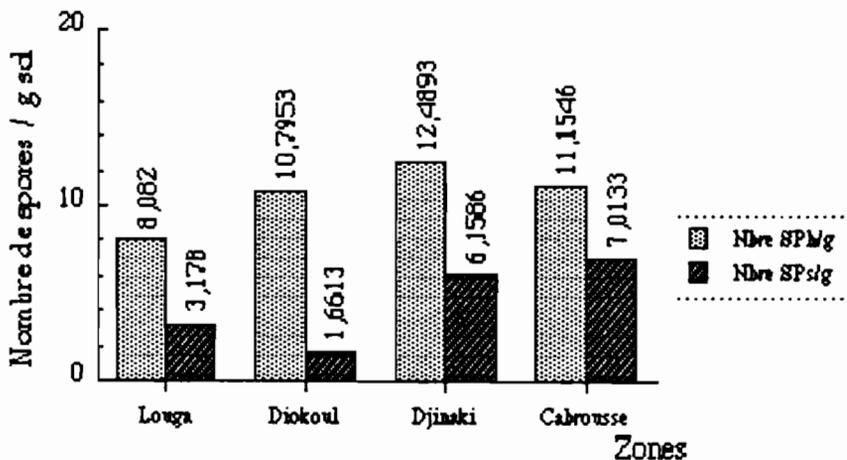
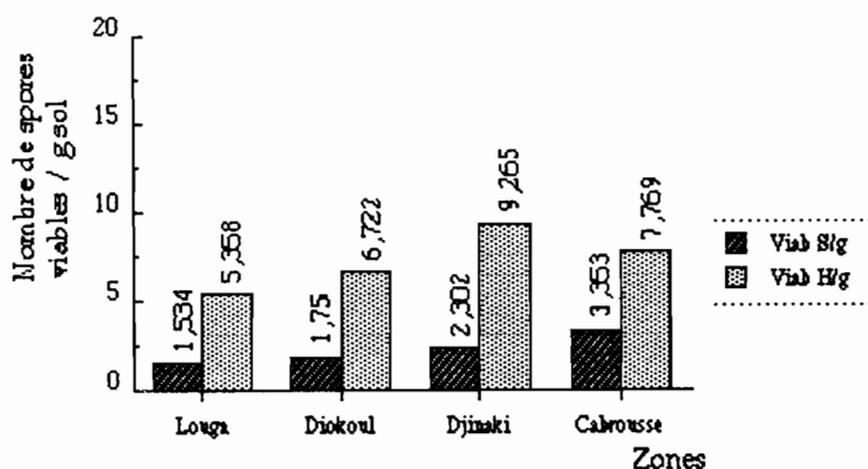


Figure 2. Viabilité des spores de la rhizosphère d'*Acacia albida* dans différentes zones du Sénégal. Nombre de spores viables par gramme de sol en saison des pluies (Viab H/g). Nombre de spores viables par gramme de sol en saison sèche (Viab S/g). Chaque colonne représente la valeur moyenne de 5 répétitions.

Acacia albida jeune



Acacia albida adulte

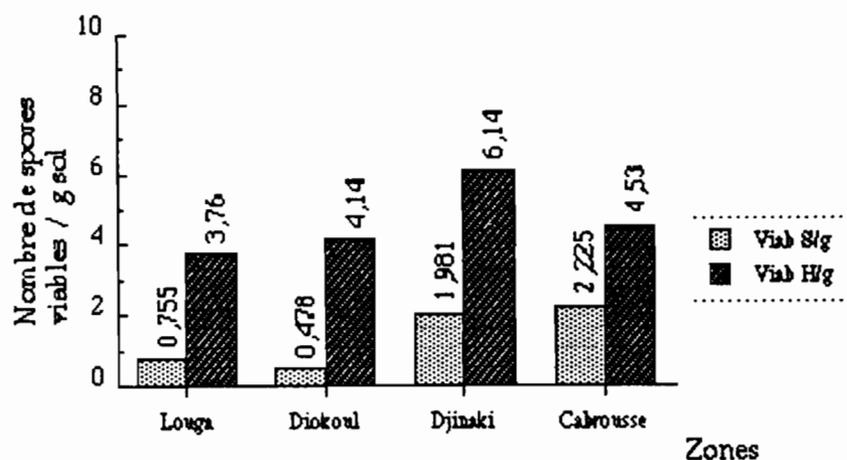


Figure 3. Pourcentage de colonisation des racines d'*Acacia albida* dans différentes zones du Sénégal. Pourcentage de colonisation des racines en saison des pluies (Inf H). Pourcentage de colonisation des racines en saison sèche (Inf S). Chaque colonne représente la valeur moyenne de 5 répétitions.

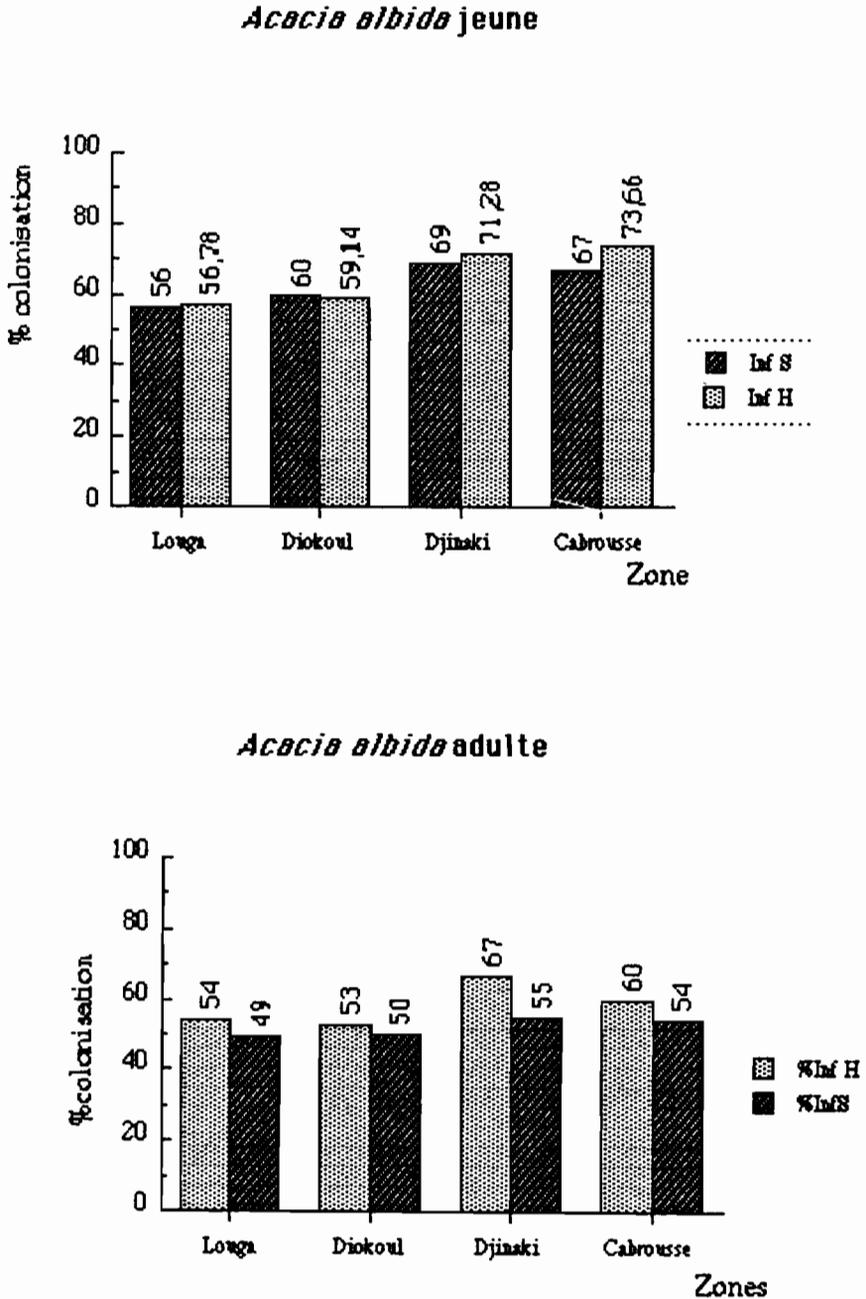
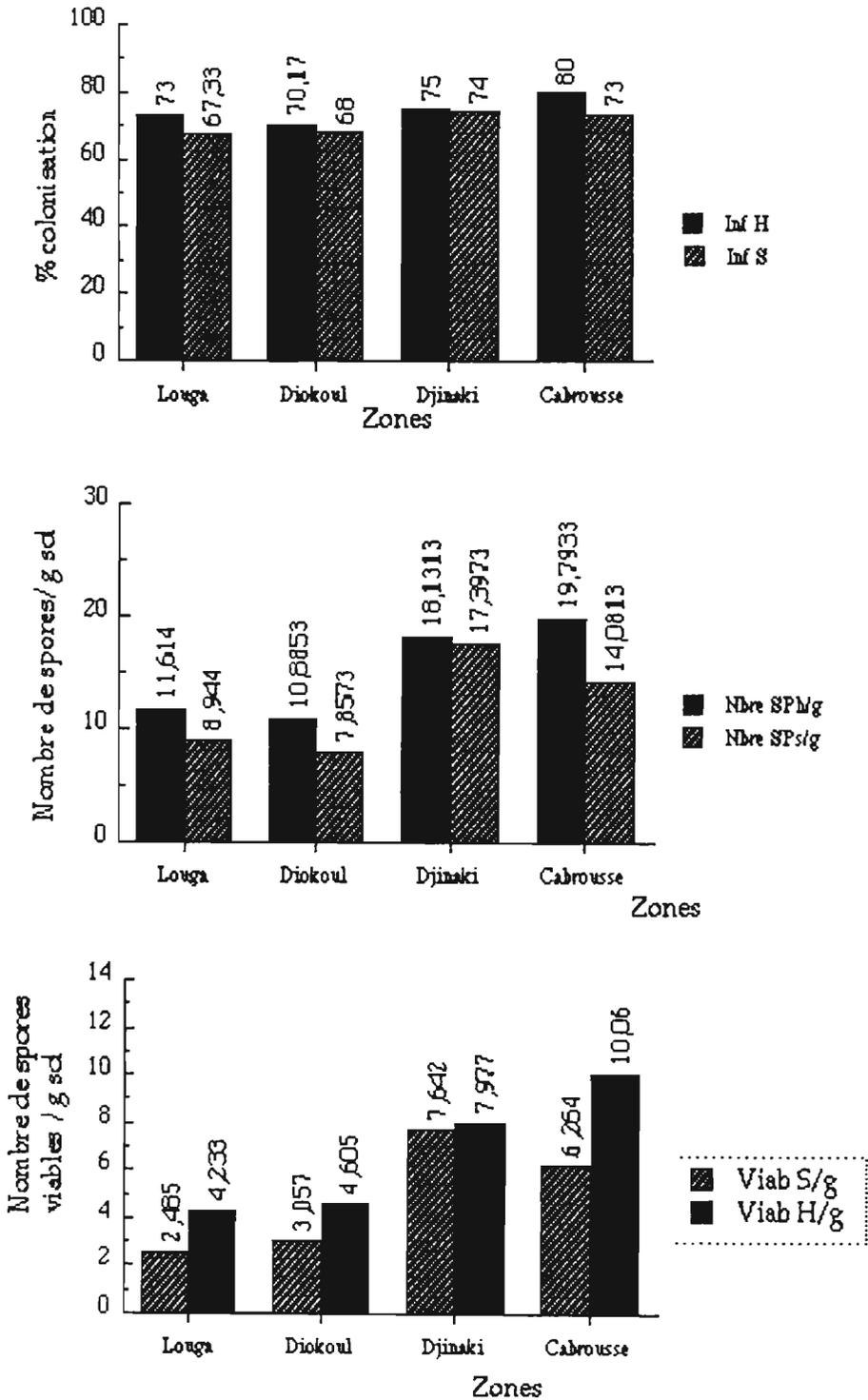


Figure 4. Pourcentage de colonisation des racines, nombre et viabilité des spores récoltées au pied des *Acacia albida*



Que se passe-t-il au niveau des drageons de *Acacia albida*?

Dans toutes les localités, le nombre total des spores aux points d'émergence des drageons est approximativement identique au nombre total des spores observé au niveau des racines de *A. albida* jeunes ou adultes. Cependant, l'augmentation relative des spores due aux pluies est moindre chez les acacias jeunes ou adultes: +30%, +38%, +4% et +40% respectivement à Louga, Diokoul, Djinaki et Cabrousse (Fig. 4). Par contre le nombre de spores viables aux points d'émergence des drageons est plus élevé qu'au niveau des racines de *A. albida* jeunes ou adultes. Toutefois, cette abondance de spores viables n'induit pas une augmentation de l'infection racinaire de ces drageons comparativement à l'infection racinaire des racines jeunes ou adultes (Fig. 4).

Sélection d'une souche de *Rhizobium*

Aucune des expériences n'a montré une différence significative entre les trois souches de *Rhizobium* dans la production de biomasse chez les *A. albida*: hauteur, diamètre au collet, poids sec des parties aériennes et des nodules (Tableau 1). La souche MAO 226 a montré cependant une tendance à mieux s'associer avec l'*A. albida* en augmentant faiblement la hauteur et le poids sec des parties aériennes des plantes. Par contre, la mesure de l'ARA par plante dans la première expérience a montré que la souche MAO 226 a eu plus d'effet que les souches MAO 222 et MAO 236: +129% et +223% respectivement (Tableau 2). A la deuxième expérience, *Glomus mossae*, tout en améliorant l'activité nitrogénasique de chaque souche de *Rhizobium*, n'a pas modifié l'ordre du criblage des souches de *Rhizobium* effectué à la première expérience: MAO 226 est la souche de *Rhizobium* qui a le plus d'effet.

Tableau 1. Indice de nodulation (Nod. I), la hauteur, le diamètre au collet, poids sec de la tige et des feuilles (PSPA), poids sec des nodules (PSN) d'*Acacia albida* inoculé avec trois souches de *Rhizobium* MAO 222, MAO 226, MAO 236 et *Glomus mossae* (Gm) et élevés dans des gaines de polyéthylène contenant du sol de Séo stérile pendant trois mois de serre

Traitement	Indice nodulation(1) (Nod. I)	Hauteur (cm/plante)	Diamètre au collet (mm/plante)	Poids sec partie aérienne	Poids sec nodule	Pourcentage d'infection	Fréquence intensité
Témoins	nn	9,5 ab	2,4 a	220,8 ab	0,0		
MAO 222	e	10,0 ab	3,2 a	287,4 ab	28,2 a		
MAO 226	E	12,0 a	2,2 a	171,8 b	22,8 a		
MAO 236	I	6,9 b	2,2 a	171,8 b	15,4 a		
<i>Glomus mossae</i>	nn	9,7 b	2,8 b	284,8 a	0,0	69	74
MAO 222 + G.m	e	20,8 a	4,2 a	714,8 a	64,2 a	62	71
MAO 226 + G.m	E	24,7 a	4,0 a	857,0 a	65,6 a	68	89
MAO 236 + G.m	E	23,3 a	3,8 a	689,6 a	68,6 a	58	87

nn: non inoculé, E: très efficace (Nod.I \geq 4), e: peu efficace (2 < Nod.I < 4), i: inefficace (Nod < 2), (1): Gueye et Bordeleau 1988. Pour chaque expérience, les valeurs suivies de la même lettre dans chaque colonne ne diffèrent pas de façon significative au seuil de 5% d'après le test de Duncan (1955).

Tableau 2. Activité réductrice de l'acétylène (ARA), Azote total et Phosphore total d'*Acacia albida* inoculé avec trois souches de *Rhizobium* MAO 222, MAO 226, MAO 236 et *Glomus mossae* (Gm) et élevés dans des gaines de polyéthylènes contenant du sol de Séo stérile pendant trois mois en serre

Traitements	A.R.A. n mole C ₂ H ₄ h ⁻¹ plante ⁻¹	A.R.A. spécifique n mole C ₂ H ₄ mg ⁻¹	Azote total mg plante ⁻¹	Phosphore total mg plante ⁻¹
Témoins	00	00	0,5 a	0,05 c
MAO 222	49,1 b	2,5 ab	0,6 a	0,07 b
MAO 226	112,6 a	6,1 a	0,7 a	0,08 a
MAO 236				
<i>Glomus mossae</i> (G.m)	00	00	0,7 b	0,07 b
MAO 222 + G.m	100,3 b	1,6 a	1,8 a	0,20 a
MAO 226 + G.m	213,0 a	3,5 a	2,0 a	0,20 a
MAO 236 + G.m	139,2 ab	3,0 a	1,5 ab	0,20 a

Pour chaque expérience, les valeurs suivies de la même lettre dans chaque colonne ne diffèrent pas de façon significative au seuil de 5% d'après le test de Duncan (1955).

CONCLUSION

Cette étude prospective nous a permis d'envisager l'inoculation de *A. albida* en pépinière avant leur transfert dans les zones de plantation. Un inoculum de *Rhizobium* (MAO 226) et un inoculum de champignon endomycorhizien (*Glomus mossae*) ont été appliqués avec succès dans les pépinières villageoises. L'inoculum a été apporté sous forme liquide dans le cas du *Rhizobium* et sous la forme de suspension de fragments racinaires dans le cas du champignon endomycorhizien. Cette méthode, utilisable uniquement par des techniciens de laboratoire pose tout le problème du conditionnement et de la distribution au niveau des paysans des inocula liquides de *Rhizobium* et/ou de mycorhize destinés aux semences forestières. Des travaux sont en cours pour déterminer le support d'inoculum le plus approprié.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- An Z.Q., Hendrix J.W., Hershman D.E. and Henson G.T. (1990). Evaluation of the "most probable number" (MPN) and wet-sieving methods for determining soil-borne populations of endogonaceous mycorrhizal fungi. *Mycologia* 82(5): 576-581.
- Asai T. (1944). Ueber die Mykorrhizen - bildung der leguminosen pflanzen. *Japanese Journal of Botany* 13: 463-485.
- Bowen G.D. and Smith S.E. (1981). The effects of mycorrhizas on nitrogen uptake by plants. In: *Terrestrial nitrogen cycles*. F.E. Clark and T. Rosswall, Eds. *Ecological Bulletin (Stockholm)* 33: 237-247.
- Diop T.A. (1990). Méthodes axéniques de production d'inocula endomycorhiziens à vésicules et arbuscules: étude avec le *Gigaspora margarita*. Mémoire Sc. Université Laval 108 pp.
- Dreyfus B.L. and Dommergues Y.R. (1981). Nodulation of *Acacia* species by fast and slow growing tropical strains of *Rhizobium*. *Applied Environmental Microbiology* 41: 67-99.
- Gibson A.H. (1980). Methods for legumes in glasshouses and controlled environment cabinets. In: *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. F.J. Bergersen, Ed. John Wiley, Chichester, England. pp. 139-184.
- Gueye M. and Bordeleau L.M. (1988). Nitrogen fixation in Bambara groundnut *Vouandzeia subterranea* (L) Thouars. *MIRCEN Journal* 4: 365-375.

- Hardy R.W.F., Holsen R.D., Jackson E.K. and Burns R.C. (1968). The acetylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43: 1185-1207.
- Hewitt E.J. (1966). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical communication No. 22. 22nd Ed. Commonwealth Agricultural Bureau, London.
- Mosse B. (1973). Advances in the study of vesicular arbuscular mycorrhiza. *Annual Review of Phytopathology* 11: 171-196.
- Muns D.N. and Mosse B. (1980). Mineral nutrition of legume crops. In: *Advances in legume science*. R.J. Summerfield and A.H. Bunting, Eds. Royal Botanical Gardens Kew. pp. 115-125.
- Olivier B., Bertheau Y., Diem H.G. et Gianinazzi-Pearson V. (1982). Influence de la variété de *Vigna unguiculata* L. Walp dans l'expression de trois associations encomycorhiziennes à vésicules et à arbuscules. *Canadian Journal of Botany* 61. 354-358.
- Read D.J., Koucheiki H.K. and Hodgson (1976). Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems. *New Phytologist* 77: 641-653.

TRANSFORMATION CHEZ LES PLANTES FIXATRICES D'AZOTE

Emile DUHOUX, Didier BOGUSZ et Claudine FRANCHE
BSFT (ORSTOM-CTFT/CIRAD)
45 Bis Avenue de la Belle Gabrielle
94736 Nogent sur Marne, France

Résumé: Les techniques classiques d'amélioration végétale par hybridation sexuée, fusion somatique et mutagenèse artificielle, conduisent à l'introduction, en mélange et de manière aveugle, d'informations génétiques dans la descendance. Or, de plus en plus, on souhaite introduire seulement un ou quelques caractères nouveaux, parfaitement identifiés, sans bouleverser l'architecture génétique globale de la plante. Les transformations génétiques assurent cette opération. Il n'y a pas actuellement de méthode de transformation universelle et généralisable à toutes les plantes et les différentes approches de transformation sont exposées: méthodes de transformation utilisant un vecteur biologique (*Agrobacterium tumefaciens* et *A. rhizogenes*); méthodes de transfert direct (électroporation, et canon à particules). Cette dernière technique, encore peu utilisée chez les plantes fixatrices d'azote, devrait connaître un développement important au cours des prochaines années. En plus des cibles recherchées chez la plupart des plantes de grande culture (résistance aux pathogènes, tolérance aux stress), les Légumineuses offrent des cibles de transformation plus spécifiques (synthèse de protéines de réserves, comme l'albumine chez les légumineuses à graines, ou la biosynthèse d'acides aminés sulfurés chez les légumineuses fourragères). Les techniques de transformation génétique constituent également une voie obligatoire pour étudier l'expression et la régulation des gènes intervenant dans la symbiose Leguminosae-Rhizobium ou Casuarinaceae-Frankia, spécialement ceux qui sont exprimés de manière temporaire ou spécifique dans certains tissus. Une meilleure compréhension des mécanismes présidant à l'interaction plante-microorganisme symbiotique devrait fournir des éléments d'informations sur les possibilités d'étendre l'aptitude à fixer l'azote atmosphérique à d'autres groupes de plantes.

Abstract: Classical techniques of plant improvement by sexual hybridization, somatic fusion and artificial mutagenesis lead to the introduction of mixed, unplanned genetic materials in the progeny. However, there is a growing demand for the introduction of one or a few more perfectly identifiable new traits without disturbing the overall genetic architecture of the plant. Genetic transformation can be used for this operation. There is as yet no universal transformation method that can be used for all plants; this report presents various approaches to transformation work i.e., methods of transformation using a biological vector (*Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes*), direct transfer methods by electroporation and by particle jets... a method that is not widely used on nitrogen-fixing plants but is expected to become increasingly important in the coming years. Besides the usual targets for major crops (disease resistance, stress tolerance), legumes may be targeted for more specific transformation (synthesis of reserve proteins, like albumin in seed legumes and biosynthesis of sulfated amino acids in the food legumes). Genetic transformation techniques are also essential in studying the expression and regulation of genes that play a role in the Leguminosae-Rhizobium or Casuarinaceae-Frankia symbiosis, especially the specific, or timebound ones in certain tissue. A better understanding of the mechanisms of interaction between symbiotic plants and microorganisms should provide information on the possibility of transferring the capacity to fix nitrogen from the atmosphere to the other plant communities.

La somme considérable des résultats accumulés ces dernières années en biologie moléculaire et en génie génétique a abouti à la naissance d'une nouvelle biotechnologie végétale, les transformations génétiques. L'intégration et l'expression d'un gène étranger dans une cellule végétale ont d'abord emprunté le système naturel de transfert d'information génétique entre les bactéries du sol *Agrobacterium tumefaciens* ou *A. rhizogenes*, et la plante. Puis des techniques de transfert direct d'ADN sont apparues, comme l'électroporation ou la biolistique par exemple.

Ces techniques ont permis une avancée majeure en amélioration végétale puisque désormais il est possible de faire intégrer un caractère agronomique nouveau, sans bouleversement génétique global de la plante. Les premiers résultats intéressants ont d'abord été obtenus avec des plantes modèles, ayant une bonne aptitude à régénérer *in vitro*, comme le tabac et la tomate (Horsch *et al.* 1985, McCormick *et al.* 1986). Puis les techniques ont été appliquées à des plantes d'intérêt agronomique.

Parmi ces dernières, les plantes fixatrices d'azote atmosphérique constituent un groupe important. Tout d'abord, l'amélioration des potentialités de fixation d'azote et le transfert de cette propriété à d'autres plantes constituent toujours un défi d'actualité. Ensuite, ces systèmes symbiotiques sont d'excellents modèles d'étude d'interaction plante-microorganisme.

Après avoir rappelé les principales techniques de transformation génétique, nous présenterons un bilan des résultats de transfert de gènes obtenus dans les systèmes symbiotiques fixateurs d'azote. Nous essaierons de montrer ensuite, comment l'utilisation d'un microorganisme, *Agrobacterium*, peut d'une part, contribuer à la connaissance de l'expression des gènes de la symbiose, d'autre part, constituer un outil d'amélioration de ces symbioses.

Les méthodes de transfert de gènes utilisées

On connaît actuellement deux types de méthodes, selon que le transfert fait appel à un vecteur biologique (*Agrobacterium*) ou peut être tenté directement (transfert direct).

Transfert par les Agrobacterium

Propriétés des Agrobacterium

Agrobacterium tumefaciens et *A. rhizogenes* sont les agents respectivement responsables de la galle du collet "crown-gall" et du "hairy-root" sur de nombreuses espèces végétales. On sait depuis 1974 que cette transformation des cellules végétales est en fait l'oeuvre de plasmides présents dans les souches virulentes d'*Agrobacterium* (Zaenen *et al.* 1974) et depuis 1977 que la transformation des cellules végétales résulte de l'intégration dans leur génome d'un fragment d'ADN (appelé T-DNA) issu de ces plasmides (Chilton *et al.* 1977). De nombreuses études approfondies ont été depuis lors menées sur l'analyse des mécanismes moléculaires du transfert des plasmides Ti, responsable des tumeurs d'*A. tumefaciens* et Ri, responsable du hairy-root d'*A. rhizogenes* (Zambryski *et al.* 1989 et Hooykaas 1989).

Utilisation d'*Agrobacterium* comme vecteur de gènes pour les plantes

Pour obtenir des plantes transformées présentant un nouveau caractère, il est nécessaire de remplacer le T-DNA et ses caractères indésirables par le(s) gène(s) à introduire dans l'espèce considérée.

On a l'habitude de distinguer deux types de vecteurs selon que les fonctions de virulence sont portées en *cis* sur le même replicon ou en *trans* sur un autre plasmide (Klee *et al.* 1987). Dans le cas des vecteurs binaires, la région *vir* est portée sur un plasmide Ti ou Ri débarrassé de son T-DNA. Le gène à transférer est encadré par les séquences de bordure d'un autre plasmide, à large spectre d'hôte, compatible avec Ri ou Ti (voir Figure 1). Dans le cas des vecteurs intermédiaires, le gène à introduire est manipulé dans *Escherichia coli* à l'aide d'un vecteur de clonage standard, puis introduit dans *Agrobacterium*; grâce à une cassette d'homologie, on force la cointégration de ce vecteur dans le plasmide Ri ou Ti désarmé entre les séquences de bordures. Dans les deux cas, le T-DNA artificiel est mobilisé par les fonctions de virulence pour être transféré dans le génome de la plante (Figure 1).

Les tumeurs obtenues à la suite d'une infection par *A. tumefaciens* sont des chimères (mélange de cellules transformées et cellules normales). Pour obtenir des plantes transformées, les oncogènes devront être remplacés par un gène conférant un caractère de résistance à un antibiotique par exemple, qui permette de sélectionner les seules cellules transformées. On devra ensuite à partir des cals sélectionnés, procéder à la régénération de la plante et éventuellement à sa micropropagation. Au contraire, les racines obtenues à la suite d'une infection par *A. rhizogenes* sont constituées par des cellules qui sont toutes transformées. Les racines hairy-root devront elles aussi régénérer des bourgeons pour que l'on puisse obtenir des plantes transgéniques. Les plantes régénérées possèdent un phénotype hairy-root indésirable dont on peut se débarrasser, par criblage des descendants obtenus par voie sexuée.

Pour être exprimée dans la plante, la séquence codante du gène étranger doit être sous la dépendance de séquences régulatrices (promoteur, signal de terminaison de type eucaryote). Les gènes de synthèse d'opines (nos: gène de la nopaline synthèse) des T-DNA possèdent de telles séquences. Ces dernières sont souvent utilisées dans la construction des gènes chimères. L'expression des gènes étrangers dans les plantes transgéniques est jusqu'à présent essentiellement sous le contrôle de promoteurs et séquences régulatrices exprimés constitutivement dans la plante. Dans le cas des recherches à caractère appliqué, on note cependant un intérêt croissant pour l'utilisation de promoteurs exprimés spécifiquement dans certains tissus ou en réponse à des stress particuliers.

L'isolement de gènes dits "reporteur" a permis ces dernières années des progrès considérables tant dans la détection visuelle au niveau cellulaire des processus de transformation, que dans l'étude des mécanismes d'expression des gènes végétaux. Le gène le plus fréquemment utilisé, *uidA*, a été isolé de la bactérie *Escherichia coli*; il détermine la synthèse de la β -glucuronidase (GUS) dont l'activité se traduit par la conversion d'un substrat incolore (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronide) en un précipité bleu indigo dans le cytoplasme des cellules transformées. Des dosages fluorométriques extrêmement sensibles de l'activité β -glucuronidase permettent également des études quantitatives fines (Jefferson 1987).

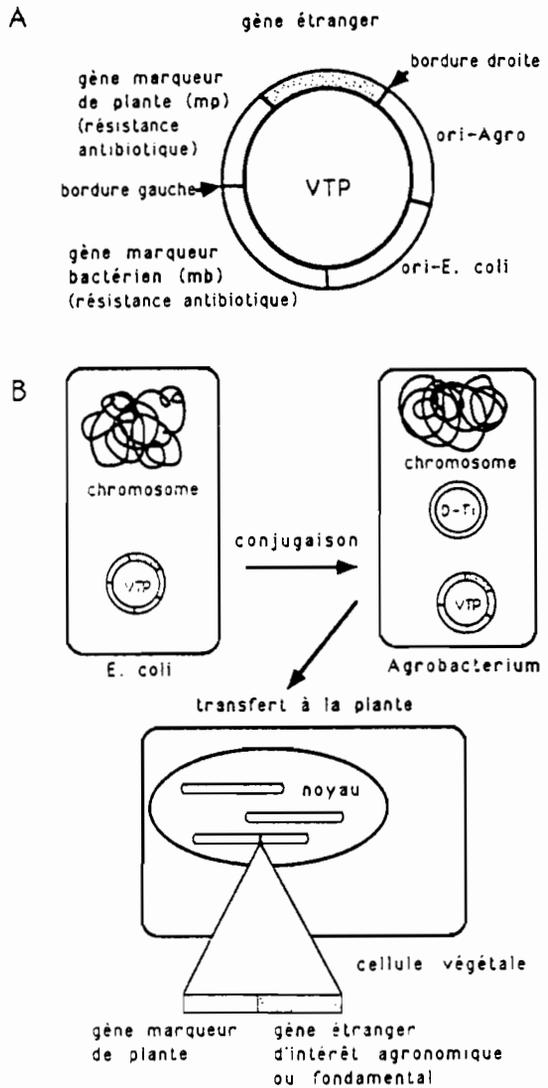
Figure 1. Transformation d'une cellule végétale par *Agrobacterium*

A: Vecteur de transformation de plante (VTP)

Le plasmide contient une origine de réplication qui permet sa multiplication chez *Agrobacterium* (Ori-Agro) et chez *E. coli* (Ori-E. coli). Deux gènes marqueurs de résistance sont présents sur le plasmide; l'un, "mb", permet une sélection des bactéries transformées par ce plasmide; l'autre, "mp", est exprimé dans les plantes et assure la sélection des cellules végétales transformées. Ce vecteur contient également des sites multiples de clonage dans lesquels sont insérés les gènes étrangers que l'on souhaite exprimer dans la plante, et les bordures droite et gauche du T-DNA; ces bordures sont reconnues par les fonctions de transfert d'*Agrobacterium* et délimitent la région transférée dans la plante.

B: Représentation schématique d'une expérience de transformation avec un vecteur binaire

Le vecteur VTP manipulé génétiquement chez *E. coli* est transféré à *Agrobacterium* par une technique de conjugaison (ou encore d'électroporation). La souche réceptrice d'*Agrobacterium* contient un plasmide Ti désarmé (D-Ti), c'est-à-dire délété des gènes oncogènes. Les fonctions de virulence présentes sur le D-Ti agissent en trans sur les bordures du "VTP" et initient la mobilisation et le transfert des gènes contenus entre les bordures. Le phénotype conféré par le gène marqueur (mp) permet la sélection des cellules végétales transformées.



Le transfert direct

La transformation directe fait appel à des techniques qui permettent, à l'aide de moyens chimiques ou physiques de transférer de l'ADN dans des cellules sans intermédiaire biologique. Parmi les techniques mises au point chez les végétaux on peut citer la transformation par le polyéthylène glycol (Davey *et al.* 1980), la fusion de protoplastes avec des liposomes (Caboche 1984) et l'électroporation (Guerche 1990).

Depuis 1987, on a vu apparaître une technique nouvelle, la biolistique, où l'introduction de matériel génétique est réalisée par l'intermédiaire de microprojectiles accélérés à grande vitesse dans un canon à particules (Klein *et al.* 1987). Cette technique se perfectionne d'année en année et on peut prévoir que d'ici peu, des espèces insensibles aux techniques précédentes, seront génétiquement transformables (Franche 1991).

Les espèces fixatrices d'azote transformées

Une compilation des travaux effectués sur les plantes fixatrices d'azote est donnée dans le Tableau 1. Ce tableau présente le nom des espèces de légumineuses et non-légumineuses et celui des gènes qui ont été transférés. Il ne dresse pas nécessairement tous les tests de sensibilité qui ont été réalisés sur diverses espèces (Tepfer 1990 et Porter 1991) qui ne font apparaître que les premiers stades de la transformation (hairy-root lors de l'inoculation avec *A. rhizogenes*).

Les résultats du Tableau 1 montrent que de nombreuses espèces sont sensibles à l'infection par les *Agrobacterium*, ce qui justifie l'importance du nombre de résultats obtenus par cette voie. On compte huit espèces différentes de plantes transgéniques avec seulement une espèce arborescente (*Allocasuarina*), et pas de luzerne diploïde.

Les gènes transférés: résultats et intérêts

Les transformations génétiques constituent d'abord un outil de connaissance et de contrôle des mécanismes physiologiques et biochimiques impliqués dans les interactions plante-microorganismes et nous présenterons un exemple avec le rôle des lectines dans la nodulation des légumineuses. Ensuite, les transformations génétiques constituent une technique d'étude des mécanismes d'expression de ces gènes dans le génome de la plante-hôte et de leur régulation au cours du développement de la plante.

La première moisson de résultats obtenus chez les plantes fixatrices d'azote concerne les phénomènes de régulation qui existent à la fois entre les séquences qui constituent les différentes régions du gène (cis-acting factors) et entre l'ensemble de ces séquences et les protéines non encore identifiées, agissant en *trans* sur l'ADN (trans-acting factors). Enfin, les premiers résultats de ces connaissances fondamentales commencent à être mis à profit dans des programmes d'application agronomique et nous l'évoquerons.

Tableau 1. Transformations génétiques chez les plantes fixatrices d'azote

On a indiqué dans le tableau les espèces chez lesquelles on a régénéré des plantes transgéniques (+), ou obtenu seulement les premières réponses à l'infection par les *Agrobacterium*. Les références font état des principaux travaux sur une espèce donnée; voir dans le texte (*) par exemple d'autres cas de gènes introduits.

Espèces	Technique	Gène	Plante transgénique	Références
Leguminosae				
<i>Abrus precatorius</i>	<i>A. rhizogenes</i>			Tepfer <i>et al.</i> (1989)
<i>Arachis hypogaea</i>	<i>A. rhizogenes</i>			Mugnier (1988)
<i>Acacia drummondii</i>	<i>A. rhizogenes</i>			Porter (1991)
<i>Cassia torosa</i>	<i>A. rhizogenes</i>			in Tepfer (1990)
<i>Cassia obtusifolia</i>	<i>A. rhizogenes</i>			
<i>Cassia occidentalis</i>	<i>A. rhizogenes</i>			
<i>Glycine canescens</i>	<i>A. rhizogenes</i>		+	Rech <i>et al.</i> (1988)
<i>Glycine clandestina</i>	<i>A. rhizogenes</i>			Rech <i>et al.</i> (1988)
<i>Glycine max</i>	<i>A. rhizogenes</i>			in Tepfer (1990)
	<i>A. tumefaciens</i>			Pedersen <i>et al.</i> (1983)
	<i>A. tumefaciens</i>	Rubisco-nptII		Facciotti <i>et al.</i> (1985)
	<i>A. tumefaciens</i>	Gus,nptII,EPSP	+	Hinchee <i>et al.</i> (1988)
	microprojectiles	Gus,nptII	+	McCabe <i>et al.</i> (1988)
<i>Lotus corniculatus</i> (*)	<i>A. tumefaciens</i>		+	Petit <i>et al.</i> (1987)
	<i>A. rhizogenes</i>	Legh-cat (soja)	+	Jensen <i>et al.</i> (1986)
	<i>A. rhizogenes</i>	GS (soja)	+	Miao <i>et al.</i> (1991)
<i>Lupinus albus</i>	<i>A. rhizogenes</i>			Mugnier 1988
<i>Lupinus polyphyllus</i>	<i>A. rhizogenes</i>			Mugnier 1988
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	<i>A. rhizogenes</i>			Beach <i>et al.</i> (1988)
<i>Medicago arborea</i> (1991)	<i>A. rhizogenes</i>	HPT	+	Damiani and Arcioni
<i>Medicago sativa</i>	<i>A. rhizogenes</i>		+	Sukhapinda <i>et al.</i> (1987)
	<i>A. rhizogenes</i>		+	Spano <i>et al.</i> (1987)
	<i>A. tumefaciens</i>	nos-nptII	+	Shahin <i>et al.</i> (1986)
	<i>A. tumefaciens</i>	pea-albumin	+	Ford (1988)
<i>Onobrychis vicifolia</i>	<i>A. tumefaciens</i>			Webb (1986)
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	<i>A. rhizogenes</i>		+	in Tepfer (1990)
<i>Sesbania rostrata</i>	<i>A. tumefaciens</i>			Vlachova <i>et al.</i> (1987)
	<i>A. rhizogenes</i>			" " "
<i>Stylosanthes</i> spp.	<i>A. tumefaciens</i>			Manners (1987)
<i>Trifolium repens</i> (*) (1987)	<i>A. tumefaciens</i>	nos-nptII	Tiges	White and Greenwood
<i>Trifolium pratense</i>	<i>A. rhizogenes</i>			Beach <i>et al.</i> (1988)
<i>Vicia faba</i>	<i>A. rhizogenes</i>			Ramsay and Kumar (1990)
<i>Vigna aconitifolia</i>	<i>A. rhizogenes</i>		+	in Tepfer (1990)
<i>Vigna aconitifolia</i>	Protoplast-PEG	nptII	+	Köhler <i>et al.</i> (1987)
Plantes actinorhiziennes				
<i>Alnus glutinosa</i>	<i>A. tumefaciens</i>			Mackay <i>et al.</i> (1988)
<i>Alnus incana</i>	<i>A. tumefaciens</i>			
<i>Betula papyrifera</i>	<i>A. tumefaciens</i>			
<i>Allocauarina verticillata</i>	<i>A. rhizogenes</i>		+	Phelep <i>et al.</i> (1991)

Modification du spectre d'hôte

L'induction de nodules fixateurs d'azote chez une légumineuse est un phénomène contrôlé par une régulation hôte-spécifique de l'expression des gènes de nodulation de la bactérie. Une espèce donnée de *Rhizobium* ne nodule que les espèces qui appartiennent à un même groupe de plantes (groupe d'inoculation croisée). Par exemple, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* nodule les plantes du groupe d'inoculation croisée du pois, de la vesce et de la lentille, alors que le trèfle est nodulé par *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Cette spécificité est exprimée à un stade précoce du processus d'infection et résulte d'interactions multiples entre les signaux émis par la plante et ceux de la bactérie. Parmi les substances précoces impliquées dans les déterminants de la spécificité d'hôte, les lectines ont été souvent évoquées (Kijne 1975, Priem and Wijffelman 1985). L'hypothèse repose sur le fait que les légumineuses qui appartiennent à des groupes d'inoculation différents produisent des lectines qui possèdent des sites de reconnaissance glucidique spécifiques (Kijne 1975). L'introduction d'un gène de lectine de pois, dans des racines de *Trifolium repens* transformé par *A. rhizogenes* (Diaz *et al.* 1989) a permis de vérifier cette hypothèse. En effet les racines de trèfle de type "hairy root" ont pu être nodulées par la souche de *Rhizobium leguminosarum* d'un autre groupe d'inoculation croisée.

La nodulation est cependant retardée et beaucoup de nodules sont anormaux. La spécificité d'hôte, en partie contrôlée par les interactions lectines des poils absorbants-*Rhizobium* a donc pu être modifiée. On peut cependant noter que les déterminants majeurs de la spécificité d'hôte sont situés chez la bactérie. Chez *Rhizobium meliloti* par exemple, les gènes *nod H* et *nod PQ* sont responsables de la spécificité d'hôte (Cervantes *et al.* 1989, Faucher *et al.* 1989).

Etude de la régulation des gènes impliqués dans les interactions plante-microorganisme

Dans la symbiose légumineuse-*Rhizobium*, un échange de signaux moléculaires assure la régulation des gènes essentiels pour l'installation de la symbiose et de son fonctionnement. On connaît, selon les espèces de 9 à 30 nodulines (Egli *et al.* 1991), protéines spécifiques qui s'accumulent dans les nodules. Selon le moment de leur induction dans le nodule on les classe en nodulines précoces et tardives. La noduline tardive la plus abondante et la mieux connue est la leghémoglobine. Elle représente 20 à 30% des protéines cytoplasmiques solubles et son rôle est celui d'un transporteur d'O₂, approvisionnant le bactéroïde dans un environnement où la maintenance d'une faible pression en O₂ est nécessaire pour éviter l'inactivation nitrogénase.

Recherche du rôle des différentes régions du promoteur d'un gène de leghémoglobine

Nous prendrons comme exemple l'étude du promoteur du gène *glb3* de la leghémoglobine de la légumineuse tropicale à nodule caulinare *Sesbania rostrata*. Une fusion transcriptionnelle a été réalisée entre un gène reporteur (gène *uid A* d'*E. coli*) et le promoteur du gène *glb3* (Szabados *et al.* 1990). Ce gène rapporteur code pour la β -glucuronidase qui est une enzyme très stable et facilement dosable (Jefferson 1987). L'absence d'un système de

transformation/régénération pour *S. rostrata* a conduit à étudier la régulation de l'expression du promoteur du gène *glb3* dans la légumineuse *Lotus corniculatus* (lotier) (Szabados *et al.* 1990). Les constructions géniques ont été introduites dans le lotier en utilisant *Agrobacterium rhizogenes*, les plantes régénérées à partir des racines transformées (hairy roots) ont été ensuite nodulées par *Rhizobium loti*. Une analyse fonctionnelle par délétions du promoteur de *glb3* a ainsi été réalisée. En résumé, il apparaît que la région du promoteur située entre les nucléotides -429 et -48 est indispensable à la spécificité d'expression dans les nodules; la région plus en amont localisée entre -1601 et -670 contient des éléments qui interviennent dans l'activation de la transcription.

Transfert d'un gène de leghémoglobine chez un hôte hétérologue

Pour étudier la régulation de l'expression des gènes de plante il est important de connaître le comportement des séquences régulatrices d'un gène d'une espèce donnée après leur introduction dans des plantes d'espèces ou même de familles différentes.

Chez les légumineuses les promoteurs des gènes *lbc3* de la leghémoglobine de soja et *glb3* de la leghémoglobine de *S. rostrata* (voir ci-dessus) ont été introduits d'une part, dans la légumineuse *Lotus corniculatus* et d'autre part, dans la Solanacée, *Nicotiana tabacum* (Stougaard *et al.* 1987). Ces études ont montré que le mécanisme qui gouverne la transcription de manière spécifique dans les nodules est conservé chez les légumineuses. Il apparaît également que les promoteurs des gènes d'hémoglobines des légumineuses sont faiblement fonctionnels dans les racines de tabac (Szabados *et al.* 1990). Chez les non légumineuses les promoteurs des gènes d'hémoglobines de *Parasponia* et de *Trema* ont été introduits dans le lotier et le tabac (Bogusz *et al.* 1990). Il apparaît que la régulation de l'expression de ce promoteur de non légumineuse est conservée chez le lotier et le tabac.

Ces différentes expérimentations permettent, en fonction du niveau et de la spécificité d'expression du gène, d'apprécier le degré de conservation des signaux de régulation chez les plantes hétérologues et d'aborder progressivement chez les végétaux, l'étude de la régulation par les facteurs agissant en *trans* (trans-acting factors).

Origine de la nodulation chez les plantes fixatrices d'azote: considérations évolutives

L'analyse du niveau et de la localisation de l'expression d'un gène d'hémoglobine (Hb) fusionné au gène reporter GUS a permis à Bogusz *et al.*, (1990) de proposer une hypothèse sur l'origine de la nodulation chez les plantes supérieures. L'hémoglobine est présente dans les nodules fixateurs d'azote des légumineuses et des non-légumineuses. La non-légumineuse *Parasponia andersonni* possède un seul gène d'Hb (Landsmann *et al.* 1986) qui est fortement exprimé dans les nodules induits par le *Rhizobium* spécifique, et également à un faible niveau dans les racines de la plante non nodulée (Bogusz *et al.* 1988). Une espèce voisine sur le plan taxonomique, *Trema tomentosa*, mais non fixatrice d'azote, contient également un gène d'Hb qui est exprimé uniquement dans les racines (Bogusz *et al.* 1988).

Après avoir introduit les promoteurs du gène d'Hb de ces deux non-légumineuses chez un tabac et chez *Lotus corniculatus*, Bogusz *et al.*, (1990) ont montré qu'ils étaient fonctionnels chez les deux plantes. Lorsque les plantes transgéniques de lotier sont nodulées, les deux promoteurs assurent une expression élevée dans les nodules, expression localisée dans la région où se situe la leghémoglobine endogène. Enfin, le promoteur du *Trema* assure une expression réduite dans le tissu vasculaire des racines du lotier. Ces faits suggèrent à Bogusz *et al.*, (1990) qu'un système de régulation de l'expression racine-spécifique de l'Hb devait préexister chez les végétaux et qu'il a pu ensuite évoluer, sous une pression de sélection, en expression nodule-spécifique chez les plantes qui tiraient un avantage de la symbiose. Chez les plantes symbiotiques, cette évolution aurait conduit à une différenciation plus grande (plusieurs gènes d'Hb) et une spécialisation plus grande (contrôle d'une expression spatiale et temporelle). Au cours de l'acquisition de l'aptitude à noduler, le gène d'Hb chez les légumineuses se serait multiplié, et les copies se seraient spécialisées dans l'expression nodule-spécifique, sans maintenir la fonction initiale d'expression racine-spécifique.

Applications agronomiques

Résistance aux insectes

La principale application du transfert de gènes chez les végétaux concerne la résistance aux insectes. Cette application s'est développée d'une part, pour réduire les énormes pertes de production causées par les ravageurs et d'autre part, pour diminuer les coûts occasionnés par les traitements préventifs. La stratégie de lutte la plus utilisée repose sur l'insertion du gène *bt* d'une souche de *Bacillus thuringiensis* codant pour une δ -endotoxine dans la plante transgénique (Vaeck *et al.* 1987). Jusqu'à présent les travaux réalisés dans ce domaine portent essentiellement sur le tabac, la pomme de terre, la tomate, le peuplier...

La principale limite de cette stratégie est de contourner la haute spécificité de la protéine *bt* qui peut favoriser l'apparition de phénomènes de résistance chez les prédateurs. Il existe dans la nature, des processus de défense des plantes contre les ravageurs qui font appel à des mécanismes plus généraux que ceux du *Bacillus thuringiensis*. Ainsi en est-il des légumineuses qui disposent d'un mécanisme de défense naturelle en réponse à des blessures ou à des attaques par des insectes. A la suite de cette agression, ces plantes, comme certaines Solanacées, synthétisent des inhibiteurs de protéases. Ces protéines bloquent le site actif des protéases du tube digestif, perturbant ainsi la digestion des aliments et pouvant même entraîner la mort des insectes herbivores. On a pu identifier une corrélation entre la teneur des protéases de *Vigna* et leur résistance à leur pathogène principal, *Callosobruchus maculatus* (Comai *et al.* 1985). De plus, ces inhibiteurs purifiés possèdent des activités insecticides contre d'autres prédateurs importants comme *Heliothis*, *Spodoptera*, *Diabrotica* et *Tribolium* (Gatehouse and Boulter 1983).

Des gènes (CpTI) de *Vigna unguiculata* codant pour des inhibiteurs de protéases ont été clonés. Les CpTI codent en fait, pour des petits polypeptides d'environ 80 acides aminés, inhibant naturellement la trypsine (enzyme digestive) des insectes. Comme la cible d'activité est constituée par le site catalytique de l'enzyme des insectes, enzyme qui leur est vraisemblablement indispensable, la possibilité pour les insectes de développer un mécanisme

de résistance, par mutation de ce site, est extrêmement faible (Hilder *et al.* 1987). Les gènes CpTI ont été introduits dans des plasmides Ti (Hilder *et al.* 1987) et la transformation réalisée chez les tabacs a permis de rendre les plantes transgéniques beaucoup plus résistantes à *Heliothis virescens* (Agricultural Genetics Company 1988). La transformation de légumineuses ou d'autres plantes, codant pour les CpTI semble donc tout à fait envisageable. Il faut cependant noter que les plantes obtenues sont tolérantes plutôt que résistantes, 50% au plus des insectes sont tués après ingestion des feuilles. La stratégie consistera donc à faire tomber la pression de sélection du ravageur en dessous de la valeur d'un certain seuil, pour que ce prédateur ne soit plus un problème agronomique. Compte-tenu des imperfections de chacune des stratégies, on peut faire remarquer que l'obtention de plantes hors d'atteinte de tout insecte nuisible sera probablement le résultat d'une stratégie combinant transformation avec des gènes codant pour des CpTI et/ou bt.

Contrôle des mauvaises herbes

Une seconde application des transformations génétiques est le transfert de gènes de résistance aux herbicides. Le but de ces recherches est non pas une utilisation accrue de ces substances, dont l'impact sur l'environnement serait néfaste, mais l'introduction dans les plantes de gènes de résistance à des herbicides choisis; ces derniers doivent répondre à des critères précis: être actifs à de faibles concentrations, dégradés rapidement, peu toxiques pour l'environnement et posséder un large spectre d'hôte. L'obtention de plantes résistantes à de tels herbicides permettra la réduction des substances conventionnelles et leur substitution progressive par des produits écologiquement plus adaptés.

Deux stratégies sont utilisées pour conférer la résistance aux herbicides chez les végétaux: soit l'altération de l'enzyme cible de l'herbicide, soit l'incorporation dans la plante d'une enzyme de détoxification. Une illustration de la première approche est fournie par le soja transgénique (*Glycine max*) résistant au glyphosate. Le glyphosate inhibe la 5-enolpyruvate shikimate 3-phosphate synthase (EPSP), une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques: la résistance est obtenue par expression dans la plante d'un gène EPSP de *Petunia*, présentant une mutation qui confère la tolérance à l'herbicide (Hinchee *et al.* 1988). La seconde stratégie, qui n'a pas encore été utilisée à notre connaissance avec une plante fixatrice d'azote, consiste à isoler à partir de bactéries des gènes codant pour des enzymes qui détoxifient ou dégradent les herbicides (Gasser et Fraley 1989).

Résistance aux virus

En raison des difficultés à caractériser et à isoler les gènes de plante qui confèrent de façon naturelle la résistance à certains virus, le génie génétique a mis au point plusieurs stratégies pour protéger les végétaux des infections virales. La technique la plus largement utilisée consiste à introduire dans le génome de la plante le gène de la protéine de capsid du virus. Cette stratégie "protéine de capsid" mise au point en 1986 avec le tabac et le virus de la mosaïque du tabac (ou VMT) (Powell Abel *et al.* 1986) a été utilisée avec succès avec 18 virus appartenant à 10 groupes différents. Des études sont en cours pour protéger le soja du virus de la mosaïque du soja (SMV) en utilisant cette approche. On ne connaît pas encore

les mécanismes moléculaires de cette protection qui peut aboutir soit à un délai dans l'apparition des symptômes, soit à une atténuation des symptômes, soit parfois à une immunité totale des plantes à l'infection virale.

D'autres approches ont également été utilisées avec succès (Clark *et al.* 1990). L'introduction dans les plantes d'ARN antisens de la protéine de capsid ou de la réplicase des virus confère une protection partielle contre l'infection virale. Il est probable que l'ARN antisens et l'ARN viral interagissent pour former une molécule double brin qui est, soit dégradée rapidement, soit, incapable d'être traduite. Dans le cas des virus possédant un ARN satellite, l'introduction dans les plantes d'une séquence d'ADN correspondant à l'ARN satellite permet également une atténuation des symptômes vis-à-vis du virus. De telles stratégies n'ont pas encore été employées avec des plantes fixatrices d'azote.

Amélioration des qualités nutritionnelles des plantes

Les légumineuses sont connues pour jouer un rôle majeur, immédiatement après les céréales, dans l'alimentation humaine et animale. Sur le plan nutritionnel, elles sont deux à trois fois plus riches en protéines que les céréales. Cependant elles ne possèdent pas toujours une proportion équilibrée entre les différents acides aminés et la plupart sont carencées en acides soufrés (Mantell *et al.* 1987). Des tentatives d'amélioration, par voie classique, des principales espèces cultivées n'ont pas conduit à des progrès spectaculaires des qualités nutritionnelles des cultivars obtenus. Est-ce que les transformations génétiques peuvent apporter des solutions à ces problèmes? Les gènes codant pour de nombreuses protéines de réserve ont déjà été clonés et caractérisés (Mantell *et al.* 1987). Des travaux sont maintenant nécessaires pour comprendre les mécanismes de leur expression aussi bien chez les légumineuses que pour les plantes d'autres familles. Un projet concernant l'amélioration des qualités nutritionnelles d'une légumineuse fourragère est en cours de développement en Australie.

Des chercheurs australiens du CSIRO ont utilisé les techniques du génie génétique pour introduire au champ une luzerne enrichie en protéine soufrée permettant aux moutons qui la consomment de produire davantage de laine (Ford 1988). En effet, le facteur limitant de la production de laine de mouton est le faible apport de protéine soufrée dans leur alimentation. Un gène codant pour la synthèse d'acides aminés riches en soufre a été transféré d'abord chez une plante modèle qui régénère facilement en culture *in vitro* (tabacs transgéniques). Ils souhaitent ensuite introduire ce gène chez le trèfle subterranéen qui constitue la nourriture de base spontanée des moutons en Australie. Ce type d'application génétique prévoit la possibilité d'augmenter de 6 % la production de laine et d'en retirer un bénéfice de plus de 300 millions de dollars australiens par an.

CONCLUSIONS

Voilà moins de 10 ans que les premières plantes transgéniques exprimant un gène étranger (résistance à un antibiotique) sont apparues. Depuis lors, les tentatives de transformation se sont développées et les techniques se sont diversifiées. Chez les plantes fixatrices d'azote on

ne compte seulement en 1991 que huit espèces transgéniques. La faible susceptibilité de certains genres (*Acacia*) ou d'espèces de *Medicago* diploïdes montrent que les techniques de transformation/régénération doivent être poursuivies et optimisées (utilisation de souches d'*Agrobacterium* plus virulentes, de la biolistique et amélioration de la caulogénèse et de l'embryogénèse somatique).

Ces résultats encore peu nombreux, ajoutés à l'énorme masse de connaissance acquise en biologie moléculaire sur les interactions légumineuse-Rhizobium expliquent pourquoi les études de transfert des gènes ont été réalisées principalement dans le sens légumineuse vers non-légumineuse (tabac, très souvent). Les résultats obtenus ont permis d'effectuer de réels progrès dans l'analyse de l'expression des gènes de ces plantes. Cependant, l'obtention d'un plus grand nombre de plantes fixatrices d'azote transgéniques devrait permettre une analyse plus complète de l'expression des gènes de ces plantes et une étude des conséquences qui en résultent par exemple, sur l'activité de l'assimilation de l'azote du sol et des paramètres de croissance de la plante.

REFERENCES

- Agricultural Genetics Company Ltd. (1988). Brevet Européen, Cambridge. pp. 2-27.
- Beach K.H. and Gresshoff P.M. (1988). *Plant Sci.* 57: 73-81.
- Bogusz D., Appleby C.A., Landsmann J., Dennis E.S., Trinick M.J., and Peacock W.J. (1988). *Nature* 331: 178-180.
- Bogusz D., Llewellyn D.J., Craig S., Dennis E.S., Appleby C.A. and Peacock W.J. (1990). *The Plant Cell* 2: 633-41.
- Caboche M. et Deshayes A. (1984). C.R. Acad. Sc. Paris III, 299. pp. 663-666.
- Casse-Delbart F. (1990). In: *les Colloques de l'INRA*. No. 51: 219-230.
- Cervantes E., Sharma S., Maillet F., Vasse J., Truchet G. and Rosenberg C. (1989). *Mol. Microbiol* 3: 745-755.
- Chilton M.D., Drummond M.H., Merlo D.J., Sciaky D., Montoya A.L., Gordon M.P. and Nester E.W. (1977). *Cell* 11: 263-71.
- Clark W.G., Register III, J.C. and Beachy R.N. (1990). *Plant Biology* Vol. II. A.J. Wiley and Sons Inc. Publication. pp. 273-283.
- Comai L., Facciotti D., Hiatt W.R., Thompson G., Rose R.E., Stalker D.M. (1985). *Nature* 317: 741-744.
- Damiani F. and Arcioni S. (1991). *Plant Cell Rep.* 10: 300-303.
- Davey M.R., Cocking E.C., Freeman J., Pearce N. and Tudor I. (1980). *Plant Sci. Lett.* 18: 307-313.
- Diaz C.L., Melchers L.S., Hooykaas P.J., Lugtenberg B.J. and Kijne J.W. (1989). *Nature* 338: 579-581.
- Egli M.A., Larson P.J., Hruschka W.R. and Vance C.P. (1991). *J. Exp. Bot.* 42: 969-977.
- Facciotti D., O'Neal J.K., Lee S., Shewmaker C.K. (1985). *Bio/technology* 3: 241-246.
- Faucher C., Camut S., Dénarié J. and Truchet G. (1989). *Mol. Plant Microbe Interact.* 2: 291-300.
- Ford J. (1988). *New Scientist*. 10 March, 24.
- Franche C. (1991). *La Recherche* 22: 238-240.
- Gasser C.S. and Fraley R.T. (1989). *Science* 244: 1293-1299.
- Gatehouse A.M.R.G. and Boulter D. (1983). *J. Sci. Fd. Agric.* 34: 345-350.
- Guerche P. (1990). In *Les Colloques de l'INRA*. No. 51: 211-214.
- Hilder V.A., Gatehouse A.M.R., Sheerman S.E., Barker R.F. and Boulter D. (1987). *Nature* 300: 160-163.
- Hinchee M.A.W., Connor-Ward D.V., Newell C.A., McDonnell R.E., Sato S.J., Gasser C.S., Fischeff D.A., Re B.D., Fraley R.T. and Horsch R.B. (1988). *Biotechnology* 6: 915-922.

- Hooykaas P.J.J. (1989). *Plant Mol. Biol.* 13: 327-336.
- Horsch R.B., Fry J.E. Hoffman N.L., Eichholz D., Rogers S.G. and Fraley R.T. (1985). *Science* 227: 1229-1231.
- Jefferson R.A. (1987). *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405.
- Jensen J.S., Marcker K.A., Otten L. and Schell J. (1986). *Nature* 321: 669-674.
- Kijne J.W. (1975). *Physiol. Pl. Path.* 5: 75-79.
- Klee H., Horsch R., and Roger S. (1987). *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38: 467-486.
- Klein T.M., Wolf E.D., Wu R., Sanford J.C. (1987). *Nature* 327: 70-73.
- Köhler F., Golz C., Eapen S., Kohn H. and Schieder O. (1987). *Plant Cell Rep.* 6: 313-317.
- Landsmann J., Dennis E.S., Higgins T.J.V., Appleby C.A., Kortt A.A. and Peacock W.J. (1986). *Nature* 324: 166-168.
- Mackay J., Seguin A. and Lalonde M. (1988). *Plant Cell Rep.* 7: 220-232.
- Manners J.M. (1987). *Plant Cell. Rep.* 6: 204-207.
- Mantell S.H., Matthews J.A. and McKee R.A. (1987). *Principles of Plant Biotechnology*, Blackwell Scientific Publication. 269 pp.
- McCabe D.E., Swain W.F., Martinell B.J. and Christou P. (1988). *Biotechnology* 6: 923-926.
- McCormick S., Niedermeyer J., Fry J., Barnasson A., Horsch R. and Fraley R.T. (1986). *Plant Cell Rep.* 5: 81-84.
- Miao G.H., Hirel B., Marsolier M.C., Ridge R.W. and Verma D.P.S. (1991). *The Plant Cell* 3: 11-22.
- Mugnier J. (1988). *Plant Cell Rep.* 7: 9-12.
- Pedersen H.C., Christiansen J., Wyndaele R. (1983). *Plant Cell Rep.* 2: 201-204.
- Petit A., Stougaard J., Kuhle A., Marker K., and Tempé J. (1987). *Mol. Gen. Genet.* 207: 245-250.
- Phelep M., Petit A., Martin L., Duhoux E. and Tempé J. (1991). *Bio/technol.* 9: 461-466.
- Porter J.R. (1991). *Critical Reviews in Plant Science* 10: 387-421.
- Powell Abel P., Nelson R.S., De B., Hoffman N., Rogers S.G., Fraley R.T. and Beachy R.N. (1986). *Science* 232: 738-743.
- Priem W.J.E. and Wijffelman C.A. (1985). *FEBS lett.* 25: 247-251.
- Ramsey G. and Kumar A. (1990). *J. Exp. Bot.* 41: 841-847.
- Rech E.L., Golds T.J., Hammatt N., Mulligan B.J. and Davey M.R. (1988). *J. Exp. Bot.* 39: 1275.
- Shahin E.A., Sukhapinda K., Simpson R. and Spivey R. (1986). *Theor. Appl. Genet.* 72: 720-777.
- Spano L., Mariotti D., Pezzoti M., Damiani F. and Arcioni S. (1987). *Theor. Appl. Genet.* 73: 523-530.
- Stougaard J., Petersen T.E., Marcker K.A. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5754-5757.
- Sukhapinda K., Spivey R., Shahin E.A. (1987). *Plant Mol. Biol.* 8: 209-216.
- Szabados L., Ratet P., Grunenber B. and de Bruijn F.J. (1990). *The Plant Cell* 2: 973-986.
- Tepfer D. (1990). *Physiol. Plant.* 79: 140-146.
- Tepfer D., Metzger L. and Prost R. (1989). *Plant Mol. Biol.* 13: 295-302.
- Vaeck M., Reynaerts A., Höfte H., Jansens S., De Beuckeleer M., Dean C., Zabeau M., Van Montagu M., Leemans J. (1987). *Nature* 328: 12-13.
- Vlachova M., Metz B.A., Schell J., de Bruijn F.J. (1987). *Plant Science* 50: 213-223.
- Webb K.J. (1986). *Theor. Appl. Genet.* 72: 53-58.
- White D.W.R. and Greenwood D. (1987). *Plant Mol. Biol.* 8: 461-469.
- Zaenen I., Van Lanbeke N., Tenchy H., Van Montagu M. and Schell J. (1974). *J. Mol. Biol.* 86: 109-127.
- Zambryski P., Tempé J. and Schelle J. (1989). *Cell* 56:193-201.

TRANSFER OF DISEASE RESISTANCE GENES INTO CROP PLANTS: THE ROLE OF BIOTECHNOLOGY

A. KUMAR, S. COOPER-BLAND and W. POWELL

Cell and Molecular Genetics Department

Scottish Crop Research Institute

Invergowrie, Dundee DD2 5DA Scotland

Abstract: *Conventional breeding techniques based on the selection of plants with desirable traits after exchange of genes by sexual hybridization has been enormously successful in incorporating several disease resistance genes into crop plants. This has been achieved at the intra- and interspecific levels and in a few cases even at the intergeneric level. However, this technique is severely hampered by the inherent sexual incompatibility existing between plant species which limits the genepool size available for sexual hybridization. In recent years, such sexual incompatibility barriers have been overcome with the use of modern cell and tissue culture and molecular biological techniques, including embryo rescue, somatic hybridization and genetic transformation. The successful application of biotechnology in transferring disease resistance genes into crop plants from sexually compatible and incompatible plant species and even from organisms as divergent as fungi, bacteria and viruses is described. Molecular marker techniques such as randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) have allowed us to accurately locate disease resistance genes to a specific chromosome of plants. Furthermore, the transposon tagging technique provides the prospect for isolating these disease resistance genes. Finally, the results from our own research on potato at the Scottish Crop Research Institute (SCRI) are presented and demonstrate the use of biotechnological techniques in introducing disease resistance genes in crop plants.*

Résumé: *Les techniques d'amélioration conventionnelles fondées sur la sélection de plantes dotées de caractéristiques souhaitables après échange de gènes par hybridation sexuelle ont permis d'incorporer avec succès plusieurs gènes de résistance aux maladies dans les plantes cultivées. Ce résultat a été obtenu aux niveaux intra- et interspécifiques, voire, dans quelques cas, au niveau intergénérique. Cependant cette technique est fortement entravée par l'incompatibilité sexuelle intrinsèque entre espèces végétales qui limite les ressources génétiques disponibles pour l'hybridation sexuelle. Au cours de ces dernières années, de tels obstacles d'incompatibilité sexuelle ont pu être surmontés grâce à l'utilisation de techniques modernes de culture des tissus et des cellules, et de biologie moléculaire, y compris le sauvetage des embryons, l'hybridation somatique et la transformation génétique. Cette communication présente les réussites de l'application des techniques biotechnologiques mentionnées ci-dessus. Il s'agit du transfert des gènes de résistance aux maladies chez les plantes cultivées. Ces gènes ont été prélevés à partir d'espèces sexuellement compatibles et incompatibles et même d'organismes aussi différents que champignons, bactéries et virus. D'autres techniques moléculaires, telles que l'ADN polymorphe aléatoirement amplifié (RAPD) et la cartographie RFLP nous ont permis de situer avec précision les gènes de résistance dans un chromosome spécifique. En outre, la technique de marquage transposon permet d'entrevoir l'isolement de ces gènes de résistance. Enfin, nous présentons les résultats de nos propres recherches effectuées au Scottish Crop Research Institute sur la pomme de terre, l'orge et l'arachide afin de démontrer l'utilisation de quelques unes de ces techniques de biotechnologie dans le transfert des gènes de résistance.*

The theme of this workshop is plant-microbe interactions and we would like to focus on the genetics of the interaction between plant hosts and parasites. Interest in this area of genetics began early this century and one of the first reports of the inheritance and transmission of alleles in plants was resistance to a fungal pathogen (Biffin 1905). The theme of this paper is to review methods for the manipulation of disease resistance genes in crop improvement programmes. Particular emphasis will be placed in defining the role of cellular and molecular techniques and describing how these may be integrated into crop improvement.

Manipulation of disease resistance gene(s) in a breeding programme can proceed at five different levels: (1) Whole plant; (2) Genome; (3) Chromosome; (4) Cellular and (5) Molecular.

The first three approaches are dependent on the identification of genetic sources of disease resistance traits and the sexual transfer of such traits. Following sexual crossing/hybridization there is randomization of genetic information following gametogenesis. The identification of desirable meiotic recombinant genotypes possessing the appropriate combination of agronomic and disease resistance genes is therefore a primary objective in this phase of the programme. Manipulation at the whole plant level is usually based on phenotypic selection, phenotype being the consequence of interaction between genotype and environment. Genome manipulation, polyploidy and haploidy involves either an increase or decrease in sets of chromosomes. Furthermore, in certain polyploid organisms which can tolerate the gain or loss of chromosomes, manipulation of individual chromosomes or segments of chromosomes can be achieved via cytogenetic manipulations.

Cellular and molecular approaches need not involve sexual hybridization and the objective in this case is to either overcome sexual incompatibility barriers or to induce single beneficial changes in the recipient genome. The overall theme is to reduce the amount of genetic information being transferred from one organism to another often to a single gene. However, before considering these approaches it is important to examine two features of the plant's genome that are particularly relevant to the manipulation of disease resistance genes. The first is the ability of plants to generate, maintain and tolerate genetic variability, and the second is the ability of plants to undergo interspecific and intergeneric hybridization. This phenomenon is a prominent component of angiosperm evolution and a crucial step in gene introgression for disease resistance genes from wild species into crop plants.

STRATEGIES FOR THE TRANSFER OF DISEASE RESISTANCE GENE(S)

Sexual methods for transferring disease resistance gene(s)

The stages involved in the transfer of disease resistance genes in a conventional crop improvement programme are summarized in Table 1. In most breeding programmes, the synthesis of new and improved genotypes relies upon the process of sexual recombination and segregation that occurs in progenies of heterozygous individuals. The most recalcitrant problem for breeders is the difficulty of identifying desirable recombinant genotypes in a segregating population. Furthermore, the relatively lengthy period (10-15 years) required to produce new cultivars indicates that conventional breeding is less responsive to changes in

objectives. Enabling technologies that allow the efficiency of selection to be improved and reduce the population sizes that need to be processed in a breeding programme would be highly beneficial. Strategies that allow phenotypic-based selection programmes to be translated into genotypic selection would not only reduce costs but also improve the speed and precision of breeding programmes.

Table 1. Sexual gene transfer of disease resistance gene(s)

- Identification of genetic variation.
- Crossing, hybridization.
- Meiosis, segregation.
- Selection for expression of resistance.
- Fixation in a stable and desirable genetic background.

The detection and exploitation of polymorphism in plants and animals represents one of the most significant advances in biology. Developments in the electrophoretic separation of proteins and in the exploitation of recombinant DNA technology have increased the number of genetic markers available for use in breeding. These genetic markers may be used to identify a chromosomal segment and enable that region of the genome to be monitored in subsequent generations of selfing or crossing. Genetic markers must be easily identified in order to be of value in a breeding programme.

Isozymes, or multiple molecular forms of enzymes are enzymes that share a common substrate but differ in electrophoretic mobility (Markert and Moller 1959). They have been used extensively in plant breeding (Tanksley and Orton 1983) for germplasm characterization and tagging of disease resistance genes. Breeding hexaploid wheat with resistance to the eyespot pathogen (*Pseudocercospora herpotrichoides*) is an important objective in Western Europe. Genetic linkage has been established between the eyespot resistance gene and an allele of endopeptidase-1 (*Ep-D1b*) (Worland *et al.* 1988). The electrophoretic separation of endopeptidase isozymes provides a useful diagnostic test for eyespot resistance and can be performed on single seeds or leaf tissue. The technique is now being used routinely in wheat breeding programmes to identify eyespot resistant wheat genotypes (Summers *et al.* 1988).

Barley yellow mosaic virus (BaYMV) is an important soil-borne disease of barley. Resistant barley cultivars originating from Japan and China have been identified and segregation analysis indicated that the BaYMV locus is tightly linked to three leaf esterase loci on chromosome 3H (Konishi *et al.* 1989). The intensity of linkage (1.26 ± 0.622) is sufficient to allow the use of leaf esterase isozyme profiles as a means of selecting, indirectly, resistance to BaYMV. Similarly, Feuerstein *et al.* (1990) have used *H. spontaneum* backcross derived lines to identify isozyme loci linked to rust resistance genes. Two partially dominant loci were located to chromosomes 3 and 6 and showed linkage to the isozyme genes *Est2* (chromosome 3) and

Acp3 and *Dip2* (chromosome 4). Isozyme markers can therefore be successfully used to manipulate resistance genes in breeding programmes.

These examples illustrate the principles behind the use of protein markers to identify desirable recombinant genotypes in segregating populations. Furthermore, they highlight the value of biochemical markers as indirect selection tools in plant breeding programmes. Although isozymes are relatively inexpensive and technically simple to operate, they are more limited than DNA-based markers due to the lower level of polymorphism detected. Furthermore, protein markers only sample activity expressed regions of the genome, whereas DNA markers based on Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) are unlimited in number and exhibit higher levels of polymorphism. The class of genetic marker therefore has great potential for establishing accurate estimates of the levels of genetic diversity and augmenting classical methods of plant breeding.

Perhaps the most important and direct application of RFLP technology is in the development of detailed genetic linkage maps. An attractive feature of RFLP mapping is that it can be accomplished in any organism that undergoes sexual recombination. The establishment of linkage between an RFLP locus and the trait of interest will enable that trait to be manipulated with greater speed and precision. The introgression of important genes from wild species into cultivated plants is considered to be one of the most significant contributions of RFLP technology to breeding. Barley near isogenic lines have been used to establish linkage between the *ml-o* mildew resistance gene complex on chromosome 4H and RFLP markers (Hinze *et al.* 1991). These markers may now be used in barley breeding programmes to expedite the transfer of mildew resistance genes from *H. spontaneum* into the *H. vulgare* gene pool. For polyploid cereals such as wheat, the availability of aneuploid genetic stocks allows chromosome manipulation techniques in conjunction with genetic markers to be used to analyze alien gene transfer in the *Triticeae*. RFLP markers have been identified which are tightly linked to genes for tobacco mosaic virus, fusarium wilt, bacterial speck and root knot nematodes in tomato. Linkages have been identified between RFLP markers and a major dominant locus conferring resistance against the root cyst nematode *Globodera rostochiensis* on chromosome 9 of potato. RFLP loci linked to genes conferring resistance to: maize dwarf mosaic virus, sugar beet cyst nematode (*Heterodera schachtii*) and beet necrotic yellow vein virus. Genes controlling potato virus X have been mapped to chromosome XII and V using RFLPs.

It is anticipated that RFLPs will have a significant impact on plant breeding for disease resistance but the technology is still complex and labour intensive. There is a need for polymorphic assay procedures which can be used to analyze large numbers of samples. The analysis of nucleotide sequence variability has been revolutionized by the development of the Polymerase Chain Reaction (PCR) (Saiki *et al.* 1988). PCR is a procedure for the *in vitro* enzymatic amplification of a specific segment of DNA which can be visualized on ethidium bromide stained agarose gels. Recently Williams *et al.* (1990) and Wilde *et al.* (1991) have described a new procedure for detecting polymorphism in plants. Randomly amplified polymorphic DNA sequences or RAPD markers are based on the use of single short (10 mers) synthetic oligonucleotide primers.

The advantages of RAPDs over conventional RFLP technology includes the small amount of DNA required (25-100 ng per reaction) compared to 5-10 μg for RFLP analysis and an ethidium bromide-based detection system. RAPDs therefore provide a feasible genetic marker system which is compatible with the high throughput requirements of breeding programmes. Indeed RAPD markers have been used to map and locate resistance genes to *Pseudomonas syringae* in tomato (Martin *et al.* 1991). Michelmore *et al.* (1991) have developed a novel mapping strategy based on bulked segregation analysis to quickly identify RAPD markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. In the long term, the development of detailed genetic maps in organisms with small genomes e.g. *Arabidopsis* may allow the cloning and isolation of disease resistance genes with no known protein or mRNA product.

Non-sexual means of gene transfer

Plant biotechnology is a term that encompasses many different techniques of cell and tissue culture and molecular biology which can be applied to the improvement of crops species. These novel approaches to plant improvement are designed to complement, rather than replace, conventional breeding methods. The role of biotechnology in facilitating the transfer of disease resistance gene via conventional breeding methods is described in Table 2. *In vitro* micropropagation methods play a major role in the maintenance of elite germ lines which are free from diseases. This is exploited in their efficient dissemination throughout the world.

Similarly, embryo culture technique has been very useful in overcoming the barriers to hybrid embryo survival due to the absence of normal endosperm development (Williams *et al.* 1982). Additionally, tissue culture techniques have been used to transfer disease resistance genes in cereals by somatic recombination which occurs during intergeneric hybrid cell culture (Larkin *et al.* 1990). Although this review deals with the transfer of disease resistance genes into crop plants, it should be noted that mutation-based cell selection or exploitation of somaclonal-based variation in regenerants arising from tissue culture coupled with the use of appropriate selection agent in the culture medium can give rise to plants with useful traits (Daub 1986).

SOMATIC HYBRIDIZATION

Somatic and asymmetric somatic hybridization for incorporating disease resistance genes into crop plants

Somatic hybridization of plants via protoplast fusion potentially overcomes nuclear and cytoplasmic sexual incompatibility and provides a means of widening the genepool available for crop improvement (Kumar and Cocking 1988, Glimelius *et al.* 1991). Protoplasts are of great interest to the plant breeder because they can be universally fused and heterokaryons between interkingdom, interphylla, intergeneric, interspecific and intraspecific combinations can be created (Davey and Kumar 1983). Many plant protoplast systems have been shown to be totipotent i.e. a whole plant can be regenerated from a single cellular protoplast.

Table 2. Role of biotechnology in the transfer of disease resistance genes via sexual hybridization

DOUBLED HAPLOIDS

- Reduce timescale.
- Fix desirable gene combination.
- Facilitate evaluation and selection.

Cell culture of chromosome addition lines.

ROLE OF BIOTECHNOLOGY

EMBRYO RESCUE

- Facilitate wide crosses, alien gene transfer.

MICROPROPAGATION AND MAINTENANCE ELITE GERMPLASM

- Heterozygous genotypes.
- Maintenance gene complexes.

POLYMORPHIC ASSAY PROCEDURES

- Phenotypic-genotypic selection.
- Speed and precision.
- Linkage maps.
- Map-based gene cloning.

It seems that only one of the parental lines chosen for somatic hybridization needs to exhibit a regeneration capacity from protoplasts, and this characteristic appears to be dominant. Various "fusogens" have been used to fuse plant protoplasts. The most common are: polyethylene glycol (PEG); Ca^{2+} ions at high pH; and electrofusion. It is important to note that protoplast fusion between two parental lines gives rise to not only the desired heterokaryons but non-fused parental and self-fused parental protoplast material thereby making selection of heterokaryon/hybrid a necessity. Finally, a thorough characterization of selected hybrid clones can be conducted based on appropriate use of morphological, cytological, biochemical (isozymes, Fraction 1 protein [FIP], chloroplast encoded large sub-unit and FIP nuclear encoded small sub-unit) and molecular markers (RFLPs, ribosomal DNA probes and RAPDS) (for technical protocols see Vasil 1984).

Experiments have shown that the somatic hybrid fusion products between more distantly related intergeneric combinations often do not regenerate, or if they do, the regenerant plants are aberrant and sterile. By contrast, interspecific somatic hybrid fusion products can regenerate plants more readily, some of these are fertile and can be incorporated into breeding programmes. More recently, the use of high dosage γ -irradiation or X-rays to irradiate a

donor protoplast prior to fusion with a non-irradiated recipient protoplast has been useful in obtaining more limited gene transfer, such as reduced number of chromosomes or parts of chromosomes or a few genes being transferred into the asymmetric somatic hybrid. The disadvantage of this technique is that it is a 'shot gun' method for achieving transfer of genes and possibly of limited value for the transfer of traits which are controlled by several genes located on different chromosomes.

In the absence of molecular techniques providing cloned genes for traits of interest e.g. disease resistance traits asymmetric somatic hybridization offers a stop gap method for the random transfer of groups of genes. As such, limited gene transfer technology is being investigated further and there have been a few useful traits e.g. TMV resistance transferred with this method (Bates 1990). So far no real assessment has been made as to what, if any mutagenic effect the irradiation might have on the genes being transferred. This technique has also been widely used for the transfer of cytoplasmic organelles i.e. chloroplasts and mitochondria. Examples include cytoplasmic male sterility from mitochondria and resistance to the fungal toxin, tentoxin from chloroplasts (Kumar and Cocking 1987).

Production of asymmetric somatic hybrids can regenerate plants that are morphologically more like the recipient plant. A consequence of this is that backcrossing procedures aimed at eliminating deleterious traits are reduced. Table 3 records the success of somatic hybridization programmes achieving incorporation of fungal/viral/bacterial pest disease resistance traits into somatic hybrid plants. For tobacco TMV resistance has been transferred from *N. nesophila* and *N. rustica* and *N. glutinosa* to commercial tobacco (*N. tabacum*) (Lal and Lal 1990), but there is no published data as to the fertility of the hybrids produced and the transmission of the trait into progeny.

Asymmetric somatic hybrids between *N. tabacum* x *N. repanda* have also been produced resembling *N. tabacum* but possessing a few chromosomes from the highly irradiated donor parent *N. repanda* (Bates 1990). The plants can be backcrossed but the transmission genetics of these plants for TMV resistance have still to be ascertained and compared with the somatic hybrid plants of *N. tabacum* (+) *N. repanda*.

Somatic hybrid plants produced between *Brassica napus* and *B. juncea* or *B. nigra* or *B. carinata* have been shown to express the *Phoma lingam* fungal resistance from *B. nigra* or *B. juncea* or *B. carinata* (Sjödin and Glimelius 1989a). Asymmetric somatic hybrids have been produced between *B. napus* and these same species *B. juncea*/*B. nigra*/*B. carinata* as an irradiated donor species and *Phoma lingam* resistant asymmetric somatic hybrids have been obtained (Sjödin and Glimelius 1989b), but with a slightly lower frequency than was obtained for the somatic hybrid plant material. Interestingly, the use of the toxin sirodesmin produced by *P. lingam* was essential as a protoplast culture selection in order to recover any *P. lingam* resistant lines from asymmetric somatic hybridization experiments.

A number of interspecific somatic hybrid plants have been produced between the cultivated potato or dihaploid potato (*S. tuberosum*) and the wild non-tuberizing potato species *S. brevidens*. In the case of *S. tuberosum* (2n) (+) *S. brevidens* somatic hybrids, potato leaf roll virus (PLRV) or PLRV and potato virus Y have been expressed from the wild species genome in the somatic hybrids (Austin *et al.* 1985, Fish *et al.* 1988, Gibson *et al.* 1988). In the case

of *S. tuberosum* 4n (+) *S. brevidens* somatic hybrids potato leaf roll virus and foliage blight (*Phytophthora infestans*) resistances have been shown to be expressed in the somatic hybrid plant material and PLRV resistance was also transmitted to progeny.

Table 3. Transfer of genes with disease resistance properties by somatic hybridization

Interspecific somatic hybrids	Disease resistance	Transmissible
<i>Nicotiana tabacum</i> (+) <i>N. rustica</i>	TMV resistance from <i>N. rustica</i> .	Not known
<i>N. tabacum</i> (+) <i>N. nesophila</i>	TMV resistance from <i>N. nesophila</i> .	Not known
<i>N. tabacum</i> (+) <i>N. glutinosa</i>	TMV resistance from <i>N. glutinosa</i> .	Not known
<i>Solanum brevidens</i> (+) <i>S. tuberosum</i> 2n	Potato leafroll virus PLRV resistance from <i>S. brevidens</i> .	Not known
<i>S. brevidens</i> (+) <i>S. tuberosum</i> 4n	Late blight resistance from <i>S. tuberosum</i> and PLRV resistance from <i>S. brevidens</i> . <i>Erwinia</i> resistance from <i>S. brevidens</i> .	PLRV resistance & <i>Erwinia</i> resistance transmissible - other not known
<i>Brassica juncea</i> (+) <i>B. napus</i>	<i>Phoma lingam</i> resistance from <i>B. juncea</i> .	Not known
<i>B. nigra</i> (+) <i>B. napus</i>	<i>P. lingam</i> resistance from <i>B. nigra</i> .	Not known
<i>B. carinata</i> (+) <i>B. napus</i>	<i>P. lingam</i> resistance from <i>B. carinata</i> .	Not known
<i>Solanum melongena</i> (+) <i>S. sisymbriifolium</i>	Root-knot nematode (<i>Meloidogyne incognita</i>) and carmine spider mite resistance from <i>S. sisymbriifolium</i> .	Unsuccessful

Interestingly, the somatic hybrids were found to possess a novel resistance to *Erwinia* spp. tuber rot which is not present in *S. tuberosum* or in the non-tuber bearing *S. brevidens* (Austin *et al.* 1988). However, *S. brevidens* does have resistance to *Erwinia* stem rot and this apparently manifests itself as a resistance to tuber rot in the somatic hybrid plants. The transmission genetics of this trait have not as yet been ascertained. Also, in the *Solanaceae*, five somatic hybrids between sexually incompatible *Solanum melongena* and *Solanum sisymbriifolium* have been shown to have incorporated and expressed resistance to the root knot nematode *Meloidogyne incognita* and carmine spider mite resistance (*Tetranychus cinnabarinus*) from *S. sisymbriifolium* (Gleddie *et al.* 1985). Unfortunately attempts to backcross and self-pollinate the somatic hybrids have been unsuccessful. A minimal level of fertility could perhaps be induced in these hybrids, possibly through "back fusion" to egg plant protoplasts.

Research work currently in progress at SCRI has shown that at the intraspecific level somatic hybrids between agronomically useful dihaploid potato lines of *S. tuberosum* (PDH 417 and PDH 40) have been shown to express the potato cyst nematode (*G. pallida*) resistance of one of the parental lines (Pdh 417). Fusion products produced between PDH 40 and PDH 727 are

being identified using RAPD markers and are being assessed for their disease resistance properties (*G. pallida* resistance and *Phytophthora infestans* resistance) (Cooper-Bland *et al.* 1992).

GENETIC TRANSFORMATION

Genetic transformation methodology provides a novel means of introducing genetically engineered gene(s) from any organism into the desired genomes of plants and thereby enable researchers to manipulate plant genomes with minimal interferences to the recipient genome. Additionally, the controlled introduction of novel genes has the potential to reduce the time scale of breeding programmes aimed at improving the agronomic performance of crop plants (Gasser and Fraley 1989, for technical protocols see Draper *et al.* 1988).

Several different methods are available for introducing alien genetic information into the genomes of plants. A comparative assessment of the merits and the demerits of three transformation methods is provided in Table 4. Since the first report on genetic transformation of tobacco plants in 1983, dramatic progress has been made in the development of gene transfer method for plants.

The ability to introduce genetically engineered genes from any organism into plant cells and tissue and to regenerate viable, fertile plants has allowed the transfer of several agronomically useful genes, including disease resistance genes into crop plants. In this paper we highlight successful transfers of genetically engineered genes with disease resistance properties into crop plants and provide examples from our work at SCRI.

Table 4. Genetic transformation in plants

Protoplast-mediated	<i>Agrobacterium</i> -mediated	Biolistic-mediated
1. No host limitation.	Limited host range.	No host limitation.
2. Require complex tissue culture techniques (i.e. protoplasts).	Less complex (i.e. leaf).	Not complex (i.e. shoot meristem).
3. Transient and stable transformation.	Most efficient method for stable.	Unique and best for transient. Less efficient for stable.
4. Chromosomal abnormality higher.	Less.	Less.
5. Cloned	Could be chimaeric.	High % are chimaeric.

Viral resistance

Some of the most successful early applications of genetic engineering in crop improvement have been in the production of virus-resistant transgenic plants. A number of plant virus nucleic acid sequences, including those encoding virus coat proteins, have been found to be especially useful in the development of virus-resistant plants, termed "coat protein-mediated resistance" (Beachy *et al.* 1990).

Coat protein-mediated resistance is achieved by the expression of a virus coat protein (CP) gene in transgenic plants. Accumulation of the CP confers resistance to infection and/or disease development by the virus from which the CP gene was derived and also to related viruses.

In general, the procedure involves the isolation of cloned DNA which represents the CP open reading frame (ORF) and the construction of a chimaeric gene which is expressed by the use of an appropriate transcriptional promoter. For example, we have constructed a plant expression vector which contains nucleotide sequences that encode the CP of potato leafroll luteovirus (PLRV) under the control of the 35S promoter of cauliflower mosaic virus, and the nopaline synthase terminator. When this chimaeric gene was transformed into potato plants by *Agrobacterium*-mediated transformation a large amount of RNA transcripts from the integrated viral gene were detected in the transgenic plants. However, PLRV coat protein was detected in only some of these transgenic plants. When plants were analyzed for PLRV resistance we found that the coat protein gene of PLRV had induced a measure of resistance to virus multiplication in transgenic potato plants but not to PLRV infection (Barker *et al.* 1992).

In recent years, virus resistance has been induced in several plant species by genetic transformation with sequences encoding virus coat proteins (Table 5). In all examples examined so far, the protection is manifested as prevention of infection or as a delay in the onset of virus accumulation and/or symptom development in systemically infested leaves. The mechanisms of CP-mediated resistance is not clear. However, it is believed that the expression of CP RNA and/or protein somehow interfere with the uncoating of the infected virus coat protein, which is a prerequisite for virus RNA replication in infected host plants.

Other methods of genetic engineering to achieve virus resistance in plants involves the use of cDNAs of small satellite RNAs of cucumber mosaic virus and of tobacco ringspot virus by their expression in transgenic plants (Harrison 1992). The strategy of satellite-mediated resistance consists of transforming plants with a cDNA of benign satellite RNA. When the transformed plants are inoculated with satellite-free CMV, the benign satellite is excised from the RNA transcript and replicated by the challenge virus, with the result that symptom development is suppressed.

Antisense RNAs of several plant viruses have been incorporated and expressed in plants and in some cases provide weak protection against virus infection; in other cases there is no protection. The incorporation and expression of virus CP protein genes, however, has provided the strongest virus resistance yet developed (Harrison 1992).

Table 5. Examples of transgenic plants with viral resistance

Plants	Gene conferring resistance	Viruses
Tobacco} Alfalfa}	Coat protein gene	Alfalfa mosaic virus
Potato	Coat protein gene	Potato virus X
Potato	Coat protein gene	Potato virus Y
Tobacco	Coat protein gene	Cucumber mosaic virus
Tobacco} Tomato}	Coat protein gene	Tobacco mosaic virus
Potato	Coat protein gene	Potato leafroll virus
Tobacco	Coat protein gene	Tobacco rattle virus
Tobacco	A benign satellite sequence	Cucumber mosaic cucumo virus
Tobacco	A benign satellite sequence	Tobacco ringspot virus
Tobacco	54 kDa gene	Tobacco mosaic virus

Bacterial resistance

Limited success in engineering resistance to bacterial pathogens has been reported. Japanese scientists have been successful in obtaining resistance to bacterial pathogens by genetic engineering. They expressed an acetyl transferase gene from a bacterium in tobacco plants and showed that transgenic plants were resistant to "wildfire" disease caused by *Pseudomonas syringae*.

The mechanism of resistance involves acetyltransferase enzyme detoxifying the toxin produced by *P. syringae*. It is expected that other genes that can provide resistance to bacterial pathogens will be identified in the not too distant future (Fraley 1992).

Fungal resistance

Good progress has been made recently in identifying genes that confer resistance to fungal pathogens. A chitinase gene from the soil bacterium *Serratia marcescens* confers significant reduction in the severity of brown spot disease caused by the fungus *Alternaria longipes* when expressed in transgenic tobacco plants.

Similarly, tobacco plants that expressed a bean chitinase gene expressed under 35S CaMV promoter showed resistance against *Rhizoctonia solani*. Other genes that can confer resistance to fungal pathogens have been identified and it is expected that many transgenic plants possessing fungal resistant properties will be produced in the near future (Fraley 1992).

Insect resistance

Similar to progress in the area of viral resistance in plants, insect resistance by genetic engineering has been very successful (Burnke and Meeusen 1991). Insect resistance was first achieved in transgenic plants by expressing DNA encoding for selectively insecticidal protein from certain strains of *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*).

The insecticidal activity of the *B.t.* toxin involves the paralysis of the midgut and ending with disruption of midgut cells which eventually kills the insects. Genetic engineered *B.t.* genes have now been introduced into several important crop plants including tobacco, potato, tomato, cotton and maize, and these transgenic plants exhibit tolerance to caterpillar pests in laboratory and field tests (Table 6).

Another important insecticidal gene that has been identified comes from a legume plant, cowpea (*Vigna unguiculata*). The seeds of this plant produce a trypsin inhibitor (CpTI) which confers resistance against a wide range of insect pests (Gatehouse and Hilder 1988). The expression of CpTI gene under a constitutive and highly expressible promoter (i.e. 35S CaMV) in plants provides a high level of resistance to a wide variety of lepidopteran and coleopteran insects including an army worm (*Spodoptera littoralis*), the corn earworm (*Heliothis zea*) and corn root worm (*Diabrotica undecimpunctata*) (Table 6).

Several biotechnology companies are actively involved in using *B.t.* and the cowpea trypsin inhibitor genes and are developing new genes with insecticidal properties. In the next 10-20 years introduced genes will probably provide a large percentage of insect control in annual crops such as cotton and vegetables allowing reduced insecticide usage.

Table 6. Examples of plants with insect pest resistance

Plant	Gene conferring resistance	Pests
Tobacco	<i>B.t.</i> toxin gene from <i>Bacillus thuringiensis</i> .	Caterpillar pests. Tobacco hornworm.
Tomato	"	Caterpillar pests. Tobacco hornworm.
Cotton	"	Cotton bollworm.
Maize	"	Corn earworm.
Potato	"	Colorado potato beetle.
Populus (Hardwood tree)	"	Forest tent caterpillar and gypsy moth.
Tobacco}	Cowpea trypsin inhibitor gene.	Larvae of tobacco hornworm.
Cotton}		Cotton bollworm and corn earworm.
Tobacco	Proteinase inhibitor II proteins.	Larvae of <i>Manduca sexta</i> .
Common bean*	α -amylase inhibitor gene.	Cowpea weevil.

* Not yet achieved

ISOLATION OF PLANT DISEASE RESISTANCE GENES

A great deal of success has been reported in the identification of genes and nucleotide sequences that confer resistance to insect, fungal, bacterial and virus pathogens and their utilization in producing disease resistance in transgenic plants. However, no one has yet been able to isolate disease resistance genes from plants, and this has been a bottleneck in the progress of producing disease resistant plants. Many plants carry genes that confer resistance to particular pathogens. However, no clear route exists for cloning these disease resistance genes on the basis of their biochemical properties, since little is known about their gene products. Therefore, conventional gene isolation techniques such as cDNA screening methods based on the knowledge of the gene products is not applicable. In recent years, several other approaches to gene isolation have been developed and involve chromosome walking from linked marker genes, tagging with transposable elements, isolation of the protein products by use of affinity techniques with labelled specific elicitors and complementation cloning (Dixon and Lamb 1990).

Table 7. Decision tree for manipulation of disease resistance

STEPS IN MANIPULATING DISEASE RESISTANCE		ROLE OF BIOTECHNOLOGY
• Does genetic variation exist?	NO→	Create it! • Mutation <i>in vitro</i> . • Mutation <i>in vivo</i> . • Synthesize gene.
YES↓		
• Sexually transferable?	NO→	Enable it! • Protoplast fusion. • Gene transfer.
YES↓		
• Nature of the screen?	DIFFICULT AND EXPENSIVE→	Devise quick and cheap methods. • <i>In vitro</i> . • Genetic markers. • Dot blots.
QUICK AND SIMPLE↓		
• Make crosses↓		Improve knowledge of basic biology of plant (host) and pathogen and interaction.
Select improved cultivars.		

Efficiency, speed and precision.

The transposon tagging approach using the Ac element of maize is being developed at SCRI. Transposon tagging combined with genetic marker analysis is the most promising method available to isolate disease resistance genes (Jones *et al.* 1990). Mutants are sought by screening individuals in a genetic stock within which a characterized transposable element is active. Genetic tests on such mutants then determine whether the mutation in the gene has indeed been caused by gene disruption through the insertion of the transposon. Next, a genomic library is prepared of DNA from the mutant genotype, and clones homologous to the transposon are isolated. Sequences adjacent to the transposon insert are then used to isolate functional alleles of the gene of interest from a genomic library of DNA from wild type individuals. We are utilizing transposon tagging methods to isolate a potato cyst nematode (PCN) resistant gene, the H_1 gene of potato. The H_1 gene is a dominant resistant gene and confers resistance to PCN (*Globodera rostochiensis*) Ro1 pathotypes.

CONCLUSIONS AND FUTURE PROSPECTS

Many new opportunities are emerging for the manipulation of disease resistance genes and the scientific and technical options available are given in Table 7. Future developments are dependent on an integrated approach combining both conventional and non-conventional approaches. Also, it is important that developed countries allow provision for transfer of the biotechnological techniques to developing countries. Furthermore, objectives must be clearly identified in order to utilize the appropriate biotechnological techniques in a purposeful manner.

REFERENCES

- Austin S., Baer M.A. and Helgeson J.P. (1985). Transfer of resistance to potato leafroll virus from *Solanum brevidens* into *S. tuberosum* into *S. tuberosum* by somatic fusion. *Plant sci. Lett.* 39: 75-81.
- Austin S., Lojkowska E., Ehlenfeldt M.K., Kelman A. and Helgeson, J.P. (1988). Fertile interspecific somatic hybrids of Solanum: a novel source of resistance to *Erwinia* soft rot. *Phytopath.* 78: 1216-1220.
- Barker H., Reavy B., Kumar A., Webster K. and Mayo M. (1992). Restricted virus multiplication in potatoes transformed with the coat protein of potato leafroll luteovirus: Similarities with a type of host gene-mediated resistance. *Ann. Appl. Biol.* 120: 55-64.
- Beachy R.N., Loesch-Fries S., Turner N.E. (1990). Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Ann. Rev. Phytopathol.* 28: 451-474.
- Biffin R.H. (1905). Mendal's laws of inheritance and wheat breeding. *J. Agric. Sci.* 1: 4-48.
- Burnke K.J. and Meeusen R. (1991). Insect control with genetically engineered crops. *Trends in Biotech.* 9: 197-200.
- Cooper-Bland S., Baird E., Kumar A., De,Maine M., Forster B.P., Waugh R. and Powell W. (1992). Inter- and intraspecific somatic hybridization in potato and molecular characterization using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Proceedings of the Second International Symposium on New Genetical Approaches to Crop Improvement, Karachi, Pakistan* (in press).
- Daub M.E. (1986). Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 159-186.
- Davey M.R. and Kumar A. (1983). Higher plant protoplasts: retrospects and prospects. In: *Plant protoplasts*. K.L. Giles, Ed. *Int. Rev. Cytol. Supp.* 16: 219-263. Academic Press, New York.

- Dixon R.A. and Lamb C.J. (1990). Plant-microbial pathogen interactions. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.* 41: 339-367.
- Draper J., Scott R., Armitage P. and Walden R. (1989). *Plant genetic transformation and gene expression - a laboratory manual*. Blackwell Press.
- Feuerstein U., Brown A.H.D. and Burdon J.J. (1990). Linkage of rust resistance genes from wild barley (*H. spontaneum*) with isoenzyme markers. *Plant breeding* 104: 318-324.
- Fish N., Karp A., and Jones M.G.K. (1988). Production of somatic hybrids by electrofusion in *Solanum*. *Theor. Appl. Genet.* 76: 260-266.
- Fraley R. (1992). Sustaining supply. *Biotechnology* 10: 40-43.
- Gasser C.S. and Fraley R.T. (1998). Genetically engineered plants for crop improvement. *Science* 224: 1293-1299.
- Gatehouse A.M.R. and Hilder V.A. (1988). Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases. pp. 1245-1254.
- Gibson R.W., Jones M.G.K. and Fish N. (1988). Resistance to potato leafroll virus and potato virus Y in somatic hybrids between dihaploid *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. *Theor. Appl. Genet.* 76: 113-117.
- Gledale S., Fassuliotis G., Keller W.A. and Setterfield G. (1985). Somatic hybridization as a potential method for transferring nematode and mite resistance into egg plant. 2. *Pflanzenzücht* 94: 352-355.
- Glimelius K., Fahleson J., Landgren M., Sjödin C. and Sundberg E. (1991). Gene transfer via somatic hybridization in plants. *Trends in Biotech.* 9: 24-30.
- Harrison B.D. (1992). Genetic engineering of virus resistance: a successful genetical alchemy. In: *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 99B (in press).
- Hinze K., Thompson R.D., Ritter E., Salamini F., and Schulzelefert P. (1991). Restriction fragment length polymorphism-mediated targeting of the *ml-o* resistance locus in barley (*Hordeum vulgare*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 3691-3695.
- Jones J.D.G., Carland F.C., Harper L., Lim E. and Dooner H.E. (1990). Genetic properties of the maize transposon Activator (Ac) in tobacco. *Plant Gene Transfer, UCLA Symposium* 129: 59-64.
- Konishi T., Kawada N., Yoshida H. and Sohtcome J. (1989). Linkage relationships between two loci for the barley yellow mosaic resistance of Mokusekko 3 and esterase isoenzymes in barley. *Jap. J. Breeding* 39: 423-430.
- Kumar A., and Cocking E.C. (1987). Protoplast fusion: a novel approach to organelle genetics. *Amer. J. Bot.* 74: 1289-1303.
- Lal R. and Lal S. (1990). *Crop improvement utilising biotechnology*. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Larkin P.J., Spindler L.H. and Banks P.M. (1990). Cell culture of alien chromosome addition lines to induce somatic recombination and gene introgression. In: *Progress*. H.J. Nijkamp et al. Eds. Kluwer Academic, London. pp. 163-168.
- Markert C.L. and Moller F. (1959). Multiple forms of enzymes: tissues, ontogenetic and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45: 753-763.
- Martin G.B., Williams J.G.K. and Tanksley S.D. (1991). Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2336-2340.
- Michelmores R.W., Paran I. and Kesseli R.V. (1991). Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9828-9832.
- Ryan C.A. (1990). Protease inhibitors in plant genes for improving defences against insects and pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 28: 423-449.
- Saiki R.K., Gelfond D.H., Stoffel S., Scharf S.K., Higuchi R., Horn B.T., Mullis K.B. and Erlich H.A. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sjödin C. and Glimelius K. (1989a). *Brassica napronigra* a somatic hybrid resistant to *Phoma lingam*. *Theor. Appl. Genet.* 77: 651-656.
- Sjödin C. and Glimelius K. (1989b). Transfer of resistance against *Phoma lingam* to *Brassica napus* by asymmetric somatic hybridization combined with toxin selection. *Theor. Appl. Genet.* 78: 513-520.

- Summers R.W., Koebner R.M.D., Hollins T.W., Förster J. and Macartney D.P. (1988). The use of an isoenzyme in breeding wheat (*Triticum aestivum*) resistant to the eyespot pathogen *Pseudocercospora herpotrichoides*. In: *Seventh Int. Wheat Genetics Symposium 2*, T.E. Miller and R.M.D. Koebner. Eds. Cambridge Press, UK. pp. 1195-1197.
- Tanksley S.D. and Orton T.J. (1983). *Isozymes in plant genetics and breeding*. Elsevier, Amsterdam.
- Vasil I.K. (1984). *Cell culture and somatic cell genetics of plants, Vol. 1. Laboratory procedures and their applications*. Academic Press.
- Wilde J., Waugh R. and Powell W. (1991). Genetic fingerprinting of *Theobroma cacao* clones using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* (in press).
- Williams E.G., Verry I.M. and Williams W.M. (1982). Use of embryo culture in interspecific hybridization: In: *Plant improvement and somatic cell genetics*. I.K. Vasil, W.R. Scowcroft, and K.J. Frey, Eds. pp. 119-127.
- Worland A.J., Law C., Hollins T.W., Koebner R.M.D. and Gura A. (1988). Location of a gene for resistance to eyespot (*P. herpotrichoides*) on chromosome 7D of bread wheat. *Plant Breeding* 101: 43-51.

NOTE DE PRESENTATION DU PROJET CTL/SUD A THIES

Papa NDIAYE

Directeur du Projet Conservation des Terroirs du Litoral Secteur Sud

Direction des Eaux et Forêts

B.P. 432 Thies, Senegal

Zone d'action: La grande côte, entre Kayar et Fass Boye soit 51 km de long sur 10 km de large

Région administrative: Région de Thiès; Départements de Tivaouane et Thiès

Objectifs globaux

Consolider les acquis et poursuivre la protection contre l'ensablement par la fixation des dunes; mettre en place un programme de sensibilisation, de mobilisation et de formation des populations pour la prise en charge de l'essentiel des activités forestières et la maîtrise de la reconstitution et la gestion de leur environnement; accroître la participation des femmes aux activités forestières; promouvoir les plantations privées.

Objectifs spécifiques

Les activités à réaliser annuellement sont la protection et la plantation de 350 ha de dunes par an; la création de 40 ha de bois de village; la réalisation de 15 km de brise-vents; la réalisation de 2.5 km d'axes routiers; la production de 450 000 plants dont 50 000 à distribuer; amélioration du niveau de vie des populations par la mise en place de projets d'appui tels l'achat de moulin à mil, de puits, d'appui en semences et produits phytosanitaires, de petits commerces ruraux, etc.; programme jeunesse avec l'organisation de tournois de foot-ball, de journée culturelle, etc.; séminaire de formation des populations en techniques de pépinières, de plantation, de greffage, en gestion; conservation des produits; programme de santé villageoise; la réalisation de puis - pépinières.

Les partenaires: l'Administration, les ONG et projets de la région, les groupements féminins, les associations sportives et culturelles, les élèves etc... dans 66 villages répartis dans les trois sous-zones du projet (zone de Mboro, de Notto Gouye-Diama et zone de Kayar).

Encadrement: Personnel technique: 6 agents
Personnel contractuel: 22 permanents
Main d'oeuvre: en moyenne 60 personnes/8 mois par an.

Financement: Coûts locaux: Canada
Personnel: Fonds de contrepartie Canado-Sénégalais

Total financement: 580 millions de Frs CFA

Durée: 5 ans (septembre 1988 à septembre 1993)

BILAN CAMPAGNE 1989

I. PRODUCTION DE PLANTS

Type de pépinière	Nombre	Nombre de plants prévus	Nombre de plants produits	% d'exécution
Régis	4	400 000	557 864	111,57 %
Villageoises	8	10 000	20 400	204 %
Total	12	510 000	578 264	113,38

II. SITUATION DES PLANTATIONS

Type de plantation	Prévis.	Réalisation	% d'exécut.	% de réussite	Nbre. de plants mis en terre
Régie:					
- Dune secondaire	50 ha	60,63 ha	121,26%	65%	66 700
- Dune maritime	125 ha	131 ha	104,8 %	80%	144 100
- Regarnis	30 ha	2,7 ha	156,60%		3 000
- Axe routier		3,2 km	5%		800
Actions villageoises					
- Bois de village	10 ha	42,78 ha	427,8%		47 000
- Brise-vent	10 km	19,4 km			19 500
- Regarnis					
Total					281 100

III. SITUATION DE LA DISTRIBUTION DE PLANTS

Type de pépinière	Prévis. distribut.	Nbre. de plants distribués	% d'exécut.
Régie et villageoise	175 000	139 383	

BILAN CAMPAGNE 1990**I. PRODUCTION DE PLANTS**

Type de pépinière	Nombre	Nombre de plants prévus	Nbre. de plants produits	% d'exécution
Régies	3	500 000	513 477	102,60%
Villageoises	24	10 000	36 842	368,40%
Individuelles	0		0	
Total	27	510 000	550 319	107,90%

II. SITUATION DES PLANTATIONS

Type de plantation	Prévis.	Réalisation	% d'exécut.	% de réussite	Nbre. de plants mis en terre
Régie:					
- Dune secondaire	50 ha	57 ha	114%	65%	63 000
- Dune maritime	125 ha	193 ha	128,60%	80%	214 000
- Regarnis	30 ha	47 ha	156,60%		52 500
- Axe routier		3,2 km		5%	329
Actions villageoises					
- Bois de village	25 ha	32,8 ha	104,50%		
- Brise-vent	15 km	28,67 km	191,10%		28 531
- Regarnis		9,92 ha			5 820
Total			116,53%		390 128

III. SITUATION DE LA DISTRIBUTION DE PLANTS

Type de pépinière	Prévis. des distribut.	Nbre. de plants distribués	% d'exécut.
Régie et villageoise	175 000	107 900	61,65%

BILAN CAMPAGNE 1991

I. PRODUCTION DE PLANTS

Type de pépinière	Nombre	Nombre de plants prévus	Nbre. de plants produits	% d'exécution
Régies	3	400 000	454 489	113,6%
Villageoises	20	50 000	82 867	165,7%
Individuelles	6	41 739		
Total	29	450 000	579 095	128,6%

II. SITUATION DES PLANTATIONS

Type de plantation	Prévis.	Réalisation	% d'exécut.	% de réussite	Nbre. de plants mis en terre
Régie:					
- Dune secondaire	100 ha	101,95 ha	101,95%	80%	112 145
- Dune maritime	200 ha	203,5 ha	101,75%	95%	223 850
- Regarnis	50 ha	62 ha	124 %		68 380
- Axe routier	2,5 km	3 km	120 %	40%	3 785
Actions villageoises					
- Bois de village	40 ha	70,23 ha	175,5%		
- Brise-vent	15 km	11,41 km	76 %		10 472
- Regarnis		2,3 ha			2 564
Total			116,53%		421 196

III. SITUATION DE LA DISTRIBUTION DE PLANTS

Type de pépinière	Prévis. des distrib.	Nbre. de plants distribués	% d'exécut.
Régie et villageoise	50 000	125 693	251,38%

UNITE DE RECHERCHE COMMUNE DE CULTURE *IN VITRO* ISRA/ORSTOM CENTRE DE DAKAR BEL-AIR

La lutte contre la désertification, la satisfaction des besoins alimentaires, la promotion des espèces d'intérêt économique ou écologique, la préservation des ressources génétiques naturelles dans les milieux tropicaux fragiles ont motivé une réflexion méthodologique conjointe de l'ISRA et de l'ORSTOM. Celle-ci a abouti à la création d'une Unité de Recherche en Culture *In vitro* (URCI) de Dakar, chargée de mettre en oeuvre une démarche scientifique moderne face à ces problèmes.

La recherche d'un matériel végétal amélioré pour ses caractéristiques agronomiques ou forestières et adapté aux conditions édaphiques et climatiques régnant en zones sahéliennes et soudaniennes en est le fil conducteur. L'objectif est de fournir un matériel performant pour les opérations de reboisement.

Les espèces principalement étudiées sont non domestiquées. Elles présentent un polymorphisme génétique inconnu. Il est donc nécessaire, pour l'efficacité des programmes d'amélioration ultérieurs d'en gérer la variabilité.

C'est le but prioritaire que s'est fixé l'URCI, en développant les techniques de multiplication végétative classiques et les *vitrométhodes* adaptées aux ligneux fruitiers ou forestiers.

Une approche scientifique pragmatique

L'axe principal des programmes de l'URCI est de produire des clones d'arbres sélectionnés. Il comporte cinq étapes essentielles dont les modalités varieront selon l'espèce:

- la sélection en milieu naturel (1) et la mobilisation en pépinière des individus à cloner;
- le rajeunissement des sujets adultes par des méthodes de multiplication végétative classiques (2) (bouturage ou greffage en cascade...) et/ou *in-vitro* (culture de méristème, microgreffage...);
- la propagation végétative par micropropagation (3) en vue de constituer rapidement des populations homogènes importantes;
- l'acclimatation (4) des *vitroplants* en vue de leur implantation sur le terrain;
- les génotypes ainsi clonés (5), auront selon les espèces et les objectifs des programmes d'amélioration des destinées différentes: constitution de vergers à graines de clones produisant des semences améliorées, outils de recherche permettant de quantifier des interactions avec divers facteurs de l'environnement (test clonaux), une diffusion de variétés clonales peut être envisagée pour les fruitiers.

En complément à ce programme, l'URCI mettra en oeuvre, en cas de besoin, des actions de recherche d'accompagnement (biologie cellulaire ou biochimie...).

Une vocation de recherche et de formation au service du développement

Implanté dans le centre ORSTOM/ISRA de Bel-Air, l'URCI bénéficie d'un environnement scientifique favorable dû à la proximité de nombreux autres laboratoires travaillant dans le domaine végétal. Il collabore avec des instituts tels que l'Université Cheikh Anta Diop et le service des Eaux et Forêts. Cette richesse de partenaires permettra de poursuivre et de développer des programmes de recherche conjoints. Il doit ajouter aussi un rôle pilote au niveau régional et aura une triple vocation d'accueil de chercheurs étrangers, de programmes nouveaux, et d'encadrement de stagiaires en formation.

Fiche technique du laboratoire

architecte:	D.H. CORREA
entreprises:	CDE, AFRIBAT, STRADER
année de construction:	1991
financement:	Ministère de la Coopération française: 3,6 millions FF
superficie:	521 m ² dont 353 m ² de laboratoires
zone propre à atmosphère filtré:	326 m ³
zone stérile classe 100 norme US:	8 postes de travail

modules de culture *in-vitro*:

- capacité totale: 70 000 *vitro*plants
- 4 modules représentant 6 conditions climatiques indépendantes

paramètres climatiques contrôlés et programmables:

- température: +15 à +30°C ±0,25°C
- éclairage:
 - photopériodes diurne/nocturne réglables
 - 10 000 lux lumière du jour
 - rouges lointains indépendants
- hygrométrie réglable du niveau naturel à la saturation pour toute la gamme de températures

URCI résulte d'une coopération entre l'ISRA et l'ORSTOM en matière de culture *in-vitro* des plantes supérieures au service de la recherche et du développement.

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE ORSTOM

Les symbioses fixatrices d'azote tropicales peuvent jouer un rôle important dans le maintien et la régénération de la fertilité des sols, l'augmentation des productions agricoles et forestières des pays du sahel, et la lutte contre la dégradation importante de l'environnement en recolonisant les sols dégradés.

Les recherches menées au laboratoire de Microbiologie des sols ont pour objectif d'acquérir une meilleure connaissance du fonctionnement de deux systèmes symbiotiques qui jouent un rôle important dans l'agriculture et l'agroforesterie sahéliennes:

- Les *Acacia* fixateurs d'azote
- Les légumineuses à nodule de tige, *Sesbania rostrata* et *Aeschynomene*

Les travaux portent essentiellement sur:

- l'écologie des microorganismes symbiotiques
- l'étude des signaux bactériens
- l'étude des gènes de la bactérie et de la plante impliqués dans la nodulation de tige de *Sesbania rostrata*
- l'application en agriculture et en agroforesterie

Ces travaux mettent en oeuvre des techniques de rhizobiologie classiques, de biochimie et biologie moléculaire.

Ces recherches sont menées en collaboration, au niveau du Sénégal, avec les laboratoires d'écologie végétale, de physiologie et de génétique de l'ORSTOM, l'ISRA (DRPF et MIRCEN), l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar, les Eaux et Forêts et au niveau international avec le laboratoire ORSTOM/CTFT de Nogent sur Marne, l'INRA-CNRS de Toulouse, l'Institut Pasteur de Paris, les Universités de Lyon, de Gand et Cornell.

MOTION DE REMERCIEMENT AU GOUVERNEMENT SENEGALAIS

Considérant l'importance de la recherche scientifique, outil indispensable dans le processus du développement national; considérant l'intérêt particulier que le gouvernement sénégalais attache à la recherche scientifique en général et agronomique en particulier; notant les rapports de collaboration existant entre l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, l'ISRA, l'Université Cheikh Anta Diop et l'ORSTOM; les participants au séminaire international sur les Interactions Plantes Microorganismes organisé à Dakar du 17 au 22 février 1992 tiennent à exprimer à son Excellence le Président Abdou Diouf ainsi qu'au gouvernement de la République du Sénégal et à son peuple leurs remerciements pour l'accueil très chaleureux dont ils ont pu bénéficier durant leur séjour à Dakar.

Saisissant l'occasion qui leur est présentement offerte pour partager avec eux leur profonde certitude que la Science et la Technologie constituent un moteur indispensable pour le développement économique et social de l'Afrique au grand bonheur de nos populations.

Les Séminaristes

DISCOURS DE CLOTURE PRESENTE PAR DR M.M. SPENCER BARETTO

Du 17 au 22 février 1992 s'est tenu à Dakar un Séminaire intitulé "Interactions Plantes Microorganismes" organisé par la Fondation Internationale pour la Science, avec l'aide de l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM) et des contributions financières du Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale (CTA) ainsi que du Conseil Islamique pour l'Education et la Science (ISESCO). Le séminaire "Interactions Plantes Microorganismes" a réuni pendant une semaine 58 des chercheurs travaillant sur les aspects symbiotiques et parasitaires des relations plante - microorganisme, contribuant à l'information réciproque des scientifiques présents.

Il semble que la réunion des spécialistes de ces deux aspects est en soi exceptionnelle, tout du moins pour les programmes menés dans les pays en développement ou s'y rapportant. Les participants ont mis en évidence des similitudes au niveau des mécanismes d'interaction, des phytopathologistes ont appris de ceux qui travaillent sur la fixation d'azote et les mycorhizes et réciproquement. De telles rencontres sont donc à encourager.

Le Séminaire a été l'occasion de la remise du Prix "Sven Brohult", délivré tous les trois ans par la Fondation Internationale pour la Science à l'un de ses boursiers. Le Docteur Sanginga a reçu le prix pour ses travaux sur les arbres fixateurs d'azote.

Cinquante-deux communications ont été présentées, ce qui représente certainement une sorte de record pour un séminaire d'une semaine, qui comportait également des visites de terrain et une après midi pour des échanges de point de vue sur la recherche menée dans les conditions des pays en développement.

La visite de la matinée du mercredi 19 février a permis aux participants de se rendre compte du succès d'une application de travaux sur les symbioses à la protection du milieu naturel - la fixation des dunes du littoral par les *Casuarinas* inoculés par les actinomycètes et mycorhizes est un succès très important, peut-être la plus signifiante en Afrique. Cette visite était organisée par Mr Papa N'Diaye, Directeur du projet Protection du Littoral Sud. Les participants du Séminaire ont ensuite visité le Laboratoire de Microbiologie des Sols de l'ORSTOM, associé au MIRCEN, dans le cadre du Centre ISRA-ORSTOM de Bel Air, où des recherches sur les systèmes symbiotiques sont conduits sous la direction du Docteur Dreyfus. Ces travaux sur *Sesbania rostrata* ont apporté à ce laboratoire une renommée internationale. Dans ce laboratoire est installé un programme de l'ISRA qui s'intitule Centre de Ressources Microbiologiques (MIRCEN), programme dirigé par le Dr Mamadou Gueye. Enfin les séminaristes ont pu visiter, en avant première, la toute nouvelle unité de recherche commune de culture *in vitro* ISRA/ORSTOM qui dispose d'installations d'une technologie exceptionnelle, certainement unique en Afrique. Ce laboratoire de culture de tissus est destinée à la production de plants d'arbres sélectionnées pour des programmes de reboisement au Sénégal.

Le vendredi après midi a été consacré à un échange de vues, très libre, sur des thèmes choisis par les participants eux-mêmes. Ces discussions sont résumées dans ce document, les opinions émises n'engagent que leur auteurs, les organisateurs ayant choisi de reporter la diversité des opinions émises en soulignant si possible les points de vue sur lesquels un consensus s'est fait pour. Compte tenu du délai très bref entre ces discussions et la rédaction

du présent Compte rendu, les auteurs sollicitent l'indulgence pour les imperfections ou omissions éventuelles.

La discussion s'est organisée autour de quatre thèmes, bien évidemment très liés les uns aux autres. Le premier aspect concernait le choix des objectifs de la recherche, les priorités entre les objectifs et comment les définir, les utilisateurs de la recherche. Les participants tiennent tout d'abord à réaffirmer que la recherche pour être efficace ne peut être séparée entre recherche fondamentale et recherche appliquée. C'est le groupe des chercheurs fédéré autour d'un objectif finalisé, groupe qui comprend recherche de base et recherche appliquée, qui fait avancer vers les solutions, ainsi les recherches de base contribuant aux solutions pratiques. L'établissement d'un échéancier pour atteindre l'objectif fixé permettrait de fixer des limites à l'action de recherche et de mieux instruire les budgets et moyens à mobiliser. Chaque recherche devrait donc comporter une durée affichée pour chaque objectif fixée.

Le choix de l'objectif de la recherche doit tenir compte de la situation du pays en développement. Si les recherches visant à augmenter en *quantité* les productions vivrières doivent avoir la priorité dans de nombreux pays ou régions en Afrique, la recherche de la *qualité* des productions (en particulier pour les cultures d'exportation qui sont en concurrence internationale) est également un objectif important. Ces objectifs d'augmentation de la quantité ou de la qualité des productions agricoles doivent prendre en compte la protection ou la restauration du milieu rural.

Enfin dans cette discussion le problème du passage à l'application a été discuté. Dans certaines situations, il semble que les Organisations non gouvernementales (ONG) sont des structures très efficaces pour ce transfert aux utilisateurs paysans. Le deuxième point discuté était la pertinence de techniques de pointe, telles la biologie moléculaire ou la biotechnologie, dans les pays moins avancés où les problèmes de maintenance, de fourniture d'équipement, sont énormes. Il semble tout d'abord que la solution de problèmes concrets d'augmentation de la production tout en protégeant ou restaurant les milieux naturels suppose l'emploi du produit de ces techniques, qui sont des alternatives à l'utilisation de pesticides ou d'engrais. Le problème de leur mise en oeuvre dans les structures nationales de beaucoup de pays se pose alors immédiatement. Ces techniques sont très coûteuses et doivent être employées uniquement dans le cadre d'équipes importantes regroupant biochimistes, chimistes, généticiens etc...

Dans la plupart des cas seules des associations entre équipes des pays développés et pays en développement permettront de mettre en oeuvre ces techniques. D'autre part, ces recherches sont, dans les pays industrialisés, soutenus par un marché potentiel pour les produits de ces recherches, ce qui n'est pas le cas dans les pays en développement. Ceci est une illustration du fait que le développement de la production agricole n'est en fait possible que si les débouchés existent pour la production, c'est à dire si l'économie générale du pays ou de la région s'améliore en créant des clients solvables pour les productions. Dans les conditions actuelles des associations nord-sud entre équipes des pays où les techniques de biologie moléculaire sont rendues possibles par le contexte économique et les pays en développement semblent donc indispensables. Si des pôles d'excellences sont ainsi créés dans certains pays, leur ouverture vers les institutions de recherche des autres pays doit être assurée par des coopérations sud-sud.

Il convient néanmoins de souligner que bien des techniques, des technologies, des méthodologies évoquées, notamment celles relevant de la biologie moléculaire, ne sont pas nécessaires pour aborder de manière rationnelle les thèmes de recherche envisagés: dans de nombreux cas, une approche conventionnelle, bien structurée, est la plus souhaitable - et surtout la plus formatrice. Il est aussi nécessaire, en revanche, d'anticiper l'apparition de techniques simples, utilisables sur le terrain, dérivées des récents progrès en biologie moléculaire. Beaucoup d'espoirs se fondent sur l'utilisation de ces techniques.

Réseau/Collaborations Nord-Sud et Sud-Sud

- Il convient d'éviter la duplication des recherches dans les PVD, notamment grâce à l'établissement de réseaux.
- Il existe des programmes, notamment financés par la CEE, qui permettent de concentrer les efforts de recherche des PVD, sans duplication. Le Mandat de la FIS est différent, en ceci que l'on désire favoriser la diversité des approches et l'épanouissement individuel.
- Cependant, il serait utile que certains boursiers se réunissent autour de thèmes communs - par exemple sous l'égide d'un conseiller scientifique commun.
- Afin que de tels rassemblements soient facilités, il serait envisageable que le FIS établisse un "portfolio" de conseillers sur un certain nombre de domaines.

L'encadrement et le suivi du travail des chercheurs au début de leur carrière scientifique doit être amélioré, et une discussion concernant le cas des boursiers FIS a permis de faire des propositions qui seront examinées par le Secrétariat de la Fondation. L'objectif est de renforcer l'encadrement au moins lors de la première bourse de recherche de la FIS, à la fois pour l'avancement du travail et pour la rédaction de publications scientifiques.

En conclusion:

- Ce séminaire a permis de mettre - à nouveau - en évidence les énormes progrès accomplis dans le domaine de l'étude, de la gestion, et de la manipulation des interactions plantes - microorganismes, dans le contexte d'une agriculture plus productive et plus stable.
- Une illustration éclatante de ces progrès est constituée par le dispositif de recherche qui s'est développé au Sénégal, et par ses réalisations.
- Il demeure, néanmoins, que des écarts existent entre les moyens disponibles dans les PVD et dans les pays avancés pour la mise en oeuvre de ces technologies.
- La FIS, l'ORSTOM, le CTA et l'ISESCO contribuent, chacun à leur manière, à réduire ces écarts et à assurer les transferts et les échanges nécessaires pour un progrès soutenu de ces recherches et de leurs applications dans les PVD.
- Nous désirons, à nouveau, remercier les autorités sénégalaises pour leur accueil et leur soutien.

LISTE DES PARTICIPANTS

Dr Toudou ADAM
Département Production Végétales
Faculté d'Agronomie
Université de Niamey
BP 10.960
NIAMEY Niger

Mr El Bekkay BERRAHO
Laboratoire de Microbiologie
Faculté des Sciences
Université Mohammed V
BP 1014
RABAT Maroc

Dr Afolabi ADEBANJO
Department of Biological Sciences
Ogun State University
PM Box 2002
AGO-IWOKE Nigeria

Mr Alain BORGEL
Laboratoire de Génétique
ORSTOM
BP 1386
DAKAR Sénégal

Dr Denis S. AMARA
Department of Soil Science
Njala University College
Private Mail Bag
FREETOWN Sierra Leone

Mr Philippe DE LAJUDIE
Laboratoire de Microbiologie
ORSTOM
BP 1386
DAKAR Sénégal

Dr Mohammed BAAZIZ
Département de Biologie
Faculté des Sciences
Université Cadi Ayyad B P S 15
MARRAKECH Maroc

Mr Sekou DIABATE
Service de Phytopathologie
IRHO/CIRAD
Plantation Exp. Robert Michaux
BP 8
DABOU Côte d'Ivoire

Mr Jacques BALDENSPERGER
Secrétaire Scientifique
Fondation International
pour la Science - IFS
Grev Turegatan 19
114 38 STOCKHOLM Suède

Dr Ousmane DIAGNE
ISRA Direction des Recherches
sur les Productions Forestières
BP 2312
DAKAR Sénégal

Mme Elisabeth BENAMAR
Interprète de Conférence
26 rue Malivert
01630 ST GENIS
France

Mme Gnagna DIAGNE-LEYE
Département de Biologie Végétale
Faculté des Sciences
Université Cheikh Anta Diop
DAKAR Sénégal

Dr A.D. DIALLO
Programme Officer
ISESCO
BP 755
AGDAL RABAT Maroc

Dr Jean-Paul GEIGER
Laboratoire de Phytopathologie
Centre de Montpellier
ORSTOM
BP 5045
34032 MONTPELLIER Cedex France

Mr Tahir DIOP
Allocataire de Recherche
MIRCEN/ORSTOM
Laboratoire de Microbiologie
BP 1386
DAKAR Sénégal

Dr Vivienne GIANINAZZI-PEARSON
Station d'Amélioration des Plantes
INRA
BV 1540
21034 DIJON Cedex France

Dr Bernard DREYFUS
Laboratoire de Microbiologie ORSTOM
BP 1386
DAKAR Sénégal

Mme Betty GONDWE
Uyole Agricultural Centre
P O Box 400
MBEYA Tanzania

Prof Emile DUHOUX
Biotechnologie des Symbioses
Forestières Tropicales
ORSTOM/CTFT/CIRAD
45 bis Av. de la Belle Gabrielle
94736 NOGENT SUR MARNE France

Dr Mamadou GUEYE
MIRCEN Centre de Recherches
Agronomiques
ISRA
BP 53
BAMBEY Sénégal

Mlle Diana FERNANDEZ
Laboratoire de Phytopathologie
Centre de Montpellier
ORSTOM
BP 5045
34032 MONTPELLIER Cedex France

Mr T. HEULIN
Equipe d'Ecologie Microbienne
de la Rhizosphère
Centre de Pédologie CNRS BP 5
54501 VANDOEUVRE-LES-NANCY
France

Mme Tilly GAILLARD
Interprète de Conférence
25 Avenue du Maréchal DeLattre
92210 ST CLOUD France

Mr Temam HUSSEIN
Department of Plant Sciences
Alemaya University of Agriculture
P O B 138
DIRE DAWA Ethiopia

Mme Yaye ken GASSAMA DIA
Département de Biologie Végétale
Faculté des Sciences
Université Cheikh Anta Diop
DAKAR Sénégal

Dr Dirk INZE
Laboratorium voor Genetica
Universiteit Gent
K.L. Ledeganckstr. 35
9000 GENT Belgique

Mr Jean KUATE
Centre de Recherches Agronomiques de
Nkolbisson
BP 2067
YAOUNDE Cameroun

Dr Donatien N'ZALA
Institut de Développement Rural
Université Marien Ngouabi
BP 69
BRAZZAVILLE Congo

Mme Marianne LINDQVIST
Assistante, Fondation International pour la
Science - IFS
Grev Turegatan 19
114 38 STOCKHOLM Suède

Mr Papa NDIAYE
Directeur du Projet Conservation
du Litoral, Secteur Sud
Direction des Eaux et Forêts
BP 432
THIES Sénégal

Mr Maurice LOURD
Laboratoire de Phytopathologie
Centre de Montpellier
ORSTOM
BP 5045
34032 MONTPELLIER Cedex France

Mme Maymouna NDIR
Département de Biologie Végétale
Faculté des Sciences
Université Cheikh Anta Diop
DAKAR Sénégal

Dr Bjorn LUNDGREN
Land Use Consultant
Alvågen 1
182 45 ENEBYBERG Suède

Dr Ibrahima NDOYE
Direction des Affaires Scientifiques
et Techniques c/o ORSTOM
BP 1386
DAKAR Sénégal

Dr Casimir MAKAMBILA
Dép. Biologie Physiologie Végétale
Faculté des Sciences
Université Marien Ngouabi
BP 69
BRAZZAVILLE Congo

Mr Marc NEYRA
Laboratoire de Microbiologie ORSTOM
BP 1386
DAKAR Sénégal

Mr Alassa MOULIOM PEFOURA
Programme Banane
Institut de Recherche Agronomique
C.R.B.P. B P 13
NJOMBE Cameroun

Mr Michel NICOLE
ORSTOM/Forêts Canada
1055 du PEPS
Ste FOIX, Quebec
GIV 4 C7 Canada

Dr Francis MWAURA
Department of Botany
University of Nairobi
PO Box 30197
NAIROBI Kenya

Dr Nazaire NKOUKA
Secrétaire Scientifique Adjoint
Interafrican Phytosanitary Council
BP 4170 - Nlongkak
YAOUNDE Cameroun

Mr Elie NSIKA-MIKOKO
Laboratoire de Phytopathologie
Faculté des Sciences
Université Marien Ngouabi
BP 69
BRAZZAVILLE Congo

Dr Alphonso NWANKITI
Department of Crop Production
Faculty of Agriculture
Private Mail Bag 2373
MAKURDI Nigeria

Dr Martin I. NWUFO
School of Agriculture and
Agricultural Technology
Federal University of Technology
PMB 1526
OWERRI Nigeria

Mr D. N'ZALA
Institut de Développement Rural
Université Marien Ngouabi
BP 69
BRAZZAVILLE Congo

Mme Claribell OKOLI
Department of Crop Protection
Faculty of Agriculture
Ahmadu Bello University
ZARIA Nigeria

Dr Akim O. OSUNDE
Department of Soil Science
School of Agriculture
Federal University of Technology
PM Box 65
MINNA Nigeria

Dr Wayne POWELL
Head Cell & Molecular Genetic Dept.
Scottish Crop Research Institute
INVERGOWRIE DD2 5DA U.K.

Mme Florine RAVOLANIRINA
Ministère de la Recherche Scientifique
et Technologique pour le Développement
ANTANANARIVO 101 Madagascar

Mr Charles ROSENBERG
Laboratoire de Biologie Moléculaire
Relations Plantes-Microorganismes
CNRS/INRA BP 27
31326 CASTANET-TOLOSAN Cdx
France

Dr Mohammed SADIKI
Department of Agronomy Institut
Agronomique et Vétérinaire
Hassan II
BP 6202
RABAT INSTITUT Maroc

Dr Nteranya SANGINGA
Coordinateur Adjoint AFNETA
International Institute of Tropical
Agriculture - IITA
PO Box 5320 Oyo Road
IBADAN Nigeria

Dr Philippe SANKARA
Institut Supérieur Polytechnique
Université de Ouagadougou
03 BP 7021
OUAGADOUGOU 03 Burkina Faso

Dr Serge SAVARY
ORSTOM Visiting Scientist
Division of Plant Pathology
IRRI PO Box 933
1099 MANILA Philippines

Mr My Hassan SEDRA
Laboratoire de Phytopathologie
Centre Régional du Haouz-présahara
INRA BP 533
MARRAKECH Maroc

Dr Pascal SIMONET
Laboratoire de Biologie des Sols
Ecologie Microbienne UA 697
Université Claude Bernard Lyon I
43 Bd. du 11 Novembre 1918
69622 VILLEURBANNE Cdx France

Dr Marie M. SPENCER-BARRETO
Département de Biologie Végétale
Faculté des Sciences
Université Cheikh Anta Diop
DAKAR Sénégal

Mr Didier SPIRE
Station de Pathologie Végétale
INRA
Route de Saint-Cyr
78026 VERSAILLES Cedex France

Mr Mame-Ourèye SY
Département de Biologie Végétale
Faculté des Sciences
Université Cheikh Anta Diop
DAKAR Sénégal

Mr Kodjo TOMEKPE
Laboratoire de Microbiologie
ORSTOM
BP 1386
DAKAR Sénégal

Mr Michel VALES
Laboratoire de Phytopathologie
Institut des Savanes
BP 125 - 04
BOUAKE 04 Côte d'Ivoire

Dr Raymond S. VODOUHE
Programme de Recherche Rizicole
BP 226
BOHICON Bénin

Mme Judy WOLF
Responsable d'Édition
Siesmayerstrasse 62
6000 FRANKFURT a.M. 1 Germany

Prof Ronald K.S. WOOD
Department of Biology
Imperial College of Science
and Technology
Prince Consort Road
LONDON SW7 2BB U.K.