

50376  
1971  
92

50376  
1971  
92

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

# THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir

le grade de Docteur-Ingénieur

par

Jean-Marie DELATTRE



INTRODUCTION A UNE ETUDE GENETIQUE

DU GENRE RHIZOBIUM

Membres du Jury : MM. R. BOURIQUET, Président  
J. GUILLAUME, Rapporteur  
G. MARTIN, Examineur  
B. MONTUELLE, Examineur  
P. MANIL, Membre invité



030 032804 3

Soutenu le 28 Octobre 1971

Ce travail a été effectué dans les Laboratoires de Microbiologie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I et de l'Equipe de Recherche Associée au C.N.R.S. n° 275 à l'Institut Pasteur de Lille.

Je tiens à exprimer ici mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur J. GUILLAUME qui les dirige. Il m'y a accueilli et m'a permis de commencer l'étude d'un genre bactérien nouveau dans ces laboratoires. Je dois aussi à Monsieur GUILLAUME de nombreux conseils pour l'orientation de cette recherche, de fructueuses discussions au cours des expérimentations et une aide précieuse pour l'élaboration du texte de cette thèse.

Je tiens à remercier également Monsieur R. BLONDEAU qui, avec une patience sans limite, a guidé mes premiers pas dans l'Université et, pendant ces deux années, m'a donné de nombreux et utiles conseils techniques et scientifiques.

Je voudrais encore exprimer ici mes remerciements à la Direction et au Corps Enseignant de l'Institut Supérieur d'Agriculture de Lille, qui m'ont donné pendant quatre années l'exemple de la rigueur scientifique et de la curiosité pour les choses de la nature.

Je voudrais aussi remercier ma femme de son soutien constant, de son aide et de ses suggestions et critiques. Je lui dédie ce travail qui a été notre souci commun depuis près de deux ans.

Enfin et surtout, je tiens à remercier mes parents de leurs encouragements et des sacrifices consentis pour mes études. Que cette thèse leur soit un témoignage de ma profonde gratitude.

## S O M M A I R E

	page
<u>AVANT PROPOS</u> .....	1
<u>NOTE PRELIMINAIRE</u> .....	3
1 - <u>C H A P I T R E 1 : HISTORIQUE</u> .....	4
1. LE GENRE <u>RHIZOBIUM</u> , DECOUVERTE, SYNONYMES .....	4
2. GROUPE D'INOCULATION .....	6
1. DEFINITION .....	6
2. DEFAUTS DE LA CLASSIFICATION EN GROUPE D'INOCULATION .....	7
3. CRITERES MODERNES DE CLASSIFICATION .....	12
1. FLAGELLATION .....	12
2. ACIDIFICATION, RESISTANCE AU pH .....	13
3. HYPOTHESES SUR L'ORIGINE DES DEUX GROUPE DE <u>RHIZOBIUM</u> .....	13
4. GROUPE SEROLOGIQUES .....	15
5. GROUPE LYSOTYPIQUES .....	16
6. AUTRES PROPRIETES .....	18
7. ANALYSES NUMERIQUES .....	19
8. SIMILITUDE DES ADN .....	20
9. RELATION AVEC <u>AGROBACTERIUM</u> .....	21
4. PROPOSITIONS MODERNES POUR LA SYSTEMATIQUE DES <u>RHIZOBIUM</u> ET <u>RHIZOBIACEAE</u> .....	24
2 - <u>C H A P I T R E 2 : ETUDE SYSTEMATIQUE DES SOUCHES</u> .....	28
1. ISOLEMENT DES SOUCHES .....	29
2. EXAMEN DES PROPRIETES SYMBIOTIQUES DES SOUCHES .....	31
1. PRINCIPE .....	31
2. METHODE .....	31

1. MILIEUX ET MATERIEL .....	31
2. DESINFECTION DES GRAINES .....	35
3. PREGERMINATION, PLANTATION .....	36
4. INOCULATION .....	36
5. TEMPERATURE ET ECLAIREMENT .....	36
3. RESULTATS .....	37
4. DISCUSSION .....	40
1. CHOIX DE L'ESPECE HOTE .....	41
2. INFLUENCE DU TAUX D'AZOTE COMBINE ET DU VOLUME DE MILIEU .....	42
3. INFLUENCE DE L'ECLAIREMENT .....	43
4. INFLUENCE DU CALCIUM .....	44
3. EXAMEN DES CARACTERES BACTERIOLOGIQUES DES SOUCHES .....	45
1. METHODES .....	46
1. MORPHOLOGIE .....	46
2. ASPECT DES COLONIES .....	46
3. AEROBIOSE .....	46
4. ACIDE $\beta$ -INDOLYL ACTEIQUE.....	47
5. UTILISATION DES CITRATES .....	48
6. CYTOCHROME-OXYDASE .....	49
7. GELATINASE .....	49
8. MOBILITE .....	49
9. REDUCTION DES NITRATES .....	49
10. OXYDATION-FERMENTATION .....	50
11. ROUGE CONGO .....	50
12. DEGRADATION DES SUCRES .....	51
13. TEMPERATURE DE CROISSANCE .....	51
14. UREASE .....	52
2. RESULTATS .....	52
3. DISCUSSION .....	63
4. CONCLUSION .....	68

3 - <u>C H A P I T R E 3 : P H Y S I O L O G I E</u> .....	70
1. ENTRETIEN DES SOUCHES .....	70
2. MILIEU COMPLET .....	71
1. INFLUENCE DES SELS MINERAUX .....	71
2. INFLUENCE DE LA SOURCE DE CARBONE .....	74
3. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DE L'AERATION .....	74
1. TEMPERATURE .....	74
2. AERATION .....	75
3. CROISSANCE SUR MILIEU COMPLET. RELATION AVEC LA DENSITE OPTIQUE .	75
4. SOURCES ET TAUX D'AZOTE .....	78
5. MILIEUX SYNTHETIQUES ET MINIMUM .....	88
1. SOURCE D'AZOTE .....	88
2. EXIGENCES EN VITAMINES DE LA SOUCHE T 1 S ( <u>R. TRIFOLII</u> ) .....	91
3. EXIGENCES EN VITAMINES DE LA SOUCHE 1-99 ( <u>R. LUPINI</u> ) .....	92
4. EXIGENCES EN VITAMINES DE LA SOUCHE M5 N1 ( <u>R. MELILOTTI</u> ) .....	94
5. EXIGENCES EN VITAMINES DES AUTRES SOUCHES .....	96
4 - <u>C H A P I T R E 4 : O B T E N T I O N D E M U T A N T S</u> .....	99
1. MUTANTS RESISTANTS AUX ANTIBIOTIQUES ET ANTIMETABOLITES .....	101
1. MUTANTS RESISTANTS A LA STREPTOMYCINE .....	101
1. TECHNIQUES .....	102
2. RESULTATS ET DISCUSSION .....	103
2. MUTANTS RESISTANTS A D'AUTRES ANTIBIOTIQUES .....	104
3. RESISTANCE AUX ANTIMETABOLITES ET ACIDES AMINES .....	106
2. MUTANTS NON MUQUEUX .....	109
1. HISTORIQUE ET METHODES .....	109
2. RESULTATS .....	112
1. METHODES DIVERSES .....	114
2. REPIQUAGES EN MILIEUX LIQUIDES .....	115
3. SELECTION DE MUTANTS GALACTOSE NEGATIFS .....	116
4. ACTION DES BACTERIOPHAGES .....	119
3. DISCUSSION .....	121

3. MUTANTS PIGMENTES .....	125
1. HISTORIQUE .....	125
2. METHODES .....	127
3. RESULTATS .....	127
4. DISCUSSION .....	129
4. MUTANTS AUXOTROPHES .....	133
1. HISTORIQUE .....	133
2. METHODES .....	135
1. AGENTS MUTAGENES .....	135
1. RAYONS ULTRA VIOLETS .....	135
2. NITROSOGUANIDINE .....	136
3. ACIDE NITREUX .....	138
4. 2-AMINOPURINE .....	138
2. METHODES D'ENRICHISSEMENT .....	138
1. PENICILLINE .....	138
2. AMINOPTERINE .....	139
3. ANALYSE DES EXIGENCES .....	140
3. RESULTATS .....	140
1. SOUCHE 1-99 ( <u>R. LUPINI</u> ) .....	140
2. SOUCHES DE TREFLE .....	141
3. SOUCHE M5 N1 .....	142
4. AUTRES SOUCHES.....	142
4. DISCUSSION .....	143
5. MUTANTS FORMANT DES ETOILES .....	144
6. DISCUSSION .....	150
 <u>C O N C L U S I O N</u> .....	154
 <u>B I B L I O G R A P H I E</u> .....	157

## AVANT PROPOS

L'association Rhizobium-Légumineuses est souvent prise comme exemple type de symbiose. Outre son intérêt agronomique, cette symbiose offre aux généticiens la possibilité d'étudier l'un par rapport à l'autre, le génome d'une plante et celui d'une bactérie.

Néanmoins, si l'infection, la formation du nodule, la fixation de l'azote et la spécificité ont été presque entièrement décrites, on connaît encore peu de choses sur les mécanismes moléculaires de ces processus et sur l'origine, microbienne ou végétale, des gènes qui les gouvernent.

D'autre part, on sait qu'il est possible d'étudier les Rhizobium par transformation, transduction et conjugaison. Comme on connaît peu de genres bactériens capables de présenter à la fois ces trois phénomènes, leur génétique demanderait à être étudiée pour elle-même. La conjugaison des Rhizobium, qui semble différer notablement de celle d'Escherichia coli, nécessiterait également une étude approfondie.

Enfin, ces propriétés mériteraient encore plus d'attention si elles permettaient d'étudier les propriétés symbiotiques des Rhizobium et, par là, de comprendre les mécanismes de l'établissement et du fonctionnement de la symbiose. Or aucun caractère n'ayant jusqu'ici été mis en relation avec les propriétés symbiotiques, il semble que l'obtention de mutants de Rhizobium et leur étude par les moyens de la génétique, soit un des moyens (sinon le seul), d'étudier les déterminants de la symbiose.

Le but de l'étude commencée avec ce travail est donc de chercher des relations entre mutations et propriétés symbiotiques chez les Rhizobium.

Les Rhizobium sont définis uniquement par leur capacité de former, en association avec des légumineuses, des nodules qui sont le siège de la fixation symbiotique d'azote. Néanmoins, dans ce travail où nous avons voulu faire varier les propriétés symbiotiques des microorganismes, est bientôt apparue la nécessité de fonder leur détermination sur d'autres critères.

C'est pourquoi, après l'étude des propriétés symbiotiques des souches isolées, nous avons essayé de mettre au point une batterie de tests biochimiques pour l'identification des Rhizobium.

Enfin, avant l'étude des mutations, nous avons rapporté dans un chapitre intitulé "PHYSIOLOGIE", les notions relatives à la croissance, aux milieux de culture et exigences métaboliques nécessaires pour les expériences de génétique décrites au chapitre 4.

NOTE PRELIMINAIRE

Dans la littérature concernant l'association Rhizobium-légumineuse, l'usage a consacré l'emploi de certains termes peu orthodoxes, généralement dérivés de l'anglais. Nous donnons ci-dessous la liste et la signification de ces termes. Le lecteur voudra bien nous pardonner d'avoir préféré les néologismes aux périphrases.

- Infectivité : capacité des Rhizobium d'infecter les racines de certaines légumineuses et d'y provoquer l'apparition de nodules.
- Efficience : qualité de l'association Rhizobium-légumineuses qui aboutit à la fixation de l'azote moléculaire. Par extension : qualité d'une souche de Rhizobium capable d'induire une telle association.
- Efficient : doué d'efficience.
- Inefficent: qui n'est pas doué d'efficience.
- Noduler : v. tr : (pour un Rhizobium) provoquer l'apparition de nodules sur les racines (de telle légumineuse).  
v. i. : (pour une légumineuse) former des nodules radiculaires, sous l'influence d'un Rhizobium.
- Nodulant: capable de noduler.
- Anodulant: incapable de noduler.

HISTORIQUE

Dès la découverte des Rhizobium, se sont posés des problèmes de nomenclature et de classification. La systématique du genre en vigueur actuellement est fondée sur les groupes d'inoculation. Cette classification présente de nombreux défauts et elle fait place progressivement à des classifications incluant d'autres caractères : flagellation, groupes sérologiques et lysotypiques, composition de l'ADN, propriétés physiologiques diverses. Ces classifications remettent en question l'unité et la position systématique du genre Rhizobium et de la famille des Rhizobiaceae, ainsi que les relations de parenté dans cette famille.

Tous ces points sont abordés dans le chapitre 1, non pour leur intérêt académique, mais dans le but de faciliter une identification exacte, fondée sur des critères sûrs, du genre Rhizobium et de ses espèces.

1.1. - LE GENRE RHIZOBIUM, DECOUVERTE, SYNONYMES

On sait (RADULOVIC, 1966, 1) que la valeur améliorante des légumineuses en pratique agricole et la présence de nodosités sur leurs racines, étaient déjà connues des Romains. Mais la fonction de ces nodules a été discutée jusqu'en 1886, date à laquelle HELLRIEGEL et WILFARTH ont établi que les légumineuses, grâce à leurs nodosités,

étaient les seules plantes à pouvoir assimiler l'azote atmosphérique.

La présence de microorganismes dans les nodules avait déjà été décelée par LACHMAN en 1858, WORONIN en 1866 et ERIKSON en 1873 et une relation symbiotique suggérée entre ceux-ci et la plante par DE BARY en 1878 et SCHINDLER en 1885 (RADULOVIC, 1966, 2).

La nature bactérienne de ces microorganismes a enfin été établie par BEIJERINCK, 1888 (3) qui en fit le premier des cultures pures.

Des noms de champignons : Schinzia (FRANK, 1877, 4), Phytomyxa (SCHRÖTER, 1886, 5) avaient été proposés avant l'isolement du microsymbionte par BEIJERINCK qui proposa lui, le nom de Bacillus. L'application de ce nom ayant ensuite été restreinte à des bacilles sporulés, c'est le nom de Rhizobium, proposé par FRANK (1889, 6) qui prévalut. FRANK pensant dénommer ainsi un champignon et non une bactérie, différents autres noms furent ensuite proposés :

Bacterium, (PRAZMOWSKI, 1890, 7)

Pseudomonas (MOORE, 1905, 8)

Rhizomonas (ORLA-JENSEN, 1909, 9)

Micrococcus (GONNERMAN, 1894, 10)

Rhizobacterium (KIRCHNER, 1895, 11 ; TESIC et TODOROVIC, 1963, 12) pro parte

Rhizobiomonas (TESIC et TODOROVIC, 1963, 13) pro parte

Phytomyxa (GRAHAM, 1964, 14 ; MOFFLET et COLWELL, 1968, 15) pro parte

Ces noms divers ont été proposés pour rappeler une propriété caractéristique des souches étudiées par les différents auteurs ou même d'un stade de leur développement. Mais les caractéristiques qui servent généralement de base à la classification des bactéries (flagellation, forme coccoïde ou bacillaire, etc...) sont très variables chez les symbiotes des légumineuses. Aussi, aucun nom ne représentait-il le genre entier et n'a supplanté celui de Rhizobium.

## 1.2. - GROUPES D'INOCULATION

Dès l'isolement des Rhizobium, certains auteurs ont proposé de scinder le genre en plusieurs espèces (SCHRÖTER, 1886, 16) (KIRCHNER, 1895, 17) (HILTNER et STÖRMER, 1903, 18) (ORLA-JEN EN, 1909, 19) (LÖHNIS et HANSEN, 1921, 20), alors que d'autres (BEIJERINCK, 1888, 21) (FRANK, 1889, 22) (FRAZMOWSKI, 1890, 23) (SCHNEIDER, 1892, 24) (MOORE, 1905, 25) ne voyaient qu'une espèce chez Rhizobium, avec toutefois plusieurs variétés.

### 1.2.1. - DEFINITION

Toutefois une autre conception, basée sur la spécificité d'hôte, se fit jour à la suite des travaux de BURRIL et HANSEN, 1917 (26). Ces auteurs ont été les premiers à diviser le genre Rhizobium en "groupes d'inoculation croisée" ou groupes de souches capables d'infecter le même éventail d'hôtes. Ainsi, pour le groupe des Trèfles et le groupe Rhizobium trifolii, la symbiose peut s'établir entre un Trèfle quelconque (à l'exclusion de toute autre plante) et une souche quelconque isolée de Trèfle (et de Trèfle seulement). De même la possibilité qu'ont les souches isolées de Medicago, Melilotus et Trigonella et celles-là seules, d'infecter indistinctement ces plantes et celles-là seules, définit le groupe végétal "Luzerne-Mélilot-Trigonelle" et le groupe bactérien : R. meliloti. Parce qu'elle supprimait la controverse sur l'identification par les méthodes classiques, cette conception a été développée par de nombreux auteurs :

MÜLLER et STAPP (1925, 27), WALKER (1928, 28), ISRAILSKY (1929, 29),

BALDWIN et FRED (1929, 30), FRED, BALDWIN et Mc COY (1932, 31), ALLEN et ALLEN (1947, 32), KRASSILNIKOV (1949-1959, 33), ALLEN et ALLEN (1950, 34), FEDOROV et SVITYC (1954, 35), ALLEN et BALDWIN (1954, 36), LANGE (1966, 37) DOROSINSKY et LAZAREVA (1966, 38) etc...

Les groupes d'inoculation ont reçu le "statut d'espèces" (FRED, BALDWIN et Mc COY, 1932, 39) et la classification proposée dans le Bergey's Manual of Determinative Microbiology, 7e édition, (1957, 40) est actuellement basée sur une division en six groupes, pour l'identification desquels quelques caractères morphologiques ou physiologiques, d'ailleurs totalement insuffisants, ont été ajoutés. Ces groupes sont :

<u>R. trifolii</u>	DANGEARD, 1926	<u>Trifolium</u> (Trèfle)
<u>R. Leguminosarum</u>	FRANK, 1890	<u>Pisum</u> (Pois) <u>Vicia</u> (Vesce) <u>Lens</u> (Lentille) <u>Lathyrus</u> (Ges) <u>Faba</u> (Fève)...
<u>R. phaseoli</u>	DANGEARD, 1926	<u>Phaseolus</u> (Haricot) <u>pro parte</u>
<u>R. meliloti</u>	DANGEARD, 1926	<u>Medicago</u> (Luzerne) <u>Melilotus</u> (Mélilot) <u>Trigonella</u> (Trigonel)
<u>R. Lupini</u>	SCHRÖTER, 1886	<u>Lupinus</u> (Lupin) <u>Ornithopus</u> (Ornithope)
<u>R. japonicum</u>	KIRCHNER, 1895	<u>Glycine</u> (Soja)

#### 1.2.2. - DEFAUTS DE LA CLASSIFICATION EN GROUPES D'INOCULATION

Malgré le grand développement qu'elle a connu, cette classification en groupes d'inoculation présente de nombreux défauts passés inaperçus lors des premières recherches :

- Les Rhizobium de certaines plantes n'entrent en symbiose avec aucune plante des six groupes cités dans le Bergey's. C'est qu'en fait,

seuls ces six groupes ont reçu le "statut d'espèce", alors qu'un nombre bien plus élevé avait été proposé : seize par FRED, BALDWIN et Mc COY (1932, 41).

Il est vrai que certains "groupes" ne comprennent qu'une espèce végétale et qu'il aurait été difficile d'admettre autant d'espèces de Rhizobium que de tels "groupes". Néanmoins, un groupe généralement admis, le "Cowpea group" (\*) mériterait aussi le statut d'espèce. Il comprend en effet les Rhizobium de toutes les Mimosacées, de toutes les Césalpinacées et de la grande majorité des Papilionacées, en particulier des espèces tropicales, pour lesquelles la présence de nodules était notée en 1956 par NORRIS (42).

- Dans certains groupes et probablement tous, il n'y a pas "réciprocité". Ainsi dans le groupe "phaseoli" une souche isolée de Albizzia julibrissin Biov. provoque l'apparition de nodules sur Phaseolus vulgaris L. alors que les souches isolées de P. vulgaris n'entrent pas en symbiose avec A. julibrissin (WILSON, 1944, 43).

Dans un article intitulé "Over five hundred reasons for abandoning the cross-inoculation groups", cet auteur rapporte 146 cas semblables de non-réciprocité. Des observations semblables ont été faites par d'autres auteurs : SEARS et CLARK, 1930 (44), AQUINO et MADAMBA, 1940 (45), WILSON, 1939a (46).

- Certaines plantes forment des nodules sous l'influence de souches appartenant à plusieurs groupes. Ainsi Lotus corniculatus L. peut être infecté par des souches appartenant à neuf groupes (WILSON, 1939a, 47 ; 1939b, 48 ; 1939c, 49 ; 1939d, 50 ; 1944, 51). Cet auteur cite de nombreux cas où les groupes bactériens ne s'excluent pas. KLECKOWSKI et THORNTON, 1944 (52), KLECKOWSKA, NUTMAN et BOND, 1944, (53),

(\*) Cowpea (Vigna sinensis Endl. ex. Hassko) (Phaseolus Riccardianus Hort.): légumineuse tropicale (Dolique).

GRAHAM, 1963c (54) ont également noté des cas d'infection croisée entre Rhizobium et plantes des groupes : Trèfle, Pois, Haricot, Luzerne.

- Certaines souches infectent des plantes appartenant à différents groupes. Ainsi sur 85 souches isolées de 83 espèces végétales en Australie par LANGE, 1961 (55), 45 entraient dans quatre groupes, 31 dans trois groupes, 6 dans deux groupes et 3 souches seulement n'entraient que dans un groupe. De tels cas où les groupes végétaux ne s'excluent pas avaient déjà été cités par CONKLIN, 1936 (56) et en grand nombre par WILSON, 1944 (57).

- De certaines espèces végétales, on peut isoler plusieurs souches ayant des spectres d'hôtes très différents. Il en est ainsi pour les souches isolées de Caragana arborescens L. (GREGORY et ALLEN, 1953, 58). D'autres cas ont été rapportés (ALLEN et ALLEN, 1936, 59) où il n'y a pas homogénéité dans le comportement symbiotique des diverses souches isolées de la même espèce végétale.

- Certains auteurs définissent le groupe d'inoculation comme un ensemble de plantes, d'autres comme un ensemble de souches de Rhizobium. Or, compte tenu des incongruités citées plus haut, ces notions ne se correspondent pas, ce qui prête à confusion.

- Même dans les groupes les mieux délimités, certaines espèces végétales ont un comportement exceptionnel. Ainsi Trifolium subterraneum L. est résistant à l'infection par les Rhizobium qui, infectant tous les autres Trèfles, sont nommés R. trifolii. De même pour Medicago laciniata L. Mill. (BAIRD, 1955, 60). 133 espèces sur 1200 examinées en 1956 (NORRIS, 61) sont connues pour ne jamais porter de nodules.

- A cause des cas de non-réciprocité, il a parfois été admis que les souches capables d'infecter une même espèce-test faisaient partie

du même groupe, mais l'arbitraire des groupes d'inoculation s'en est trouvé encore accru, le choix de l'espèce-test étant souvent discutable. Ainsi, pour le "Cowpea group", la plante-test (Vigna sinensis) est infectée par certaines souches isolées du Soja (LEONARD, 1923, 62).

De plus, à mesure que les recherches progressent, on découvre des plantes dont le spectre est plus large que celui de l'espèce de référence et qui seraient donc plus "représentatives" du groupe. Ainsi Crotalaria grantiana L. a une spécificité moins étroite que Vigna sinensis dans le "Cowpea group" (WILSON, 1939c, 63).

- Les groupes les mieux définis (Trèfle ; Luzerne ; Pois-Vesce-Lentille ; Haricot) sont les mieux étudiés parce qu'ils comprennent des espèces des régions tempérées. Mais selon NORRIS (1956, 64) "(they) represent an evolutionary cul-de-sac, and (are) atypical of the majority of Leguminosae". Les trois espèces R. trifolii, R. meliloti et R. leguminosarum infectent seulement 12 des genres de légumineuses porteuses de nodules dénombrées en 1954 (ALLEN et BALDWIN, 65).

Selon NORRIS (ibid.) le "Cowpea group", bien que n'ayant pas le "statut d'espèce", représente l'archétype du genre Rhizobium, adapté aux légumineuses les plus anciennes et surtout les plus nombreuses.

- Les études d'inoculation croisée ne portent encore que sur un petit nombre de légumineuses : 1000 tout au plus sur plus de 11.000 espèces connues (ALLEN et BALDWIN, 1954, 66).

- Certaines souches forment des quantités variables de nodules selon l'hôte considéré et certains ont pensé devoir tenir compte du taux de nodulation (LEONARD, 1923, 67).

D'autres ont fait des sous-groupes tenant compte de l'efficacité, séparant ainsi les souches dont la symbiose avec une plante aboutit à la

fixation d'azote, de celles qui provoquent une nodulation inefficace chez la même plante (ALLEN et ALLEN, 1936, 68) (VINCENT, 1954, 69) (BROCKWELL et HELY, 1966, 70).

- Des souches de Rhizobium ont perdu par mutation tout ou partie de leurs propriétés symbiotiques : efficacité ou même nodulation, vis-à-vis d'une espèce végétale ou de toute légumineuse (SCHWINGHAMER, 1962, 71) et il existe des souches mutantes dont les propriétés symbiotiques ne s'expriment que dans certaines conditions (SCHWINGHAMER, 1970, 72). Il existe d'autre part des lignées de plantes mutantes, résistantes à l'infection (HUBBEL et ELKAN, 1967, 73) (NUTMAN, 1969, 74).

- D'un point de vue pratique, la détermination d'une souche par cette méthode d'inoculation croisée requiert un stock de graines les plus diverses, un temps assez long et la connaissance des conditions de culture, très variables d'une plante à l'autre, et des conditions, variables également, dans lesquelles la souche est infectieuse.

- Enfin, et surtout, cette classification ne tient pas compte d'autres critères importants, à savoir : morphologie, physiologie, sérologie, lysotypie, homologie d'ADN, etc...

Toutes ces raisons expliquent que les groupes d'inoculation, après avoir été maintes fois remaniés et multipliés (jusqu'à 22, d'après WILSON, 1944, 75) soient maintenant très controversés et que d'autres classifications soient proposées.

### 1.3. - CRITERES MODERNES DE CLASSIFICATION

Dès 1921, LÖHNIS et HANSEN (76) avaient séparé les Rhizobium en deux groupes : souches à croissance lente et souches à croissance rapide. Cette distinction, sans avoir jamais eu valeur de classification, est très importante car de nombreuses propriétés des Rhizobium lui sont liées. Cette distinction se réfère au temps de génération (G) en croissance exponentielle : sur milieux glucosé : G = 3,21 h pour les souches de Luzerne  
G = 6,09 h pour les souches de Soja.

(d'après WALKER, ANDERSON et BROWN, 1932, 77)

#### 1.3.1. - FLAGELLATION

Des nombreuses études contradictoires sur la flagellation des Rhizobium, il ressort que les deux types de flagellation (mono et péritriche) existent mais que les souches à croissance lente sont monotriches (subpolaires) tandis que celles à croissance rapide sont péritriches (HANSEN, 1919, 78) (LÖHNIS et HANSEN, 1921, 79) (SHUNK, 1921, 80) (MÜLLER et STAPP, 1925, 81) (LEIFSON et ERDMAN, 1958, 82) (DE LEY et RASSEL, 1965, 83). Mais chez les souches à croissance rapide le nombre de flagelles est parfois faible : 3, 4, 5 ; généralement un des flagelles est subpolaire; les autres sont fragiles.

On observe généralement chez les péritriches une forte proportion de cellules à flagelle unique, subpolaire, les autres ayant cassé (DE LEY et RASSEL, 1965, 84), ce qui expliquerait (DE LEY et RASSEL, 1965, 84) que KRASSILNIKOV, 1959 (85) n'ait vu que des flagelles polaires.

### 1.3.2. - ACIDIFICATION, RESISTANCE AU pH

D'autre part, NORRIS (1965, 86), étudiant la croissance de 717 souches sur milieu avec mannitol et extrait de levure, observe que celles à croissance rapide acidifient le milieu tandis que les autres l'alcalinisent.

En présence de glucose, l'acidification est plus générale, mais la différence entre les deux groupes précédents a été également observée (GEORGI et ETTINGER, 1941, 87) (GOSTKOWSKA, 1966, 88).

Il est également établi (FRED et DAVENPORT, 1918, 89) que chez les Rhizobium, à la différence des autres groupes bactériens (Lactobacillaceae), les souches acidifiantes sont sensibles aux pH bas et inversement.

### 1.3.3. - HYPOTHESES SUR L'ORIGINE DES DEUX GROUPES DE RHIZOBIUM

NORRIS (1956, 90) reprenant les idées de MAZE (1899, 91) a proposé de distinguer deux groupes de Rhizobium :

- ceux associés aux légumineuses des terrains pauvres, acides, généralement tropicaux,
- ceux des légumineuses calcicoles, tempérées.

Pour expliquer que cette distinction coïncide avec la classification fondée sur la vitesse de croissance, NORRIS (1965, 92) propose :

- a) qu'il existait primitivement un groupe de Rhizobium adapté à la symbiose avec les légumineuses de type "ancestral", vivant en sols acides, pauvres en calcium,

b) que leur métabolisme alcalinisant était adapté à la survie à pH bas,  
 c) que ces Rhizobium, monotriches, alcalinisants, avaient une spécificité individuelle lâche (WALKER et BROWN, 1935, 93) (BUSHNELL et SARLES, 1939, 94) (LANGE, 1961, 95), parce que le type de pollinisation croisée de ces légumineuses, les rendaient génétiquement peu stables,

d) qu'à mesure que des tribus de légumineuses se sont adaptées aux terres calcaires, neutres ou alcalines, apparues au Crétacé, il soit apparu des Rhizobium acidifiants, mieux adaptés aux sols basiques et secondairement plus sensibles aux pH bas,

e) qu'ayant un métabolisme acidifiant, ils aient une croissance plus rapide,

f) qu'étant les seuls à avoir évolué vers les zones de pH élevées, ils soient les seuls à infecter les légumineuses calcicoles,

g) que ce groupe "moderne" ait gardé des caractères "ancestraux" :  
 - un flagelle subpolaire en plus d'autres (de nature différente, plus fragiles),  
 - la possibilité d'infecter des légumineuses "ancestrales" du groupe de Vigna sinensis par exemple, faits souvent notés comme contradictoires de la classification en groupes d'inoculation (WILSON, 1917, 96) (FRED et DAVENPORT, 1918, 97) (LÖHNIS et HANSEN, 1921, 98) (SHUNK, 1921, 99) (MÜLLER et STAPP, 1925, 100) (WILSON, 1939b, 101 ; 1944, 102) (LEIFSON et ERDMAN, 1958, 103) (DE LEY et RASSEL, 1965, 104).

h) que la spécificité des groupes "modernes" de Rhizobium puisse être plus étroite, leurs hôtes étant plus stables de par leur évolution vers l'autogamie.

i) que dans les groupes végétaux en évolution (Loteae, Phascoleae), des espèces de type ancien soient associées à des Rhizobium "slow-growers" (ainsi chez Lotus uliginosus L. qui pousse dans les tourbières de pH 4,5 - 5,5) alors que d'autres espèces (Lotus corniculatus L.) sont associées à des "fast-growers".

Cette hypothèse fournit une explication à l'origine des deux grands groupes de Rhizobium, leur fait correspondre la division en "groupes d'inoculation" et en explique même certaines contradictions.

#### 1.3.4. - GROUPES SEROLOGIQUES

La distinction entre souches à croissance lente et rapide se retrouve également dans les caractères sérologiques des Rhizobium :

- BUSHNELL et SARLES, 1939, 105) ont montré des analogies entre les souches de Soja, Lupin et Vigna sinensis.
- KLECKZKOWSKI et THORNTON (1944, 105) entre celles de Pois et de Trèfle.
- VINCENT (1962a, 107) entre celles de Pois et de Trèfle, celles de Lupin et de Lotus, celles d'arachide et de Vigna sinensis.
- GRAHAM (1963c, 108) entre celles de Pois, Trèfle et Haricot.

Toutefois, dans les souches à croissance rapide, celles de Luzerne apparaissent sérologiquement distinctes. Elles seraient par contre proches des Agrobacterium radiobacter et tumefaciens (HOFER, 1941, 109) (COLEMAN et REID, 1945, 110) (MANIL et BONNIER, 1950, 111) (BONNIER, 1953, 112) (GRAHAM, 1963c, 113).

### 1.3.5. - GROUPES LYSOTYPIQUES

Selon les auteurs, il y a (MARSHALL et VINCENT, 1954, 114) (VINCENT, 1962a, 115) ou il n'y a pas (KLECZKOWSKI et THORNTON, 1944, 116) (KLECZKOWSKA, 1957, 117) correspondance entre les groupes sérologiques et les groupes lysotypiques.

Les cas de lyse croisée entre souches isolées de diverses plantes s'établissent suivant le tableau I page 17.

Des travaux sur les phages, il ressort avec certitude une relation entre les Rhizobium de Pois et de Trèfle et peut être de Haricot, et que les souches isolées de Luzerne ne font pas partie de ce groupe. Il y a controverse sur la sensibilité des Agrobacterium aux rhizobiophages. Il manque de résultats concernant les Rhizobium à croissance lente.

TABLEAU I : CAS DE LYSE CROISEE ENTRE GROUPEES DE RHIZORIUM

(+) : Origine du bactériophage ; + : lyse ; - : pas de lyse

(origine) ou nom des souches	Trifolium	Pisum	Vicia	Phaseolus	Medicago	Onobrychis	Ornithopus	Lupinus	Glycine	Agrobacterium radiobacter	Agrobacterium tumefaciens
GERRETSEN et coll. (1923, 118)	-	-	-	-	-	-	(+)	-			
HITCHNER (1930, 119)	(+)/-	-	-	-	-	-					
ISRAILSKY (1929, 120)	(+)	+	+			+		+	-	-	-
LAIRD (1932, 121)	+/-				+/-						
KLECZKOWSKA (1945, 122)	+/- 8/76	+/- 2/17			-	5		-	4		
KLECZKOWSKA (1957, 123)	+	+			-			-			
ROSLYKRY et coll. (1962, 124)	+				+					+	+
SCHWINGHAMER (1965, 125)	+	+									
KOWALSKI et coll. (1959, 126)	+			+							
KOWALSKI et coll. (1963, 127)	+	+	+/+								

- Selon CONN, BOTCHNER et RANDALL (1945, 128) il existe

4 groupes : . Trèfle, Pois, Haricot

. Luzerne

. Soja

. Lima bean

- Selon STANIEWSKI (1970, 129) qui a utilisé 28 bactériophages et 230 souches bactériennes (dont une seule de Lupin) il existe 3 groupes :

. Trèfle - Pois (en partie

. Trèfle - Pois (en partie

. Luzerne - Lupin

Aucun des Rhizobiophages utilisés dans son étude ne lyse d'Agrobacterium.



1.3.6. - AUTRES PROPRIETES

Pour la sensibilité aux antibiotiques, les Rhizobium ont été ainsi regroupés :

- Selon GRAHAM (1963b, 130)

- . souches de Luzerne, Pois, Vesce, Trèfle, Haricot et Agrobacterium,
- . souches de Lupin, Soja et plantes du groupe de Vigna sinensis.

- Selon STRZELCOWA (1968, 131)

- . souches de Trèfle, Pois, Vesce et Haricot,
- . souches de Luzerne,
- . souches de Lupin et Soja.

- Selon KOBUS (1952, 132), les Rhizobium à croissance rapide diffèrent des autres par leur plus grande résistance au cristal violet.

De même, pour les exigences en vitamines, WEST et WILSON (1939a, 133 ; 1939b, 134 ; 1940, 135) et GRAHAM (1963<sub>a</sub>, 135) ont observé les différences suivantes (Tableau II) :

TABLEAU II

Exigences en vitamines des groupes de Rhizobium

Souches de :	Exigences
Trèfle Pois Haricot	} { Biotine et/ou Thiamine et/ou pantothénate de Ca
Luzerne Lupin Vigna sinensis	
Soja	

Un facteur inconnu, présent dans l'extrait de levure (également excrété par certains champignons), favorise la croissance des souches de Lupin, de Soja et des plantes du groupe de Vigna sinensis.

De nombreuses propriétés physiologiques sont en relation avec le type de croissance, lente ou rapide : il en va ainsi pour l'utilisation des sucres (NEAL et WALKER, 1935, 137) (GOSTKOWSKA, 1966, 138) et le type de dégradation, acidifiante ou alcalinisante (page 12), la réduction du tellurite de sodium.

SMITH (1958, 139), étudiant l'utilisation des sucres, la résistance à onze antibiotiques et d'autres tests (uréase, gélatinase...) a pu classer les Rhizobium en trois groupes :

- souches de Luzerne
- souches de Trèfle, Pois et Haricot
- souches de Lupin, Soja et plantes du groupe de Vigna sinensis

ISHIZAWA (1953a, 140 ; 1953b, 141 ; 1953c, 142) a également regroupé R. trifolii, R. Leguminosarum et R. phaseoli d'après leurs caractères morphologiques et physiologiques. GRAHAM (1961, 143) aboutit aux mêmes regroupements.

### 1.3.7. - ANALYSES NUMERIQUES

Certaines de ces observations ont été incluses dans des analyses numériques. Ainsi GRAHAM (1964, 144) étudie 100 caractères, dont la sensibilité à des antibiotiques, la morphologie, l'aspect des colonies, la nutrition carbonée et azotée, les exigences en vitamines et les

propriétés symbiotiques, de 83 Rhizobium et 38 souches des genres Agrobacterium, Chromobacterium, Beijerinckia et Bacillus. Il conclut que les Rhizobium des groupes trifolii, leguminosarum et phaseoli ne forment qu'une espèce, différente de R. meliloti et que Agrobacterium radiobacter et tumefaciens sont identiques. Ces trois espèces sont plus proches les unes des autres que d'un quatrième groupe composé des Rhizobium à croissance lente, si différent que GRAHAM propose d'en faire un genre séparé (Phytomyxa). Toutefois, t'MANNETJE (1967, 145), à partir des mêmes données numériques, mais par des programmes de regroupement différents, montre que les Rhizobium à croissance lente et à croissance rapide sont très proches.

Par contre, MOFFLET et COLWELL (1968, 146), étudiant aussi par analyse adansonienne 191 caractères de 50 souches de Rhizobiaceae, concluent également que les Agrobacterium et les Rhizobium à croissance rapide, sont très proches les uns des autres et assez différents des Rhizobium à croissance lente pour que ceux-ci soient séparés du genre.

#### 1.3.8. - SIMILITUDE DES ADN

Les exemples de transformation entre R. leguminosarum, R. meliloti et R. lupini (BALASSA, 1963, 147) et entre R. japonicum, R. meliloti et R. trifolii (LANGE et ALEXANDER, 1961, 148) aboutissant toutes à la nodulation des hôtes mutuels, sont en faveur d'une parenté étroite des Rhizobium à croissance lente et à croissance rapide. Néanmoins, d'après l'analyse de la composition en bases des ADN, WAGENBRETH (1965, 149) a séparé les Rhizobium à croissance rapide de ceux à croissance lente.



tumefaciens. De nombreux cas ont été rapportés ou par traitement aux rayons ultra-violetts (BEAUD, MANIGAULT et STOLL, 1963, 161) ou par culture sur acides aminés (STAPP, 1958, 162) etc... des A. tumefaciens, perdant leurs propriétés tumorigènes, devenaient indiscernables des A. radiobacter.

Dans une étude sur la flagellation et la composition en bases de l'ADN de 45 Agrobacterium, DE LEY et coll. (1966, 163) ont observé que les A. radiobacter et A. tumefaciens ne pouvaient être distingués l'un de l'autre : ils sont tous péritriches et le pourcentage de Guanine et Cytosine est compris entre 59.9 et 62.8. Ils ne se distinguent pas non plus par ces caractères, des Rhizobium à croissance rapide.

Dans leurs expériences d'hybridation entre les ADN de 29 souches de Rhizobiaceae et les ADN de deux témoins (un Rhizobium de Haricot et un Agrobacterium tumefaciens), HEBERLEIN et coll. (1967, 164) ont mis en évidence des relations plus étroites entre les Agrobacterium et les Rhizobium de Trèfle, Pois, Luzerne et Haricot qu'entre ceux-ci et les Rhizobium de Soja. KERN (1968, 165) a également mis en évidence une relation étroite entre A. tumefaciens et Rhizobium par hybridation des ADN.

Diverses autres raisons sont en faveur d'un rapprochement des Agrobacterium et des Rhizobium à croissance rapide et en particulier de R. meliloti et A. radiobacter, ce dernier ayant d'ailleurs été nommé Pseudorhizobium ramosum (HARTLEB, 1900, 166) et Rhizobium radiobacter (PRIBRAM, 1933, 167). Ce sont en particulier les relations sérologiques citées page 17, la sensibilité aux antibiotiques (GRAHAM, 1963b, 168) la composition du mucus (glucose seul chez Agrobacterium et Rhizobium meliloti, d'après HUMPHREY et VINCENT. (1959, 169) GRAHAM (1965, 170).

Les résultats des analyses adansonniennes (GRAHAM, 1964, 171) (MOFFLET et COLWELL, 1968, 172) montrent également une relation plus étroite entre les Agrobacterium et les Rhizobium à croissance rapide qu'entre ceux-ci et les Rhizobium à croissance lente. A noter également qu'il existe des Rhizobium formant des nodules sur certaines légumineuses et des formations analogues à des tumeurs sur d'autres (Mc GREGOR et ALEXANDER, 1971, 173).

Enfin, les expériences de transformation plaident également en faveur d'un rapprochement des Agrobacterium et des Rhizobium à croissance rapide :

- Rhizobium leguminosarum a été rendu tumorigène par de l'ADN d'Agrobacterium tumefaciens (KLEIN et KLEIN, 1953, 174). Des résultats analogues ont été obtenus par MANIL (1960, 175) et KERN (1964, 176 ; 1965a, 177 ; 1965b, 178 ; 1969, 179).

- La transformation inverse d'un Agrobacterium par de l'ADN de Rhizobium a également été obtenue (KERN, 1969, 180), mais les propriétés infectieuses des recombinants n'ont pas été rapportées.

- MANIL (1960, 181) a obtenu le transfert à des A. radiobacter, de la propriété des Rhizobium de former des nodules.

Il ressort donc de toutes ces données une parenté plus grande entre les Rhizobium à croissance rapide et les Agrobacterium tumefaciens et radiobacter, qu'entre les Rhizobium à croissance rapide et ceux à croissance lente.

1.4. - PROPOSITIONS MODERNES POUR LA SYSTEMATIQUE  
DES RHIZOBIUM ET RHIZOBIACEAE

Les conclusions des auteurs modernes ayant étudié les relations entre les groupes de Rhizobiaceae sont résumées dans le tableau III (page 26).

Sur ce tableau, il apparaît que le genre Rhizobium est divisé en deux groupes : souches à croissance rapide et souches à croissance lente. Cette division vaut pour de nombreux critères : flagellation, relations sérologiques et lysotypiques, physiologie (sensibilité aux antibiotiques, exigences en vitamines, métabolisme acidifiant ou alcalinisant...) et dans une certaine mesure, si l'on admet les hypothèses de NORRIS (page 13) elle s'explique par l'écologie et l'évolution des légumineuses. Les analyses adansonniennes, reprenant la plupart de ces caractères, l'analyse chimique et l'étude, par hybridation et par transformation, des ADN, font également ressortir cette division en deux groupes du genre Rhizobium.

Cette classification ne correspond pas à celle fondée sur les groupes d'inoculation et il semble difficile d'établir des sous-groupes nettement définis à l'intérieur des deux grands groupes proposés.

De ce tableau il ressort également une grande proximité entre Agrobacterium tumefaciens et radiobacter. Il apparaît également que les Rhizobium à croissance rapide sont plus proches des Agrobacterium que les Rhizobium à croissance lente et tout indique que si on maintient les deux groupes de Rhizobium dans le même genre, en vertu de leur capacité commune de provoquer l'apparition de nodules sur les racines de légumineuses, il faut alors inclure les Agrobacterium dans ce genre.

Du même tableau, il ressort également des conclusions concernant l'unité et la position systématique de la famille des Rhizobiaceae :

- Le groupe des Chromobacterium (d'ailleurs hétérogène, selon SNEATH. (1957, 182 ; 1960, 183) diffère des autres Rhizobiaceae au point qu'HEBERLEIN et coll. (1967, 184) se basant sur les résultats d'hybridation des ADN, ont proposé de les exclure de la famille, dont l'unité a d'ailleurs été mise en doute (DE LEY et coll., 1966, 185).

- Les expériences d'hybridation des ADN (HEBERLEIN et coll., 1967, 186), la similitude observée dans les analyses adansonniennes (MOFFLET et COLWELL, 1968, 187) et la formation (commune aux Rhizobiaceae et à certains Pseudomonas) d'étoiles, en relation avec la conjugaison, font penser que les Rhizobiaceae seraient plus proches des Pseudomonadales que des Eubacterales.

Ceci va à l'encontre des affirmations de BISSET (1952, 188 ; 1958, 189) selon lesquelles certains Rhizobium, comme les Azotobacter (GARBOSKY et GIAMBIAGI, 1953, 190) (BISSET, 1955, 191) pourraient passer par un stade Gram-positif et produiraient des endospores résistant 10 min à 100°C, et seraient ainsi apparentées aux Bacillaceae, Bacillus polymyxa ayant même été avancé par BISSET comme ancêtre possible des Rhizobium.

TABLEAU III : PROPOSITIONS MODERNES POUR LA SYSTEMATIQUE DES RHIZOBIUM ET RHIZOBIACEAE

Renvois -1-	-2-	-3-	-4-	-5-	-6-	-7-	-8-	-9-	-10-	
A. stellatum	1	-	66.0	(Pseudomonas) (B)			(Pseudomonas)			
A. gypsophilae	1	-	56.2	?			?			
A. pseudotsugae	1	-	67.7	(A.pseudotsugae) (B)			?	18	6	
A. rhizogenes	1	-	59.5 à 62.8	A. rhizogenes (B)	R. radiobacter R. rubi R. radiobacter var. tumefaciens R. radiobacter	R. radiobacter R. rubi R. radiobacter var. tumefaciens R. radiobacter	R. rhizogenes R. radiobacter var. tumefaciens R. radiobacter	52 70 85 83	65 59 55 57	
A. rubi	1	-		A. radiobacter						
A. tumefaciens	1	+(-)		var. tumefaciens (B)						
A. radiobacter	1	+		A. radiobacter (B)						
R. meliloti	1	-	62.4	R. meliloti (A)		R. meliloti	R. meliloti	44	59	
R. trifolii	1	-	59.1 à 63.1	R. leguminosarum (A)	79	R. leguminosarum (A)	R. leguminosarum (A)	52	92	
R. leguminosarum	1	-(+)								63.1
R. phaseoli	1	-	59.1 à 63.1	R. leguminosarum (A)	80	R. leguminosarum (A)	R. leguminosarum (A)	52	92	
R. lupini (pro parte)	1	-								63.1
R. japonicum "	1	-								63.1
(Cowpea group) "	1	-	61.6 à 65.5	R. japonicum (A)	69	R. japonicum (A)	R. japonicum (A)	39	42	
R. lupini (pro parte)	2	-								65.5
R. japonicum "	2	-								65.5
(Cowpea group) "	2	-	66.5 63.0 à 67.5	R. japonicum (A)	63	R. japonicum (A)	R. japonicum (A)	33	36	
Chromobacterium lividum										67.5
Chr. violaceum										67.5
Beijerinckia spp.			61 à 65	R. japonicum (A)	87	R. japonicum (A)	B. subtilis E. coli B Pseudomonas fluorescens	3 14 40	10 19 36	
Pseudomonas spp.										65

LEGENDE

<u>Renvois</u>	<u>Signification</u>
- 1 -	Classification du Bergey's Manual of Determinative Microbiology, 7e Edition, (1957, 192). A. = Agrobacterium R. = Rhizobium ( ) = non cité dans le Bergey's manual
- 2 -	1 = souche à croissance rapide, péritriche 2 = souche à croissance lente, monotriche
- 3 -	Production de 3-céto-lactose, selon DE LEY et RASSEL (1965, 193) ( ) = exceptions.
- 4 -	% G + C dans l'ADN, selon DE LEY et RASSEL (1965, 194) DE LEY, BERNAERTS, RASSEL et GUILMOT (1966, 195) et MOFFLET et COLWELL (1968, 196).
- 5 -	(A) = groupes proposés par DE LEY et RASSEL (1965, 197) (B) = groupes proposés par DE LEY, BERNAERTS, RASSEL et GUILMOT (1967, 198).
- 6 -	Groupement d'après le pourcentage de similitude obtenu par analyse adansonienne, selon GRAHAM (1964, 199).
- 7 -	Groupes proposés par GRAHAM (1964, 200) et MOFFLET et COLWELL (1968, 201) d'après les résultats d'analyses adansoniennes.
- 8 -	Groupes proposés par HEBERLEIN, DE LEY et TIJTGAT (1967, 202) d'après -9- et -10-.
- 9 -	% d'homologie de l'ADN (moyenne) avec <u>A. tumefaciens B6</u>
- 10 -	% d'homologie de l'ADN (moyenne) avec <u>R. leguminosarum</u> (souche de <u>Phaseolus vulgaris</u> ) mesuré par hybridation des ADN.

ETUDE SYSTEMATIQUE DES SOUCHES

Le but de cette étude étant de mettre en relation les propriétés symbiotiques des Rhizobium avec d'autres caractères, nous avons procédé à l'isolement de nombreux clones, à partir de différentes espèces de légumineuses.

Les recherches de bibliographie nous ont montré que les Rhizobium, compte non tenu de leurs aptitudes symbiotiques, se répartissaient en deux grands groupes : souches à croissance lente et souches à croissance rapide, et qu'à l'intérieur de ce dernier groupe, les souches de Luzerne étaient quelque peu différentes.

Notre choix s'est donc porté plus particulièrement sur les Rhizobium à croissance rapide (souches de Trèfle, Pois, Vesce, Haricot, et de Luzerne), plus intéressantes pour les expériences de génétique.

Le chapitre 2 rapporte les modalités d'isolement des souches et les examens pratiqués :

- examen des propriétés symbiotiques
- examen des autres caractères

L'examen des propriétés symbiotiques, dont la connaissance est nécessaire pour en étudier les variations, a également pour but la mise au point de méthodes de détection de l'infectivité et de l'efficacité des souches, faciles à mettre en oeuvre à l'échelle des expériences de génétique.

L'examen des autres caractères a été conçu de façon à :

- 1) pouvoir distinguer le genre Rhizobium des autres genres bactériens du sol, en particulier de ceux rencontrés fréquemment dans les nodules,
- 2) pouvoir différencier les souches les unes des autres et en particulier pouvoir identifier à une souche les mutants qui en dérivent, même si ceux-ci ont perdu leurs propriétés symbiotiques,
- 3) délimiter éventuellement des sous-groupes dans le genre et voir si un caractère peut être mis en relation avec une aptitude symbiotique,
- 4) enfin trouver des souches intéressantes pour les expériences de génétique (croissance rapide) ou des souches possédant un caractère intéressant (colonies non muqueuses ou pigmentées, formation d'étoiles...)

#### 2.1. - ISOLEMENT DES SOUCHES

Toutes les souches ont été isolées à partir de nodules. La méthode employée a été la suivante :

- extraire les racines de la plante,
- isoler un nodule, le laver à grande eau,
- le passer, 3 min environ, suivant sa taille, dans une solution aqueuse de chlorure mercurique (1 p. 1000) avec une goutte de détergent (teepol),
- le reporter stérilement dans plusieurs bains successifs (3 à 5) d'eau stérile,
- le reporter stérilement dans un tube à hémolyse contenant 0,5 ml d'eau stérile,
- écraser le nodule avec un agitateur stérile,
- étaler une goutte de la suspension obtenue et une goutte de la même

suspension diluée au 1/10 par addition de 4,5 ml d'eau stérile, sur du milieu de culture pour Rhizobium (page 46 ),

- incuber à 25 ou 30°C.

Chaque nodule contient normalement des Rhizobium. Il y a lieu toutefois d'éliminer les nodules trop petits, ridés ou fanés, souvent envahis par d'autres microorganismes, vivant à leur surface ou dans les tissus en décomposition.

Il faut éviter de blesser les nodules et en particulier de les arracher de la racine adjacente, qui doit être coupée de part et d'autre.

Les colonies de Rhizobium apparaissent après 4 à 10 jours d'incubation, selon la plante d'origine. Dans la plupart des cas, il n'existe qu'une sorte de colonies, incolores à blanchâtres, plus ou moins translucides, à marge entière, circulaires quand elles sont isolées, souvent confluentes, convexes ou élevées, jamais plates ni ombiliquées. Leur consistance est visqueuse à coulante et leur diamètre peut dépasser le centimètre.

La morphologie observée au microscope est très variable : bâtonnets ou coccobacilles, à extrémités arrondies, rarement courbes, parfois renflés ou branchés. La coloration de Gram n'est pas retenue et on observe très généralement un ou plusieurs secteurs non colorés par la fuschine. Les cultures jeunes ont ainsi une coloration bipolaire, et les cultures âgées montrent des bacilles plus allongés, à aspect "barré".

## 2.2. - EXAMEN DES PROPRIETES SYMBIOTIQUES DES SOUCHES

### 2.2.1. - PRINCIPE

L'examen de chacune des souches isolées a d'abord porté sur la capacité de former (in vitro) des nodules sur une légumineuse-test. Le principe du test est de mettre une légumineuse cultivée aseptiquement, en présence de la souche à étudier et d'observer s'il y a formation de nodules.

Les tissus internes des graines étant normalement exempts de bactéries, il suffit de les désinfecter en surface et de les faire germer en milieu stérile pour obtenir une plante aseptique.

### 2.2.2. - METHODE

#### 2.2.2.1. - MILIEUX ET MATERIEL

- Milieu de NICOL et THORNTON (1941, 203)

H K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	g
Mg SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2	g
NaCl	0,1	g
Fe PO <sub>4</sub>	1,0	g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	2,0	g
Fe Cl <sub>3</sub>	0,01	g
Eau de conduite	1	litre
Eventuellement (témoins azotés : NaNO <sub>3</sub> 0,5 g/l)		

## - Milieu de RAGGIO et RAGGIO (1962, 204)

Mg SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,720	g	
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·10 H <sub>2</sub> O	0,453	g	
KCl	0,065	g	
H <sub>2</sub> Na PO <sub>4</sub>	0,019	g	
Solution de Heller	1	ml	
Eau distillée	1	litre	
Eventuellement (témoins azotés) Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O			0,430 g/l
	KNO <sub>3</sub>		0,080 g/l

## - Solution minérale de HELLER

Fe Cl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1	mg
Zn SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1	mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1	mg
Mn SO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1	mg
Cu SO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,03	mg
Al Cl <sub>3</sub>	0,03	mg
Ni Cl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,03	mg
K I	0,01	mg
Na <sub>2</sub> Mo O <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,5	mg
Eau distillée	1	litre

Le milieu de culture, après dissolution complète des sels, ou ébullition s'il est gélosé, est réparti par 20 à 40 ml en tubes de 200, 220, 250 ou 300 mm de longueur sur 20, 25, 30 mm de diamètre.

Les graines devant être plantées à la surface de ce milieu, il faut prévoir :

. Pour les milieux liquides :

un support en papier fort, assurant une humidification suffisante de la graine (Whatman 3 ou 4)

ou de préférence une bourre très mince de coton hydrophile, reposant sur les ergots d'un tube spécial.

. Pour les milieux gélosés, une quantité d'agar suffisante pour empêcher les graines de couler, soit :

3-4 g/l pour les Trèfles, Luzernes

5-7 g/l pour les Pois, Haricots, Lupins

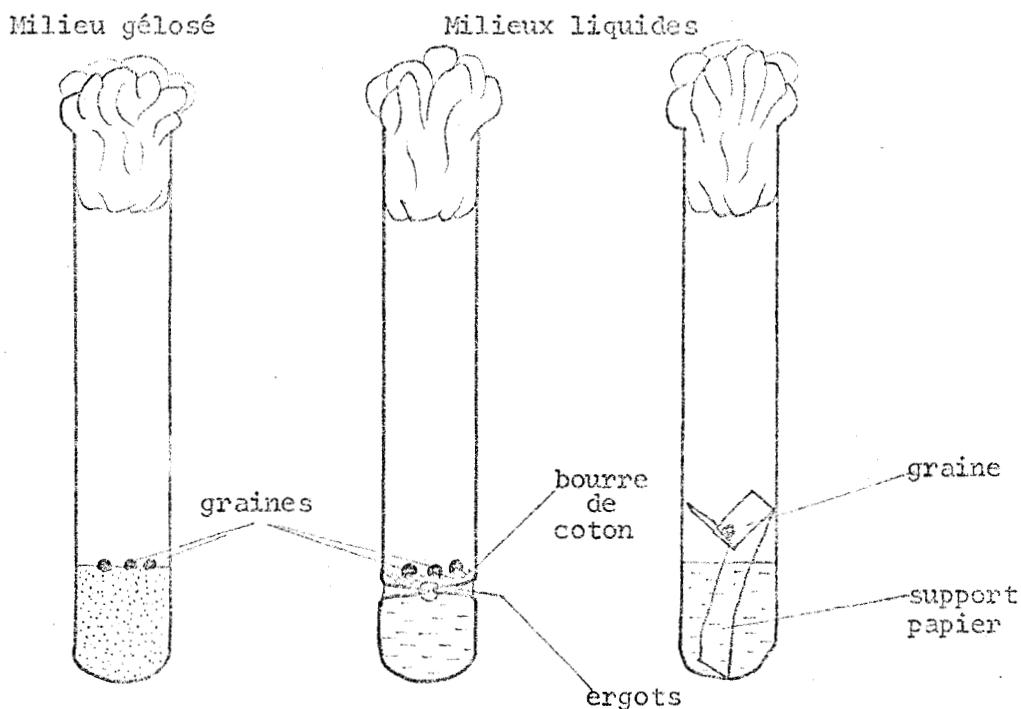


Figure 1

TUBES POUR CULTURE ASEPTIQUE

Les tubes de culture sont enfin bouchés au coton et stérilisés par autoclavage (20 min à 121°C).

Pour les légumineuses à grosses graines (Haricot, Pois, Arachide) le dispositif préconisé par BRAKEL (1965, 205) et modifié comme suit, a été utilisé.

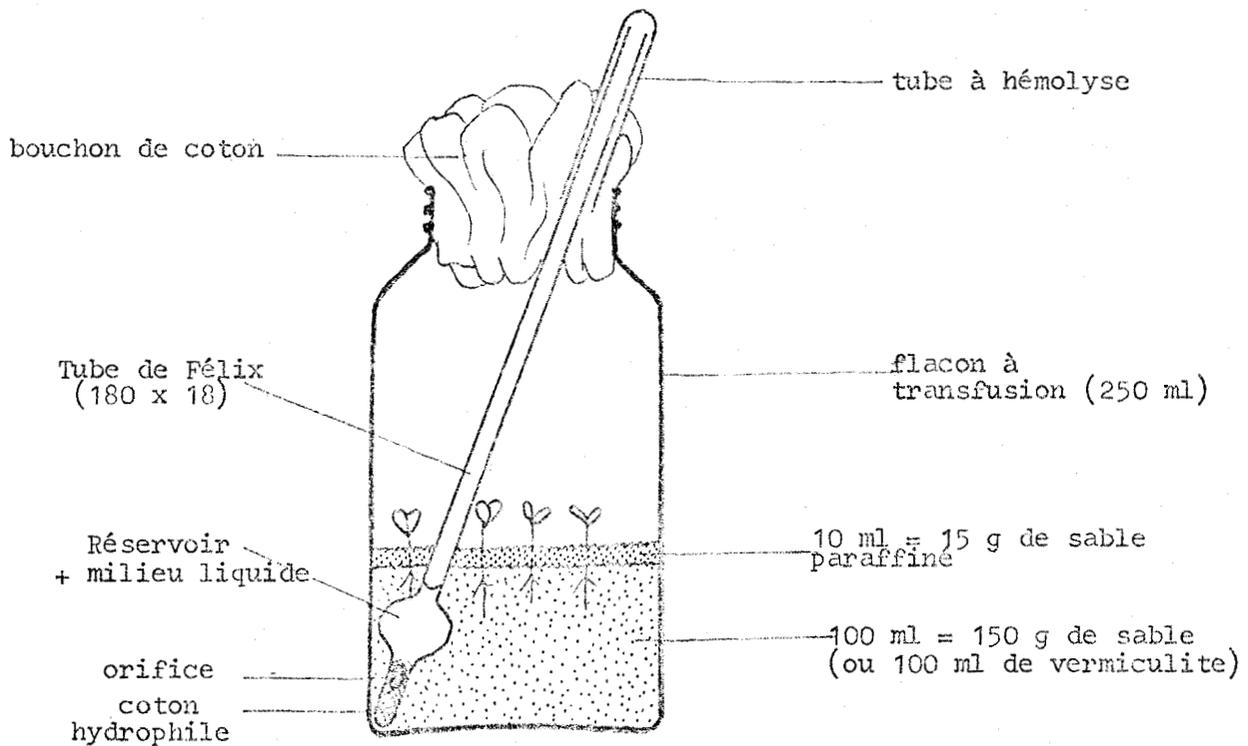


Figure 2

## POTS POUR CULTURE ASEPTIQUE

Le tube de Félix, renflé en réservoir, est ensuite percé près de son extrémité. L'orifice est bouché au coton hydrophile pour empêcher que le sable n'y entre et n'occupe tout le volume du réservoir. Ce tube sert à l'inoculation si celle-ci est faite après que le sable paraffiné ne soit mis en place. Il sert également aux arrosages (à l'eau distillée stérile). L'ensemble, sans le sable paraffiné, est stérilisé 1 heure à 121°C, trois jours de suite. Le milieu, stérilisé séparément, est ajouté après autoclavage du pot de sable. Le sable paraffiné est préparé comme suit (VAN SCHREVEN, 1959, 206) :

A 10 kg de sable fin, on ajoute 100 g de benzol contenant 10 g de paraffine à haut point de fusion. Après évaporation du solvant, le sable est réparti par 10 ml en tubes et autoclavé 20 min à 121°C.

Le sable paraffiné est réparti stérilement en une couche de 0,5 cm au-dessus des graines, aussitôt après la plantation, pour assurer le maintien de la stérilité des racines.

Le bouchon de coton est retiré dès que les tiges l'atteignent après avoir percé la couche de sable paraffiné.

#### 2.2.2.2. - DESINFECTION DES GRAINES

- trier les graines,
- les rincer à l'alcool à 70°C, 3 sec., pour dégraisser la surface et la rendre mouillable,
- les passer dans une solution d'hypochlorite de calcium à 36 g/l, préparée 12 h avant (ou 2 h avant, en agitation forte et décantée) ou dans une solution de chlorure mercurique (2,5 g/l). Laisser tremper 20 min dans l'hypochlorite (5 min dans  $\text{HgCl}_2$ ) après avoir ajouté une goutte de mouillant (teepol) et en agitant de temps en temps,
- les laver dans 3 à 5 bains successifs d'eau stérile,
- les reporter stérilement sur le milieu de culture ou de prégermination.

#### 2.2.2.3. - PREGERMINATION, PLANTATION

Après désinfection, les graines sont plantées sur milieu complet pour Rhizobium (page 46 ), gélosé à 15 p. 1000, en boîtes de Pétri, et mises en incubation deux ou trois jours à 30°C.

On transfère ensuite les graines en tubes ou pots de culture, en éliminant celles qui sont polluées ou ont mal germé.

#### 2.2.2.4. - INOCULATION

L'inoculation a lieu entre la plantation et l'apparition des premières vraies feuilles. Chaque pot est inoculé avec 1 ml d'une culture ou d'une émulsion dans l'eau distillée, de la souche à étudier. La concentration finale de bactéries a toujours dépassé  $10^4$  cellules/ml.

#### 2.2.2.5. - TEMPERATURE ET ECLAIREMENT

Il est inutile de placer des caches pour éviter l'éclairement des racines, la nodulation ayant lieu en pleine lumière aussi bien que lorsque les racines sont à l'obscurité.

Par contre, le feuillage doit recevoir un éclairage important. Les meilleurs résultats ont été obtenus en serre avec 16 heures d'éclairage (4 rampes OSRAM "lumière du jour" 40 W à 50 cm du feuillage, en plus de la lumière du jour). L'éclairage du laboratoire est insuffisant en hiver pour les Trèfles et Luzernes et toute l'année pour les Pois, Haricot, Vesce, Lupin, Soja et Arachide.

Pour les essais en serre, la température était réglée à 25°C le jour et 15°C la nuit et l'humidité relative à 90 p. 100.

### 2.2.3. - RESULTATS

Au cours d'expériences préliminaires, nous avons utilisé le milieu de RAGGIO et RAGGIO et des graines de Trèfles :

Trèfle blanc nain (Clause) (Trifolium repens)

Trèfle violet flamand (Clause) (Trifolium pratense)

La plantation a été faite en tubes à essais (200 x 20 mm) 3 graines par tube). Les cultures ont été placées à 28°C, avec un éclairage artificiel, 16 heures par jour.

La croissance des plantes a été identique sur les milieux avec ou sans azote, inoculées ou non, pendant le premier mois.

A partir de la quatrième semaine, les plantes témoins, non inoculées, sans azote, ont commencé à montrer des symptômes de carence azotée. Les symptômes étaient très nets après six semaines :

feuilles jaunes (chlorose)

tiges rouges

plante érigée

croissance retardée aboutissant à la mort

Par contre, les plantes ayant des nodules et celles ayant reçu de l'azote ont continué à croître jusqu'à la fin de l'expérience (8ème semaine).

Avec les souches de Rhizobium utilisées, des nodules se sont formés dans tous les tubes. Ces nodules infectent donc les deux espèces de Trèfles (Tr. repens et Tr. pratense). Néanmoins dans 3 tubes il s'est trouvé une plante sur trois dépourvue de nodules. Ce défaut est sans doute dû à des facteurs génétiques végétaux. Pour éviter cette source d'erreur dans la suite des essais d'inoculation, tout résultat négatif a été répété sur au moins cinq plantes. Les premiers nodules sont apparus deux semaines après l'inoculation.

Aucune des plantes non inoculées n'a formé de nodules. Il en a été de même dans toutes nos expériences et il semble donc que les pollutions par des Rhizobium transmis par l'air doivent être exceptionnelles. Néanmoins, avec la Luzerne, nous avons observé de temps à autre des formations analogues à des tumeurs, au point d'insertion des racines secondaires. De telles formations apparaissent même dans les tubes non inoculés, et il n'a pas été possible d'en isoler de microorganismes sur les milieux pour Rhizobium.

Dans une deuxième série, nous avons planté des Trèfles et des Luzernes (Luzerne flamande, Clause) en pots de sable, avec température réglée à 25°C le jour et 15°C la nuit.

Par rapport à la première série, la croissance des plantes a été augmentée. En particulier la survie des témoins sans azote, non inoculés, a été réduite à un mois environ, permettant ainsi une détection plus rapide de l'efficacité.

La croissance des Pois (var. Myzar et Claude 50), des Vesces et des Haricots (var. Corel et Arian nain) est très réduite et la nodulation n'a pas lieu, même si les tubes employés sont de grande taille (300 x 50 mm) et le volume de milieu important (30 ml).

Par contre, en pots de sable, leur croissance est normale et la nodulation a lieu en deux semaines. Il est toutefois impossible de détecter l'efficacité de la nodulation d'après les différences de croissance et de développement entre plantes inoculées et plantes témoins. En effet, les plantes non inoculées, sans azote, parviennent à la fructification et ont une croissance comparable à celle des plantes

inoculées. Ceci est dû à l'importance des réserves azotées présentes dans les graines (SCHWINGHAMER, 1969, 207).

La détection de l'efficacité doit donc être basée sur le nombre, la couleur et la répartition des nodules sur le système racinaire :

- Symbiose efficace : nodules brun-rouge (présence de légghémoglobine), répartis surtout sur les racines primaires.
- Symbiose inefficace : nodules blanc ou verdâtre, petits, nombreux, apparaissant tardivement et surtout sur les racines secondaires.

Alors que les Trèfles et Luzernes ont une croissance et une nodulation normale en tubes et en pots de sable ou de vermiculite, aussi bien à température constante (18°C) qu'à température alternée (25°C le jour, 15°C la nuit) (pourvu que l'éclairage soit suffisant), les Pois et Haricots ne peuvent croître et noduler normalement qu'en pots et à températures diurne et nocturne différentes.

Dans une expérience préliminaire avec les Lupins, nous avons utilisé des graines de Lupin vivace (Lupinus polyphyllus). Cette espèce est incapable de pousser normalement en tube. En pot de sable, il a été impossible d'obtenir la formation de nodules, malgré une culture portée à deux mois et un développement normal (8 à 10 feuilles). Les mêmes résultats ont été obtenus avec des espèces annuelles :

Lupinus hartwegii

Lupinus luteus var. Yellow Weiko III

Lupinus angustifolius var. Blusa

Lupinus hirsutus var. Pflugs ultra

Toutes ces espèces, ainsi que Lupinus polyphyllus, portent des nodules après un mois de croissance en pleine terre.

Avec les Soja, Arachide, Lotier et Sainfoin, la croissance a été très réduite en tubes et normale en pot de sable avec la solution de RAGGIO et RAGGIO comme milieu nutritif. Toutefois, nous n'avons pas observé de nodules sur ces plantes infectées avec les souches à notre disposition (page 70 ). Il est possible qu'aucune des souches testées ne soit capable d'infecter le Soja, puisqu'aucune n'a été isolée de Soja. Par contre, la souche isolée d'Arachide (V13 S) et celles isolées de Sainfoin (J1S et J2S) et de Lotier (X1S) devraient provoquer l'apparition de nodules sur leurs hôtes respectifs.

Pour les espèces suivantes : Lupin (L. polyphyllus, L. luteus, L. angustifolius, L. hirsutus et L. hartwegii) ; Soja (Glycine max) ; Lotier (Lotus corniculatus) ; Sainfoin (Onobrychis sativa) et Arachide (Arachis hypogea) nous avons refait les mêmes essais en utilisant le milieu de NICOL et THORNTON et le milieu de RAGGIO et RAGGIO avec addition de  $\text{CaCl}_2$  (1 p. 1000). Les résultats ont été négatifs pour toutes les plantes sauf pour un plant de Sainfoin (sur 3), inoculé avec une souche de Sainfoin (J1S) en pot de vermiculite avec le milieu de NICOL et THORNTON.

#### 2.2.4. DISCUSSION

De ces essais il ressort que les conditions de culture et de nodulation varient d'une plante à l'autre : la symbiose ne s'établit que si certaines conditions sont respectées et ces conditions varient d'un système Rhizobium-plante hôte à l'autre.

La première condition d'établissement de la symbiose est la présence de Rhizobium infectieux. C'est cette caractéristique que nous nous sommes proposé d'étudier. Les résultats par souches sont donnés page 62 et discutés page 63 avec les résultats des autres examens pratiqués sur chaque souche.

La seconde condition est la présence d'une plante-test en état de réceptivité.

NUTMAN (1946, 208) a montré que dans une espèce sensible à l'infection par une souche de Rhizobium, il existait des individus mutants résistants à l'infection. Nous avons observé un phénomène analogue chez Trifolium repens et Tr. pratense, mais il est facile de tourner cet inconvénient en multipliant le nombre de plantes testées.

#### 2.2.4.1. - CHOIX DE L'ESPECE-HOTE

Par contre, la multiplication des essais ne résout pas le problème du choix de l'espèce-hôte. Ainsi, certaines souches isolées de Vicia sativa (L2S) et de Vicia faba (L6S) provoquent la formation de nodules sur Vicia faba, mais pas sur Pisum sativum, alors que ces plantes sont réputées appartenir au même groupe d'inoculation croisée. De même, une souche (L4S) isolée de Pisum sativum (variété inconnue) forme rapidement des nodules roses et bien développés sur Pisum sativum var. Myzar et sur Vicia faba, mais forme tardivement des nodules petits, pâles, sans doute inefficients, sur une autre variété de Pisum sativum (Claude 50). Il importe donc de tester chaque souche sur l'espèce

végétale et si possible la variété à partir de laquelle elle a été isolée sans tenir compte des simplifications proposées par la classification erronée en "groupes d'inoculation".

#### 2.2.4.2. - INFLUENCE DU TAUX D'AZOTE COMBINE EN DU VOLUME DE MILIEU

MUNNS (1968a, 209 ; 1968b, 210 ; 1968c, 211) et TANNER et ANDERSON (1963, 212) ont montré que le nitrate inhibait la formation de nodules à différents stades du processus :

- en étant réduits par la plupart des Rhizobium en nitrites qui catalysent la dégradation de l'acide  $\beta$ -indolyl-acétique (TONHAZY et PELCZAR, 1954, 213),
- en inhibant le développement des cordons infectieux ou en les désorganisant.

Quand l'azote est présent sous forme ammoniacale, la quantité de tryptophane transformée par les Rhizobium en AIA est diminuée (TANNER et ANDERSON, 1963, 214) et la nodulation est également inhibée. L'azote organique inhibe également la nodulation (THORNTON et NICOL, 1936, 215).

Pour ces raisons et pour permettre la détection de l'efficacité, les milieux utilisés dans les essais d'inoculation ne contiennent pas d'azote. Par contre, les graines contiennent des réserves cotylédonnaires azotées. Ces réserves sont minimales chez le Trèfle et la Luzerne. Mais chez les légumineuses à grosses graines, elles sont importantes : chez les Pois, Vesce, Haricot, elles suffisent au développement de la plante jusqu'à la fructification et gênent la détection de l'efficacité. Chez

le Lupin, dont les cotylédons se résorbent très lentement, elles sont suffisantes pour empêcher la nodulation, même en vase de végétation. Il en est probablement de même pour les arachide et soja.

Pour réduire la concentration en azote dans le milieu et par conséquent dans la plante, il est possible d'augmenter le volume de milieu disponible par plante ou de sectionner les cotylédons sur les plantules juste germées.

La seconde méthode a été utilisée par BONNIER et BROUWERS (1958, 216) sur Pois et Soja et a permis à ces auteurs d'obtenir la nodulation de ces plantes en tubes et leur développement complet jusqu'à fructification, développement qui n'a même pas lieu en vase de végétation pour le Soja. La croissance des plantes et l'importance du système racinaire sont toutefois très réduites.

La culture en pot, avec un volume de milieu important (20 ml de milieu liquide pour 100 ml de sable ou de vermiculite, dans nos expériences, et 40 ml environ de milieu pour 300 ml de sable selon SCHWINGHAMER (1960, 217) permet d'obtenir la formation de nodules sur Pois et Haricot. Par contre, la culture en vase de végétation et l'ablation simultanée des cotylédons ne suffisent pas à obtenir la nodulation des Lupins, pour lesquels un volume beaucoup plus important semble nécessaire.

#### 2.2.4.3. - INFLUENCE DE L'ECLAIREMENT

Selon certains auteurs (THORNTON, 1936, 218) ce n'est pas la concentration absolue d'azote qui intervient pour inhiber la nodulation

mais le rapport C/N dans la plante. Il est donc aussi important d'assurer des conditions idéales pour la photosynthèse, que d'assurer une baisse de la concentration d'azote.

Une photopériode de 16 heures et un éclairage artificiel d'appoint ont suffi à obtenir une bonne nodulation sur Trèfle, Vesce, Luzerne, Pois et Haricot. Les conditions de température utilisées conviennent également pour la nodulation de ces plantes. Elles correspondent aussi à l'optimum trouvé pour la fixation de l'azote pour les Pois (ROPONEN, VALLE et ETTALA, 1970, 219). Par contre, pour les plantes avec lesquelles nous n'avons pas obtenu de nodulation, ces conditions de température et de lumière ne sont peut être pas idéales. Pour les Lupins en particulier la température diurne (25°C) semble trop forte, même pour la croissance.

#### 2.2.4.4. - INFLUENCE DU CALCIUM

Mc CALLA. (1937, 220) conclut d'expériences sur Luzerne qu'il n'y a pas nodulation si la plante et la bactérie sont privées de calcium.

LONERAGAN et DOWLING (1958, 221) et LOWTHER et LONERAGAN (1968, 222) ont observé sur Trifolium subterraneum que des concentrations croissances de  $Ca^{++}$  (au-delà de 246  $\mu M$  jusqu'à 720  $\mu M$ ) n'augmentaient plus la croissance de la plante mais augmentaient le nombre de nodules.

Ce besoin de Ca n'est pas apparu dans nos expériences sur Trèfle et Luzerne : nous n'avons pas observé de différences entre les

plantes cultivées sur milieu de RAGGIO et RAGGIO liquide, sur le même milieu gélosé, sur le même milieu +  $\text{CaCl}_2$ , ou sur milieu de NICOL et THORNTON. L'effet du calcium sur la nodulation des Lupin, Soja, Arachide et Lotier n'a pu être testée, mais un effet défavorable du milieu de NICOL et THORNTON, très riche en calcium, sur la croissance des Lupins, a été noté. Par contre, les seuls nodules que nous ayons obtenus sur Sainfoin sont apparus en milieu de NICOL et THORNTON et il est possible que la nodulation de cette plante très nettement calcicole requière une concentration importante de calcium.

En conclusion, la méthode (culture en pot à transfusion de 250 ml sur sable ou vermiculite, avec la solution de RAGGIO et RAGGIO, dans les conditions définies plus haut) utilisée avec succès pour l'infection des Trèfles, Luzernes, Pois, Vesces et Haricots, ne convient pas pour l'infection des Lupins. Les quelques essais menés avec Soja, Arachide, Sainfoin, Lotier ont été également sans succès.

### 2.3. - EXAMEN DES CARACTERES BACTERIOLOGIQUES DES SOUCHES

Parallèlement aux essais de nodulation, les souches utilisées ont été testées pour leurs caractères morphologiques et biochimiques. Ce travail a pour objet, d'une part de différencier le genre Rhizobium parmi les différentes espèces bactériennes rencontrées lors de l'isolement à partir des nodules et, d'autre part, de différencier les souches de Rhizobium entre elles, en particulier de pouvoir identifier à une souche sauvage les mutants qui en dérivent, même si ceux-ci ont

perdu leurs propriétés symbiotiques.

### 2.3.1. - METHODES

#### 2.3.1.1. - MORPHOLOGIE

L'examen microscopique a lieu sur des cultures jeunes, après fixation et coloration par la méthode de Gram.

#### 2.3.1.2. - ASPECT DES COLONIES

L'aspect des colonies est noté sur le milieu RC, dont dérivent la plupart des milieux servant aux tests biochimiques :

- Milieu RC :	Mg SO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
	HK <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
	Yeast Extract Difco	1 g
	Eau distillée	1000 ml

pH 7,5

Le milieu est stérilisé 20 min à 121°C, puis additionné (5 p. 100) de glucose à 20 p. 100 stérilisé séparément 15 min à 110°C.

#### 2.3.1.3. - AEROBIOSE

Le milieu (RC gélosé à 5 g/l) réparti en tubes de Félix, stérilisé et maintenu à 44°C, est inoculé en masse. La lecture est faite après 48 heures d'incubation à 30°C.

2.3.1.4. - ACIDE  $\beta$ -indolyl-acétique (AIA)

Le milieu suivant est stérilisé par filtration :

Mg SO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 g
L-tryptophane	3 g
Glucose	10 g
Mélange V	20 ml
Eau distillée	1000 ml

pH 7,5

Mélange V :

Thiamine	25 $\mu$ g	} par ml du mélange
Riboflavine	500 $\mu$ g	
Pyridoxine	25 $\mu$ g	
Cyanocobalamine	250 $\mu$ g	
Pantothénate de calcium	25 $\mu$ g	
Biotine	500 $\mu$ g	
Acide folique	2,5 $\mu$ g	

Dose d'emploi : 2 p. 100 du mélange, stérilisé par filtration.

Le milieu réparti par 10 ml en tubes de 160 x 16, est inoculé et incubé à 30°C en agitation. Quand la croissance maximum est atteinte, la révélation a lieu avec les réactifs suivants :

## 1) recherche de l'indole :

- acide nitrique, nitreux
- réactif de Kovac's :

p. diméthylaminobenzaldéhyde	5 g	) mélanger à 60°C refroidir et ajouter :
Alcool amylique	75 ml	
HCl concentré	25 ml	

Ce réactif donne une coloration rose-mauve en présence d'indole.

## 2) Recherche de l'AIA :

- A 8 ml de réactif de SALKOWSKI, amélioré par PILET (1957, 223) ajouter 1 ml de culture et 1 ml d'éthanol. Une coloration rouge indique la présence d'AIA.

2.3.1.5. - UTILISATION DES CITRATES

Le milieu suivant est réparti en tubes de 200 x 20 :

$H_2(NH_4)PO_4$	1 g
$K_2 PO_4$	1 g
$Mg SO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
Bleu de bromothymol	0,08g
Bacto agar Difco	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH 6,8

Après autoclavage, ajouter :

- 2 p. 100 du mélange V
- soit (citrate S):

pour 10 ml : 0,4 ml de citrate de sodium (trisodique) à 5 p. 100, stérilisé par filtration (concentration finale 2 g par litre).

- soit (citrate C) :

pour 10 ml : 0,4 ml de solution de citrate de fer ammoniacal à 5 p. 100, stérilisé par filtration (concentration finale 2 g par litre) et 0,1 ml de solution de glucose à 1 p. 100 (concentration finale 0,1 g par litre).

Les tubes sont refroidis en longue tranche et inoculés en strie avec le minimum de germes. Les tubes ayant viré du vert au bleu franc après quatre jours à 30°C, sont notés +.

2.3.1.6. - CYTOCHROME--OXYDASE

Nous avons utilisé le papier réactif Pathotec<sup>TM</sup> CO WARNER-CHILLCOTT en nous conformant aux indications du fabricant.

2.3.1.7. - GELATINASE

Nous avons utilisé le milieu RC complété avec 4 p. 100 de gélatine et stérilisé 15 min à 110°C. La présence de gélatinase se traduit par une liquéfaction du milieu après incubation d'une à trois semaines à 20-25°C.

2.3.1.8. - MOBILITE

Le milieu (RC gélosé à 5 g par litre) réparti en tubes de 160 x 16, est inoculé par piqûre centrale dans les 48 heures suivant sa fabrication. La lecture est faite après 48 heures d'incubation à 30°C.

2.3.1.9. - REDUCTION DES NITRATES

Le milieu suivant est stérilisé 15 min à 121°C :

KNO <sub>3</sub>	1 g
HK <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
Mg SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
Eau distillée	1000 ml

pH 6,8

Après autoclavage, ajouter :

Mélange V	20 ml/l
Glucose à 20 p. 100	50 ml/l

Répartir en tubes de 160 x16, inoculer et incuber en agitation à 30°C.

Pour la révélation, ajouter :

1 ml d'acide sulfanilique (8 g pour 1000 ml d'acide acétique 5N)

1 ml d' $\alpha$ -naphtylamine (5 g pour 1000 ml d'acide acétique 5N)

Un virage au rose-rouge intense est noté +.

Un virage au rouge-noir avec précipité noir est noté ++.

#### 2.3.1.10. - OXYDATION-FERMENTATION

Le milieu RC est utilisé avec les suppléments suivants :

Bleu de Bromothymol	0,03 g par litre
Bacto agar Difco	3 g par litre
pH 7,2	

Après régénération (20 min au bain marie à 100°C) le glucose est ajouté et après stabilisation de la température à 44°C, on inocule par piqûre centrale, deux tubes par souche. Sur l'un des tubes, on coule 2 ml de paraffine stérile.

#### 2.3.1.11. - ROUGE CONGO

Le milieu RC avec les suppléments suivants :

CaCO <sub>3</sub>	2 g par litre
Rouge Congo	0,25g par litre
Bacto agar Difco	15 g par litre

est coulé en boîtes de Pétri et inoculé dans les 6 heures suivant sa fabrication. Pour chaque souche on réalise un isolement, de façon à obtenir des colonies séparées. On note, après six jours d'incubation à 30°C :

- d'une part la coloration des colonies : soit nulle à rosée, soit rouge nette, soit grise à noire,
- d'autre part la diffusion d'acides autour des colonies, traduite par un éclaircissement du milieu et un noircissement secondaire dûs à la destruction du carbonate de calcium.

#### 2.3.1.12. - DEGRADATION DES SUCRES

Le milieu suivant est stérilisé par filtration : (par litre)

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
$K_2 PO_4$	0,5 g
$NH_4 NO_3$	1 g
Mélange V	20 ml
Rouge de phénol	0,04g
Sucre	10 g

pH 7,2

Les sucres étudiés sont : glucose, mannose, mannitol, lactose. L'acidification du milieu notée + se traduit par un virage du rouge au jaune, après incubation à 30°C en agitation.

#### 2.3.1.13. - TEMPERATURE DE CROISSANCE

Ce test est fait sur milieu solide RC gélosé à 15 g par litre. Après trois jours on note + une croissance à 37°C, comparable à celle

obtenue dans le même temps à 30°C.

#### 2.3.1.14. - UREASE

Le milieu utilisé est celui de FERGUSON et HOOK stérilisé sur filtre. On note + le virage du jaune orangé au rose, d'une suspension épaisse de la souche dans 2 ml de ce milieu, après 2 h, 18 h et 4 jours d'incubation à 37°C.

#### 2.3.2. - RESULTATS

La plupart des recherches de physiologie menées jusqu'ici pour l'identification des Rhizobium ont visé à distinguer ceux-ci du genre très proche Agrobacterium. Ainsi HANDI (1969a, 224) propose un milieu au Bleu de Nil pour la détection des Agrobacterium. HAHN (1966, 225) propose un milieu au rouge congo pour l'identification de A. tumefaciens. HOFER (1941, 226) propose des tests (brunissement d'un milieu au glycérophosphate de calcium, production de H<sub>2</sub>S sur milieu de ZO BELL, utilisation de l'acide urique, croissance à pH 11-12) pour l'identification de A. radiobacter, mais la réponse des Rhizobium à ces tests n'est pas homogène. BERNAERTS et DE LEY (1963, 227) ont proposé, pour l'identification des Agrobacterium, de rechercher la production de 3-céto-lactose à partir du lactose. Toutefois, il existe des souches de Rhizobium capables d'effectuer cette oxydation (DE LEY, BERNAERTS, RASSEL et GUILMOT, 1966, 228). Il existe également des Agrobacterium incapables

d'effectuer cette transformation (DE LEY et col., 1966, 229).

Ces recherches sont donc surtout utiles pour l'identification des Agrobacterium. D'autres études ont eu pour but, sans succès semble-t-il, de mettre en relation le comportement symbiotique et une propriété biochimique particulière, comme la production de vitamine B12 (DAMERY et ALEXANDER, 1969, 230), l'activité catalasique (ANDRIJENKO, 1967, 231) ou la formation d'acide  $\beta$ -indolyl-acétique (CHEN, 1938, 232) (GEORGI et BEGUIN, 1939, 233).

Certains auteurs ont enfin cherché à distinguer des groupes physiologiques différents dans le genre Rhizobium, mais les caractères étudiés, comme la dégradation des sucres (MANNINGER, 1962, 234) ont montré une très grande variabilité et la classification qui pourrait être proposée d'après ces critères, ne correspond ni à celle fondée sur la spécificité d'hôte ou sur les réactions sérologiques, ni aux groupes lysotypiques (STANIEWSKI, 1970, 235) ni à ceux qui sont basés sur l'homologie de DNA (DE LEY et col., 1965, 236 ; 1966, 237) (HEBERLEIN et col., 1967, 238).

Par ailleurs, la complexité des milieux sélectifs (GRAHAM, 1969, 239) et la variabilité des réactions jusqu'ici proposées, ne permettent pas actuellement de fonder valablement la détermination des Rhizobium sur une autre méthode que la nodulation.

Nous avons donc cherché à utiliser, outre les caractères très variables (sucres), pouvant servir uniquement au repérage des souches, un ensemble de critères auxquels la réponse des Rhizobium soit uniforme (à travers tout le genre ou pour certains groupes) et toujours différente de celle, non seulement des Agrobacterium, mais aussi des autres genres rencontrés fréquemment lors de l'isolement des Rhizobium des nodules.

C'est ainsi qu'après des réactions très générales : Gram, type respiratoire, température de croissance, mobilité, oxydation-fermentation, nous avons étudié des réactions souvent utilisées en détermination pour leur netteté : production d'uréase, gélatinase, cyt. oxydase, catalase, utilisation des citrates, production de nitrites, d'hydrogène sulfuré, catabolisme du tryptophane.

Parmi les réactions de différenciation entre Agrobacterium et Rhizobium, nous n'avons retenu que le test du rouge congo préconisé par HAHN (1966, 240).

Des essais préliminaires, menés sur Rhizobium trifolii (3 souches) et Rhizobium phaseoli (1 souche), ont montré que les milieux habituels d'analyse bactériologique (Kligler, citrates Simmons et Christensen, etc...) riches en peptone et NaCl, inhibaient la croissance de nombreuses souches de Rhizobium. Pour obtenir une croissance convenable, nous avons été obligé de mettre au point un milieu dont la source d'azote et de facteurs de croissance est l'extrait de levure à 1 p. 1000 (milieu RC). L'addition d'autres sources d'azote réduit toujours la croissance, comme on peut le constater sur le tableau IV.

TABLEAU IV

TEMPS DE GENERATION, EN PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE, DE R. TRIFOLII  
ET R. PHASEOLI EN PRESENCE DE DIVERSES SOURCES D'AZOTE

RC	4 à 5 heures
RC + Casaminoacids (4 g par litre)	(inhibition)
RC + Néopeptone (4 g par litre)	(inhibition)
RC + Extrait de viande de boeuf (4 g par litre)	(inhibition)
RC + Protéose peptone 3 (4 g par litre)	(inhibition)
RC + Trypticase (4 g par litre)	7 à 8 heures
Nutrient broth + glucose (10 g par litre)	(inhibition)

Cette observation ne s'applique pas aux souches de Luzerne. A cause de cette inhibition nous avons été amené, pour permettre une bonne croissance de toutes les souches, lors d'essais de détection d' $H_2S$ , à réduire la concentration en protéines (4 g par litre de trypticase au lieu de 15 à 20 g de peptone dans les milieux habituels). Toutefois, à cette concentration, la quantité de soufre utilisable est très réduite et on obtient un virage en 24 heures avec Proteus hauseri, mais non en dix jours avec Xanthomonas ou Agrobacterium.

Deux autres milieux ont été essayés pour lesquels les résultats ont également été négatifs :

	(1)	(2)
Eau distillée	1000 ml	1000 ml
$\text{HK}_2 \text{PO}_4$	0,5 g	0,5 g
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g	0,2 g
Yeast extract Difco	1 g	1 g
Glucose	10 g	10 g
Bacto-peptone	3 g	-
Trypticase	2 g	-
Cystéine	0,5 g	0,1 g
Thiosulfate de Na	1 g	0,1 g
Sulfate ferreux	0,2 g	-
Citrate ferrique ammoniacal	-	0,5 g
Agar	5 g	5 g

Des essais de révélation par des papiers imprégnés de nitrate de Pb ou de Bi, en remplacement de l'addition de sulfate ferreux ou de citrate ferrique ammoniacal aux milieux de culture, ont été également négatifs. Les résultats de ces tests n'ont donc pas été rapportés.

Par ailleurs, quelques souches sont prototrophes (T1S) mais d'autres exigent des vitamines pour leur croissance en milieu minimum (biotine, riboflavine et cobalamine pour la souche 1-99, biotine et thiamine pour la M5S, biotine pour la plupart des autres souches). Tous les milieux minimum utilisés ont donc été complétés avec un mélange de sept vitamines (mélange V) inspiré de LOCHHEAD et BURTON (1957, 241) ; certaines souches étant inhibées par de fortes concentrations en acide folique et riboflavine, celles-ci ont été réduites.

Un des tests les plus intéressants est l'aptitude à former des bactéroïdes en conditions artificielles. Nous l'avons pratiqué de la manière suivante :

Des cultures d'une semaine sur RC additionné de 2,5 p. 1000 d'extrait de levure sont examinées après coloration de Gram ; on note la présence de formes anormales dites "bactéroïdes artificiels", semblables aux bactéroïdes présents dans les nodules. Leur aspect est variable et consiste en boursouflures ou déformations (formes en X ou Y) et leur taille est plus grande que celle des cellules normales, obtenues sur milieu contenant 1 p. 1000 d'extrait de levure. Les bactéroïdes ont généralement un aspect cloisonné dû à la présence de granules d'acide poly- $\beta$ -hydroxybutyrique ne prenant pas la fuschine (FORSTYTH et col., 1958, 242) (photo 2 page 58).

Nous avons également obtenu la formation de bactéroïdes par culture en présence d'alcaloïdes à forte concentration (quinine, sulfate; strychnine, sulfate ; spartéine, sulfate, 10 mg/ml).

La grande majorité des souches étudiées sont aérobies, plus ou moins strictes. Seules quelques unes sont aérobies facultatives (Erwinia, P4S, etc...). En absence de glucose, la tension d'oxygène nécessaire à l'optimum de croissance diminue et la plupart des souches apparaissent alors microaérophiles.

La production d'AIA est sujette à d'assez grandes variations ; cependant, une réaction faiblement positive reste facilement lisible. Toutefois, comme certaines souches réduisent les nitrates en nitrites et



Photo 1 : Cellules normales de Rhizobium phaseoli (P7S).  
Milieu : RC. Coloration de Gram. Age : 48 heures  
(X 1000)



Photo 2 : "Bactéroïdes artificiels" de Rhizobium phaseoli (P7S). Milieu : RC + 2,5 p.1000 d'extrait de levure. Age : 6 jours. Coloration : Fuschine basique. (X 1000)

que ceux-ci catalysent la destruction de l'AIA (TONHAZY et PELCZAR, 1954, 243) le nitrate d'ammonium pourrait avantageusement être remplacé par de l'extrait de levure, dans lequel nous n'avons pas décelé d'AIA.

Par contre, la recherche de l'indole à partir du même milieu que l'AIA ne peut être retenue, le réactif nitrique-nitreux révélant l'AIA comme l'indole. D'autre part, avec le réactif de Kovac's, beaucoup plus spécifique et sensible, les résultats obtenus ne sont pas interprétables : certaines souches sont AIA<sup>+</sup>, Indole<sup>+</sup>, d'autres AIA<sup>-</sup> Indole<sup>-</sup> et divers témoins Indole<sup>+</sup> (Proteus morganii, E. coli) ont parfois donné une réaction négative, ceci étant dû apparemment à des déviations du métabolisme provoquées par la concentration importante de tryptophane employée. La recherche de l'indole devrait être pratiquée sur eau peptonée, mais la plupart des souches sont incapables de se développer sur un tel milieu.

L'utilisation des citrates donne lieu à une réaction très nette, positive avec Proteus hauseri (citrate<sup>+</sup>). Certaines souches sont capables d'utiliser le citrate en présence d'un peu de glucose, assurant un début de croissance, mais presque toutes les souches produisant des bactéroïdes sont incapables d'utiliser le citrate comme seule source de carbone, à l'exception des souches V 13 S, X 10 S, X 26 S, X 7 S et X 18 S.

La recherche de l'activité de la cytochrome-oxydase et de la catalase, ne montre aucune relation entre leur présence et la production de bactéroïdes ou la nodulation (souches T 1 S, T 2 S, T 7 S, T 8 S et

T 31 S). D'autre part, l'abondance de mucus gêne souvent la lecture du papier réactif pour la cytochrome-oxydase.

Dans nos essais, aucune des souches ayant produit des bactéroïdes ou des nodules n'a provoqué la liquéfaction de la gélatine, malgré une croissance abondante et une incubation portée à six semaines.

La réduction des nitrates en nitrites est variable à l'intérieur du genre Rhizobium (T 1 S, T 7 S, T 8 S, T 31 S et 20-1) et n'est pas liée à la production de bactéroïdes ; cette réaction peut conduire à toutes les colorations intermédiaires entre le rose pâle et le rouge avec précipité noir. Aucune souche n'a libéré d'azote moléculaire.

Le milieu oxydation-fermentation utilisé est semblable à celui préconisé par HUGH et LEIFSON (1953, 244), mais dépourvu de protéines et de NaCl. Toutes les souches ayant produit des bactéroïdes ont oxydé ce milieu plus ou moins nettement, mais aucune ne l'a fermenté.

Pour le test au rouge congo, l'addition de  $\text{CaCO}_3$ , la nature du sucre (glucose), sa concentration et la concentration d'extrait de levure ont été modifiées par rapport aux propositions de HAHN (1966, 245). La production d'acides, parfois abondante (souches de Luzerne) peut ainsi être décelée par l'apparition d'un halo clair autour des colonies. Cette production n'est pas en relation avec celle de bactéroïdes ni avec la nodulation.

Liée à la production d'acides, une coloration grise ou noire peut apparaître chez les souches muqueuses. Par contre, chez Agrobacterium tumefaciens, apparaît sans production d'acide, une coloration rouge très nette, absente chez Agrobacterium radiobacter.

La production d'acides à partir des sucres apparaît très variable, confirmant les résultats de MANNINGER (1952, 245). Aucun

regroupement entre souches ne nous semble possible, d'autant que les réactions sont généralement peu franches.

La dégradation du mannitol, étudiée en milieu synthétique, ne permet pas de retrouver la distinction de NORRIS (1965, 247) entre Rhizobium acidifiants et alcalinisants.

Toutes les souches de Rhizobium et celles qui ont produit des bactéroïdes possèdent une uréase, apparaissant parfois tardivement, mais aucune souche restée urée  $\bar{}$  après six jours, n'a donné de bactéroïdes. Les résultats des tests d'inoculation et des tests biochimiques et physiologiques sont consignés dans le tableau V.

TABEAU V

CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES, PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES

DES SOUCHES

Légende

<u>Mucus</u> :	C	coulant
	++	très muqueux, non coulant
	+	muqueux
	S	non muqueux, type smooth
	R	non muqueux, type rough
<u>Couleur</u> :	i	sans couleur
	b	blanc
	j	jaune
	or	orangé
<u>Transparence</u> :	ir	irisé
	op	opaque
	tl	translucide
	tp	transparent
	br	brun par transparence
<u>Rouge Congo</u> :	C	coloration
	R	rouge
	G	gris
	N	noir
	O	sans coloration
	A	Acide
	O	pas d'acide libéré
	+	diffusion d'acide limitée aux colonies
	++	diffusion dans toute la boîte
<u>Aérobiose</u> :	Aè	Aérobie
	Af	Aérobie facultatif
<u>Culture à 37°C</u>	+	croissance nette, comparable à celle obtenue à 30°C
<u>Uréase</u>	+++	positif après 2 heures
	++	positif après 18 heures
	---	positif après 4 jours
	---	négatif après 6 jours
<u>Hugh et Leifson modifié</u> :		
(H.-L. m.)	A	alcalinisant
	O	oxydant
	N	inerte
	F	fermentant

Légende (suite)

<u>Sucres</u>	G	glucose
	m	mannitol
	M	mannose
	L	Lactose
	+	virage (acidification)
	( )	réaction peu nette.

Originedes souches :

}	souches provenant du même nodule
	souches provenant de la même plante

<u>Nodulation</u> :	Tr-Tp	: <u>Trifolium repens</u> L. et <u>Trifolium pratense</u> L. ( en tubes et en pots ; milieu : RAGGIO & RAGGIO )
	Zs	: <u>Medicago sativa</u> L. ( mêmes techniques)
	Ns	: <u>Pisum sativum</u> L.
	Fs	: <u>Faba vulgaris</u> Moench. } (en pots ; milieu : RAGGIO & RAGGIO )
	Pv	: <u>Phaseolus vulgaris</u> L. }
	Ys	: <u>Onobrychis sativa</u> Lam. ( en pot, milieu : NICOL & THORNTON )
	+	: nodulation efficiente.
	x	: nodulation inefficente.
	-	: pas de nodulation.
	+ -	: résultats variables selon la variété végétale.

Groupes

<u>physiologiques</u> :	I	<u>Rhizobium</u> certain.
	II	<u>Rhizobium</u> très probable.
	III	indéterminé.

No	Nom ou (plante d'origine)	Mucous	Couleur	Transpa- rence	Catalase	Cyt-Oxydase	Mobilité	Congo C	Rouge A	Aérobiose	Citrate		Uréase	H.-L. m.	Nitrate Gelatinase	A I A	Sucres M <sup>L</sup> G <sup>m</sup>	Bactéroïdes	Origine des souches	Ns Pr-Pp	Zs Fs	Groupe physiologique	
											C	S											
W1S	Agrobacterium tumefaciens B <sub>6</sub>	++	i-b	tl-op	+	+	+	R	O	Aé	++	++	+	O	+	+		-					
W2S	Erwinia phytovora typ. ....	R	i-b	tl-br	-	-	-	O	++	Af	++	++		O	F	-		-					
W3S	Xanthomonas phaseoli .....	S	i-j	br	+	-	+	O	+	Aé	-	-		F	-			-					
W6S	Agrobacterium radiobacter ..	++	i-b	tl-op	+		+	O	O	Aé	++	++	+	N	++	+		-					
Z1S	Pseudomonas fluorescens ....	S	b	br		+	+	N	++				-	O	-			-					
Z2S	Achromobacter sp. ....	R	i	op	+	+	-	O	O	Af	+	+	+	A	(+)	-		-					
Z3S	Chromobacterium sp. ....	S	violet	op	+		(+)		O	Af	+	+	-	(F)	++	+		-					
Z5S	Arthrobacter C89 .....	S	b	op														-					
Z6S	Azotobacter sp. ....	++	i-b	tl-op														-					
T1S	} (Trifolium repens L.) .....	C	b-i	tl-op	-	-	+	O	O	Aé	-	-	-	O	+	+	+++	+	} 	+		I	
T2S		C	b-i	tl-op	-	+	+	O	+	Aé	-	-	-	O	-	+	+++	+		+	+	I	
T7S		(Trifolium incarnatum L.)..	++	b-i	tl-op	+	-	+	O	O	Aé	-	-	-	(O)	-	+	+++		+	+	+	I
T8S		(Trifolium pratense L.) ...	C	b-i	tl-op	+	-	+	O	O	Aé	(+)	-	-	(O)	-	+	+++		+	+	+	I
T20S		(Trifolium procumbens L.) .	++	b-i	tl-op	(+)		+	O	O	Aé	-	-	-	O	+	+	+++		+	+	+	I
T24S		(Trifolium alexandrinum ).	++	b-i	tl-op	+		+	O	O	Aé	-	-	-	O	(-)	+	+++		+	+	+	I
T30S		(Trifolium fragiferum L.)..	++	b-i	tl-op	+		+	O	O	Aé	-	-	-	O	-	+	+++		+	+	+	I
T31S		(Trifolium repens L.) ....	C	b-i	tl-op	-	+	+	G	+	Aé	(+)	-	-	O	-	+	+++		+	+	+	I
L1S	} (Faba vulgaris Moensch.)...	C	i-b	tl-op	+		+	G	O	Aé	-	-	-	N	++	+	+++	+	} 	X	X	I	
L2S		C	i-b	tl-op	-	+	+	G	O	Aé	-	-	-	O	-	+	+++	+		-	+	I	
L3S	} (Pisum sativum L.) .....	C	i-b	tl-op	+		+	O	O	Aé	-	-	-	N	-	+	+++	+	} 	+	X	I	
L4S		C	i-b	tl-op	-	+	+	O	O	Aé	-	-	-	O	-	+	+++	+		+	+	I	
L5S	} (Vicia sativa L.) .....	C	i-b	tl-op	-	(+)	+	G	O	Aé	(-)	-	-	O	-	+	+++	+	} 	+	+	I	
L6S		C	i-b	tl-op	-	+	+	G	O	Aé	(-)	-	-	O	-	+	+++	+		-	+	I	
M2S	} (Medicago sativa L.) .....	C	i-b	tl	+	(-)	+	N	++	Aé	-	-	+	O	-	+	+++	+	} 			I	
M3S		C	i-b	tl	+	+	+	N	++	Aé	-	-	+	(O)	-	(+)	+++	+		+	+	I	
M4S		C	i-b	tl	+	+	(+)	N	++	Aé	-	-	+	(O)	-	(+)	+++	+		+	+	I	
M5S		C	i-b	tl	+		+	G	++	Aé	-	-	+	O	-	++	+	+++		+	+	+	I
M6S	(Medicago falcata L.) .....	S	b-i	op	+		(+)	R	O	Aé	+	+	-	O	-	++	+	+++	-			III	
20-1	(Medicago sp.) .....	S	b-i	op	+	-	+	O	++	Aé	-	-	+	O	-	+	+++	+				I	

308  
1111

N°	Nom ou (plante d'origine)	Mucus	Couleur	Trans- parence	Catalase	Cyt-Oxydase	Mobilité	Congo C	Rouge A	Aérobiose	Citrate	37°C	Uréase	H.-L. M.	Gélatinase	Nitrate	A I A	Sucres	Bactérodes	Origine des souches	Pv	Tr-Tp	Zs	Ns	Groupe physiologique
P1S	.....	C	i-b	tl-op	-	+	+	O	O	Aé	-	-	++	N	-	(+)	+	+	+	+	+	+	+	I	
P2S	.....	C	i-b	tl-op	+	+	+	O	O	Aé	-	-	++	O	-	-	+	+	+	+	+	+	+	I	
P3S	.....	C	i-b	tl-op	-	+	+	G	O	Aé	-	-	++	O	-	-	+	+	+	+	+	+	+	I	
P4S	(Phaseolus vulgaris L.)	S	b	br	-	-	-	N	+	Af	+	+	---	F	-	+	+	+	+	+	+	+	+	III	
P5S	.....	C	i-b	tl-op	-	+	+	O	O	Aé	-	-	++	O	-	+	+	+	+	+	+	+	+	I	
P6S	.....	C	i-b	tl-ir	+	+	+	O	O	Af	+	-	++	N	-	-	+	+	+	+	+	+	+	III	
P7S	.....	C	i-b	tl-op	-	+	+	G	O	Aé	-	-	++	O	-	+	+	+	+	+	+	+	+	III	
P8S	.....	C	i-b	tl-op	-	+	+	O	O	Aé	-	-	++	O	-	+	+	+	+	+	+	+	+	I	
V2S	(Arachis hypogea )	++	j-or	tl-op	+	(-)	+	O	O	Af	+	+	++	A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	III	
V13S	.....	+	b-i	tl-ir	+	+	+	(G)	O	Aé	+	+	++	O	-	+	+	+	+	+	+	+	+	II	
X1S	(Lotus corniculatus L.)	..	i	tp	+	+	+	G	+	Aé	-	-	++	O	-	-	+	+	+	+	+	+	+	I	
X3S	(Sarothamnus scoparius Koch)	+	b-i	br	-	+	+	O	O	Aé	+	-	++	(O)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	III	
X3N1	.....	++	i-b	tl-ir	-	+	+	O	O	Aé	+	-	++	(O)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	III	
X4S	(Anthyllis vulneraria L.)	+	i	op	-	(+)	+	N	++	Aé	-	-	++	O	-	-	+	+	+	+	+	+	+	I	
X5S	.....	C	i	tl	+	+	+	N	++	Aé	+	-	++	O	-	+	+	+	+	+	+	+	+	III	
X7S	.....	C	b-i	tl-op	-	+	+	N	++	Aé	+	-	++	O	-	(+)	+	+	+	+	+	+	+	II	
X9S	(Cytisus laburnum L.)	...	i-b	tl-op	-	+	+	O	O	(Aé)	+	-	++	A	-	-	+	+	+	+	+	+	+	II	
X12S	.....	C	jj	tl-ir	-	+	+	G	O	Aé	+	+	++	(O)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	III	
X13S	.....	C	jj	tl-ir	+	+	+	G	O	Aé	+	-	++	A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	III	
X14S	(Sarothamnus scoparius Koch)	++	i	op	+	+	+	O	O	Aé	+	-	++	(N)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	I	
X16S	.....	S	jj	tl	-	+	+	O	O	Aé	-	-	++	(N)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	III	
X17S	.....	++	j-b	tl-ir	-	+	+	N	(+)	Aé	-	-	++	O	-	-	+	+	+	+	+	+	+	III	
X18S	.....	++	b-i	tl-ir	-	+	+	N	O	Aé	+	-	++	O	-	-	+	+	+	+	+	+	+	II	
X20S	(Lotus uliginosus L.)	...	i	tp	+	+	+	O	O	Aé	-	-	++	N	-	-	+	+	+	+	+	+	+	I	
X21S	(Genista tinctoria L.)	...	b-i	op	-	+	+	O	O	(Aé)	+	-	++	A	-	-	+	+	+	+	+	+	+	II	



N°	(Plante d'origine)	Tr-Tp	Ys	Ns	Origine des souches	Bactéroïdes	Sucres <sup>M</sup> <sub>G</sub> <sup>L</sup> <sub>m</sub>	A I A	Nitrate	Gélatinase	H.-L. m.	Uréase	37°C	Citrate <sup>S</sup> <sub>C</sub>	Aérobiose	Rouge Congo <sup>A</sup> <sub>C</sub>	Mobilité	Cyt-Oxydase	Catalase	Transparence	Couleur	Mucus		
K15	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C	
K28	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K33	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K45	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K55	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C
K68	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C
K79	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K88	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C
K108	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K128	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K138	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S
K145	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K158	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C
K265	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K308	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K328	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K329	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K348	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K358	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C
K368	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C
K378	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K388	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S
K408	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C
K468	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K508	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C
K538	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K548	.....					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C
1-99	(Lupinus luteus L.)					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S
J18	(Onobrychis sativa Lam.)					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
J28	(Onobrychis sativa Lam.)					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C

305  
LILLE

2.3.3. - DISCUSSION

Au cours de l'isolement des souches, nous avons éliminé tous les cocciformes et bâtonnets retenant la coloration de Gram. De tels bacilles Gram <sup>+</sup>, sporulés sont très fréquents dans les nodules de Sarothamnus scoparius.

Nous n'avons généralement retenu qu'une souche par nodule (souche unique ou nettement majoritaire). Quand plusieurs souches ont été isolées d'un même nodule en quantité comparable, toutes ont été étudiées. Ainsi, proviennent d'un seul nodule :

X 3 S et X 3 N1

X 4 S et X 5 S

K 30 S, K 32 S et K 33 S

K 53 S et K 54 S

Les souches (T) isolées de Trèfles sont toutes semblables. 8 ont été examinées pour leurs caractères physiologiques. Sur les 34 qui ont été isolées, toutes celles qui ont été testées (T 1 S à T 24 S, T 30 S et T 31 S) provoquent l'apparition de nodules sur Trifolium pratense et Trifolium repens. Les six isolées de Pisum sativum, Vicia sativa et Vicia faba (L 1 S à L 6 S) provoquent la nodulation de leur hôte et ont été étudiées pour leur physiologie. Les 5 souches isolées de Luzernes (M 2 S à M 6 S) et la souche 20-1 (non muqueuse) aimablement fournie par HEUMANN (\*) ont été étudiées pour leur physiologie. Toutes nodulent sauf la M 6 S (non muqueuse).

---

(\*) : Pr. Dr. W. HEUMANN, Institut für Mikrobiologie  
der Universität ERLANGEN-NURNBERG. 852 Erlangen, Friedrichstraße 33

Sur les 8 souches isolées de haricots, deux ne nodulent pas et leurs colonies diffèrent des autres. Toutes ont été examinées par les tests physiologiques.

Parmi les 55 souches isolées de Lupin, contrairement aux plantes précédentes, nous avons observé une grande variété dans l'aspect des colonies. Les nodules, pérennes, de ces plantes vivaces semblent pouvoir être envahis par des microorganismes étrangers et l'identification des Rhizobium parmi ceux-ci peut être difficile. 27 de ces souches représentant toutes les souches à colonies différentes et la souche 1-99, fournie par HEUMANN, ont été testées pour leurs caractères physiologiques. La souche 1-99 ne forme pas de nodules (HEUMANN, communication personnelle). Les propriétés symbiotiques des 27 autres souches n'ont pas été testées.

Nous avons également inclus dans les tests de physiologie, 19 souches isolées de plantes diverses. Seule une souche de Sainfoin (J 1 S) a été testée sur la plante d'origine et a provoqué l'apparition de nodules (sur 1 des 3 plantes inoculées). Pour les autres souches testées sur leur plante hôte (X 1 S sur Lotus corniculatus, V 2 S et V 13 S sur Arachis hypogea) le défaut de nodulation peut venir des conditions de culture aussi bien que des souches. Les 19 souches "diverses" ont été passées sur Trèfle, Luzerne, Pois et Haricot. Deux souches (X 9 S et X21 S) ont formé des nodules sur Haricot. Les souches utilisées comme témoins dans les tests physiologiques sont :

ORIGINE

<u>Agrobacterium tumefaciens B6</u>	Institut Pasteur de Paris
<u>Agrobacterium radiobacter</u>	Mlle KURKDJAN (*)
<u>Arthrobacter sp.</u>	BLONDEAU (**)
<u>Chromobacterium sp.</u>	Collection de l'Institut Pasteur de Lille
<u>Pseudomonas fluorescens</u>	
<u>Erwinia phytovora</u>	I.N.R.A.
<u>Xanthomonas phaseoli</u>	
<u>Achromobacter sp.</u>	Isolés au laboratoire
<u>Azotobacter sp.</u>	

Une des 75 souches étudiées pourrait appartenir à un des genres pris comme témoins. Il s'agit de la K 38 S qui présente quelque similitude avec Xanthomonas.

Parmi les 74 autres souches ne s'identifiant à aucune des espèces témoins, nous avons cherché à regrouper celles qui présentent les mêmes caractères. Etant données les modalités d'isolement utilisées, le groupe le plus important doit vraisemblablement correspondre au genre Rhizobium, surtout si dans ce groupe certains clônes sont capables de provoquer in vitro la nodulation.

On constate que les 8 souches isolées de Trifolium (sur 8), les 6 souches isolées de Pisum et Vicia (sur 6), 5 des 6 souches de Medicago, 6 des 8 isolées de Phaseolus, 11 des 28 de Lupinus, les 2 de Onobrychis et 5 des 15 isolées de plantes diverses, forment un groupe de 43 souches, très homogène pour les caractères suivants (groupe I) :

(\*) Service de Photomicrographie et Oncologie Végétale, Institut Pasteur de Paris.

(\*\*) Biologie Végétale, Université de Lille I

- Groupe I :

Mobilité (+), Gélatinase (-), AIA (+), Aérobiose (Aérobies), Uréase (+), Citrate S (-), Rouge Congo (défaut de coloration rouge) et température (défaut de croissance à 37°C, sauf pour les souches de Luzerne).

- Groupe II :

Il est formé de 8 souches (K 10 S, K 26 S, K 50 S, X 7 S, X 18 S, V 13 S, X 9 S, X 21 S) qui présentent les mêmes caractères que le groupe I, mais sont citrate (+).

Ces souches sont très proches d'Agrobacterium radiobacter, celle d'Arachide (V 13 S) étant même capable de croître à 37°C, fait compréhensible d'après son origine. Mais toutes les souches de ce groupe se distinguent d'Agrobacterium radiobacter par leur comportement sur milieu au Rouge Congo, leur aptitude à dégrader les sucres avec production d'acide ou d'autres caractères biochimiques ou, pour la plupart d'entre elles, par leur capacité de produire des bactéroïdes en conditions artificielles.

Nous proposons donc de réunir les groupes I et II en un seul, plutôt que de rattacher les 6 souches citrate (+) à l'espèce Agrobacterium radiobacter, malgré tout différente et dont nous n'avons même pas isolé une souche typique dans les nodules.

Il est intéressant de noter que les 51 souches des groupes I et II, identiques pour 7 caractères (citrate S exclus) constituent le groupe le plus nombreux, formant des colonies d'aspect semblable, généralement très muqueuses à coulantes et non pigmentées. Elles ont

en outre le même aspect microscopique et forment généralement des bactéroïdes en conditions artificielles. Enfin, les souches qui ont provoqué la formation de nodules se trouvent toutes dans ce groupe.

Pour deux caractères, les résultats obtenus ne concordent pas avec les observations d'autres auteurs : KERN (1965b, 248) cite en effet une souche capable dans certaines conditions, de liquéfier la gélatine ; SEN et col. (1969, 249) en citent trois. Par ailleurs, alors que nous observons des souches (8 sur 51) capables d'utiliser le citrate comme seule source carbone, KLECZKOWSKA et col. (1968, 250) n'en observent pas. Néanmoins, nous classons les souches du groupe I dans les Rhizobium certains et celles du groupe II dans les Rhizobium très probables.

La comparaison des souches des groupes I et II montre qu'il n'y a pas homogénéité pour la dégradation des quatre sucres étudiés, par groupe de plantes d'origine. Le petit nombre de souches examinées dans chaque groupe ne permet pas de faire de rapprochement d'après les autres caractères secondaires. On peut noter toutefois que le groupe (M) des souches isolées de Luzerne (M 2 S, M 3 S, M 4 S et 20-1) est assez différent des autres : croissance possible à 37°C, réaction rapide au test uréase, forte acidification du milieu au rouge congo, présence d'une catalase. Cette différence se retrouve dans l'aspect des colonies, dont le mucus est très abondant, fluide et translucide.

Les groupes (T, L, P et J) ne se distinguent ni par des caractères biochimiques, ni par l'aspect des colonies. Ces groupes et le groupe M, très homogènes, correspondent aux Rhizobium à croissance rapide, c'est à dire aux espèces Rhizobium leguminosarum et R. meliloti proposés par DE LEY et RASSEL (1965, 251), GRAHAM (1964, 252), MOFFLET et COLWELL (1968, 253), HEBERLEIN et col. (1967, 254).

Les souches des groupes I et II, provenant de Lupin, Arachide et autres plantes, forment un groupe moins homogène, comprenant tous les citrate (+). Egalement la présence de souches à croissance lente, nettement alcalinisantes, permet de penser que ce groupe correspond, au moins en partie, aux espèces : Rhizobium japonicum (DE LEY, RASSEL, 1965, 255) (HEBERLEIN et col., 1967, 256) alias Phytomyxa japonica (GRAHAM, 1964, 257) (MOFFLET et COLWELL, 1968, 258).

On peut observer également qu'aucune des souches isolées des nodules et appartenant au groupe I ou II n'est pigmentée ou non muqueuse et qu'un même nodule n'en a jamais fourni plus d'une.

- Enfin un groupe III :

Il comprend les 24 autres souches, presque toutes différentes entre elles et toujours différentes des souches des groupes I et II par plusieurs caractères biochimiques et par leur aspect microscopique. Aucune souche de ce groupe ne forme de bactéroïdes ou n'a provoqué la formation de nodules. Néanmoins, comme certaines étaient seules présentes et en grande quantité dans un (P 4 S, K 12 S) ou plusieurs nodules (K 7 S et K 30 S) et que notre étude ne permet pas de leur donner de nom, il nous est impossible de les exclure formellement du genre Rhizobium.

#### 2.4. - CONCLUSION

En conclusion, les résultats des tests d'infection nous ont permis de mettre au point une technique valable pour les Trèfle, Luzerne, Pois, Vesce et Haricot. Cette technique ne convient pas pour les essais

avec Lupin. Ces résultats nous ont également permis de confirmer l'identité de la plupart des souches isolées.

Les résultats des tests biochimiques et physiologiques nous ont fourni le moyen de reconnaître les Rhizobium sans avoir recours aux tests d'infection et le moyen de différencier les souches les unes des autres. Par contre, aucun regroupement par plante d'origine (sauf peut être pour les souches de Luzerne) n'a été possible.

Enfin, la comparaison des résultats des tests biochimiques et physiologiques et des résultats des tests d'infection ne permet de mettre en évidence aucune relation entre une aptitude symbiotique et un autre caractère naturel. C'est pourquoi nous avons entrepris de provoquer par mutation des différences - artificielles - entre clones et d'étudier l'effet de ces mutations sur les propriétés symbiotiques.

3.

CHAPITRE 3PHYSIOLOGIE

Les expériences d'obtention de mutants supposent la connaissance d'un certain nombre de propriétés physiologiques dont l'étude fait l'objet de ce chapitre.

En particulier la composition du milieu complet et les conditions de culture doivent être adaptées aux souches utilisées et permettre une croissance abondante et rapide.

L'obtention de mutants à déficiences métaboliques exige la mise au point d'un milieu synthétique, assurant également une bonne croissance. Ceci suppose la connaissance des exigences en facteurs de croissance de chaque souche.

Enfin, pour réaliser les expériences de génétique, il faut connaître la vitesse de croissance des souches sur les différents milieux et la correspondance entre la densité de germes et la densité optique des cultures.

3.1.- ENTRETIEN DES SOUCHES

Toutes les souches sont maintenues à - 20°C en milieu complet RC (page 46), additionné de 50 p. 100 de glycérol stérile dès que la croissance maximum est atteinte (QUADLING; 1960, 259).

A partir de ces cultures congelées, des repiquages sont effectués sur milieu solide complet, en tubes inclinés qui sont maintenus au réfrigérateur à + 4°C et utilisés pour les expériences. En outre, chaque souche est maintenue en suspension dans de la gélose pure à 7,5 p. 1000, en ampoule scellée, au réfrigérateur. Ce moyen doit permettre une conservation de deux années (HEUMANN, communication personnelle).

### 3.2. - MILIEU COMPLET

#### 3.2.1. - INFLUENCE DES SELS MINÉRAUX

Un grand nombre de milieux ont été proposés pour la culture des Rhizobium. Le plus souvent le milieu suivant ou un milieu analogue est utilisé (g/l) (LAIRD, 1932, 260).

<u>Milieu_YM</u> :	Mg SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,2
	HK <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
	NaCl	0,2
	CaCO <sub>3</sub>	0,5
	Mannitol	10
	Extrait de levure	1

La croissance obtenue sur ce milieu est représentée sur la figure 3, page 73

Une croissance identique a été obtenue sur le même milieu sans NaCl, avec la souche T 1 S.

La présence de calcium dans ce milieu entraîne la formation, lors de l'autoclavage, d'un précipité de phosphates de calcium, qui nuit aux lectures de densité optique. Aussi avons-nous supprimé le

carbonate de calcium de ce milieu. La croissance ainsi obtenue a été identique à celle obtenue sur le milieu de départ (figure 3). Ceci confirme les travaux de NORRIS (1958a, 261) selon lesquels les Rhizobium exigent du magnésium, mais pas de calcium. VINCENT (1962b, 262) a, par contre obtenu une croissance plus grande en présence de calcium. Toutefois, les observations répétées de certains auteurs : Mc CALLA (1937, 263), LONERAGAN et DOWLING (1958, 264), LOWTHER et LONERAGAN (1968, 265) selon lesquels certains Rhizobium, cultivés en présence de  $\text{Ca}^{++}$  forment plus de nodules que ceux cultivés sans  $\text{Ca}^{++}$ , permettent de penser que, pour certaines souches, le milieu où sont cultivés les germes destinés à inoculer des plantes, doit contenir du  $\text{Ca}^{++}$ .

Mc CALLA a également observé que pour des Rhizobium de Soja et Luzerne, cultivés sans calcium (et aussi sans magnésium) l'aspect des colonies et la stabilité des propriétés symbiotiques pouvaient varier. En deux ans, nous n'avons jamais observé de telles variations bien que nos milieux soient dépourvus de  $\text{Ca}^{++}$  (mais bien pourvus en  $\text{Mg}^{++}$ ). Par contre, l'absence de NaCl, favorable dans le cas des souches de Trèfle, est peut être légèrement nuisible aux souches de Luzerne (figure 8 page 82 ).

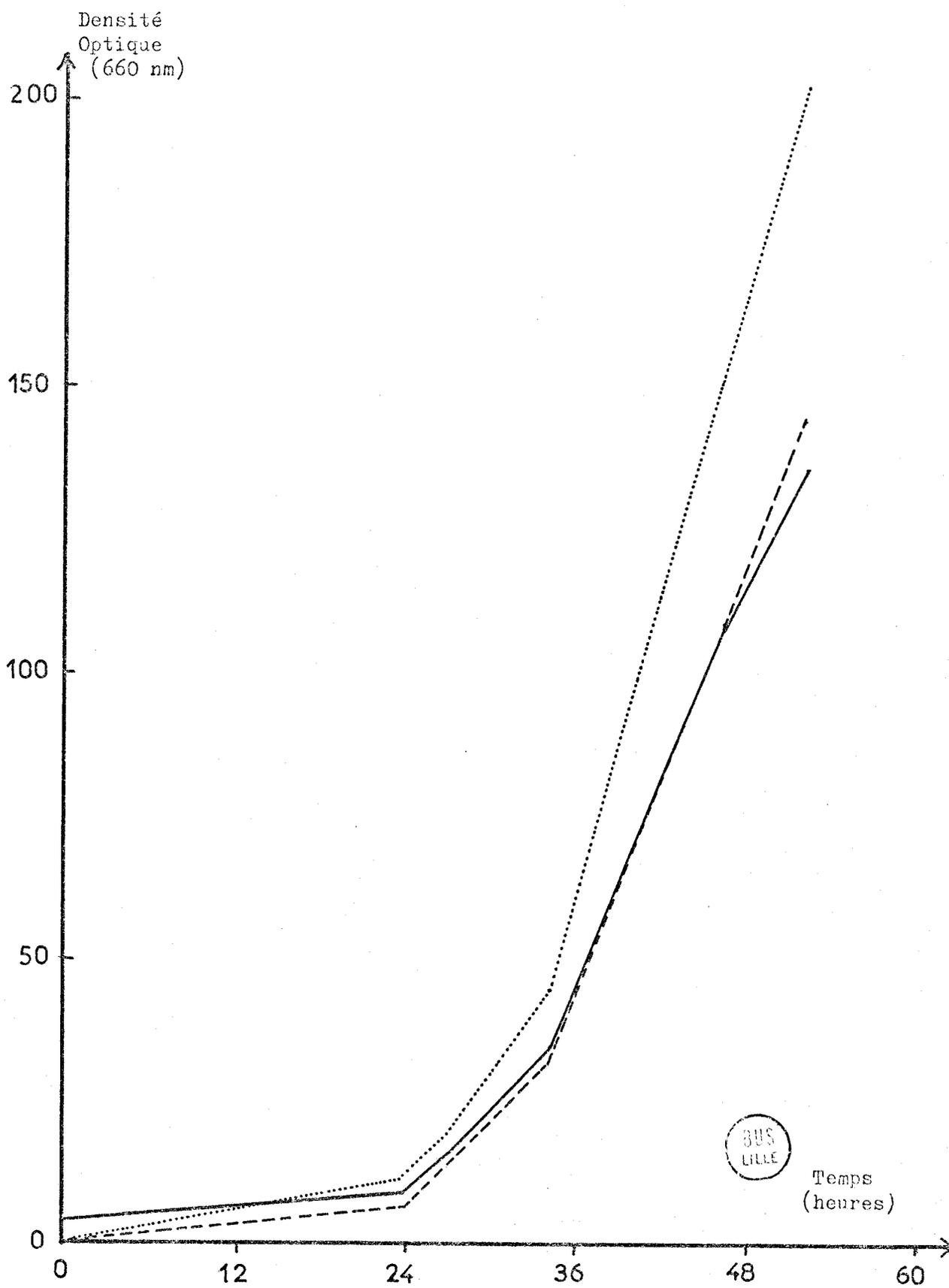
L'addition d'oligo-éléments (solution de HELLER) indispensables pour la nodulation (Molybdène en particulier) n'a aucun effet sur la croissance en culture pure, l'extrait de levure et les impuretés contenues dans les sels minéraux utilisés, suffisant probablement aux besoins en oligo-éléments.

FIGURE 3

## CROISSANCE COMPAREE DE RHIZOBIUM TRIFOLII (T1S)

Sur milieu YM avec Mannitol ..... ————  
 Sur milieu YM sans NaCl ni CaCO<sub>3</sub>, avec Mannitol.. - - - -  
 Sur milieu YM sans NaCl ni CaCO<sub>3</sub>, avec Glucose... ······

pH : 7,5. Culture de 100 ml en erlenmeyer de 300 ml, incubés à 30°C en agitation. Inoculum : environ  $2 \cdot 10^6$  cellules viables / ml.



### 3.2.2. - INFLUENCE DE LA SOURCE DE CARBONE

Il est généralement admis que le mannitol constitue la source de carbone la plus convenable pour l'isolement des Rhizobium parce qu'elle est la plus sélective (GRAHAM, 1959, 266) et que tous les Rhizobium à croissance lente et à croissance rapide l'utilisent facilement. Néanmoins, elle ne constitue la meilleure source de carbone pour aucun de ces deux groupes, les pentoses étant les sucres les mieux utilisés par les Rhizobium à croissance lente et le glucose convenant le mieux aux Rhizobium à croissance rapide (GOSTKOWSKA, 1966, 267).

Toutes les souches (sauf celles de Lupin) que nous avons utilisées dans la suite de nos expériences appartiennent au groupe à croissance rapide. Nous avons donc remplacé dans le milieu précédent, le mannitol par du glucose. L'augmentation de croissance obtenue pour les souches de Trèfle est portée sur la figure 3 page 73.

Le milieu Y4, sans NaCl ni Ca CO<sub>3</sub>, avec glucose, a été utilisé dans toutes les expériences qui suivent. Sa composition est donc (en g/l):

<u>Milieu RC</u> :	Mg SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,2
	K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
	Yeast Extract Difco	1
	Glucose	10
	pH après autoclavage : 7,2 environ	

### 3.2.3. - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DE L'AERATION

#### 3.2.3.1. - TEMPERATURE

Les Rhizobium de Haricot, Pois, Vesce, Fève, Trèfle, Sainfoin, Lupin, sont incapables de croître à 37°C. Seuls ceux de Luzerne le

peuvent. La vitesse de croissance augmente avec la température, mais à 31-32°C les souches de Trèfle ne croissent plus. Dans toutes les expériences qui suivent, sauf indication contraire, la température d'incubation a donc été de 30°C.

### 3.2.3.2. - AERATION

L'influence de l'aération des milieux liquides a été testée en erlens de 300 ml, contenant 100 ml de milieu. Les résultats pour deux souches de Trèfle (T 1 S et T 19 S) sont portés sur la figure 4, page 76.

### 3.3. - CROISSANCE SUR MILIEU COMPLET, RELATION AVEC LA DENSITE OPTIQUE

Dans les expériences suivantes, toutes les cultures ont donc eu lieu dans les conditions suivantes :

Milieu RC (100 ml en erlen de 300 ml)

Température : 30°C

Agitation : 100 aller-retour par min.

amplitude : 5 cm

Mesures de Densité optique (DO) à 600 nm exprimées en

centièmes d'unité (0 à 200) (Spectrophotomètre  
JEAN & CONSTANT)

Dans ces conditions, la croissance pour T 1 S (Trèfle) et M 5 N 1 (Luzerne) sont les suivantes (figure 5 page 77). On observe généralement :

FIGURE 4

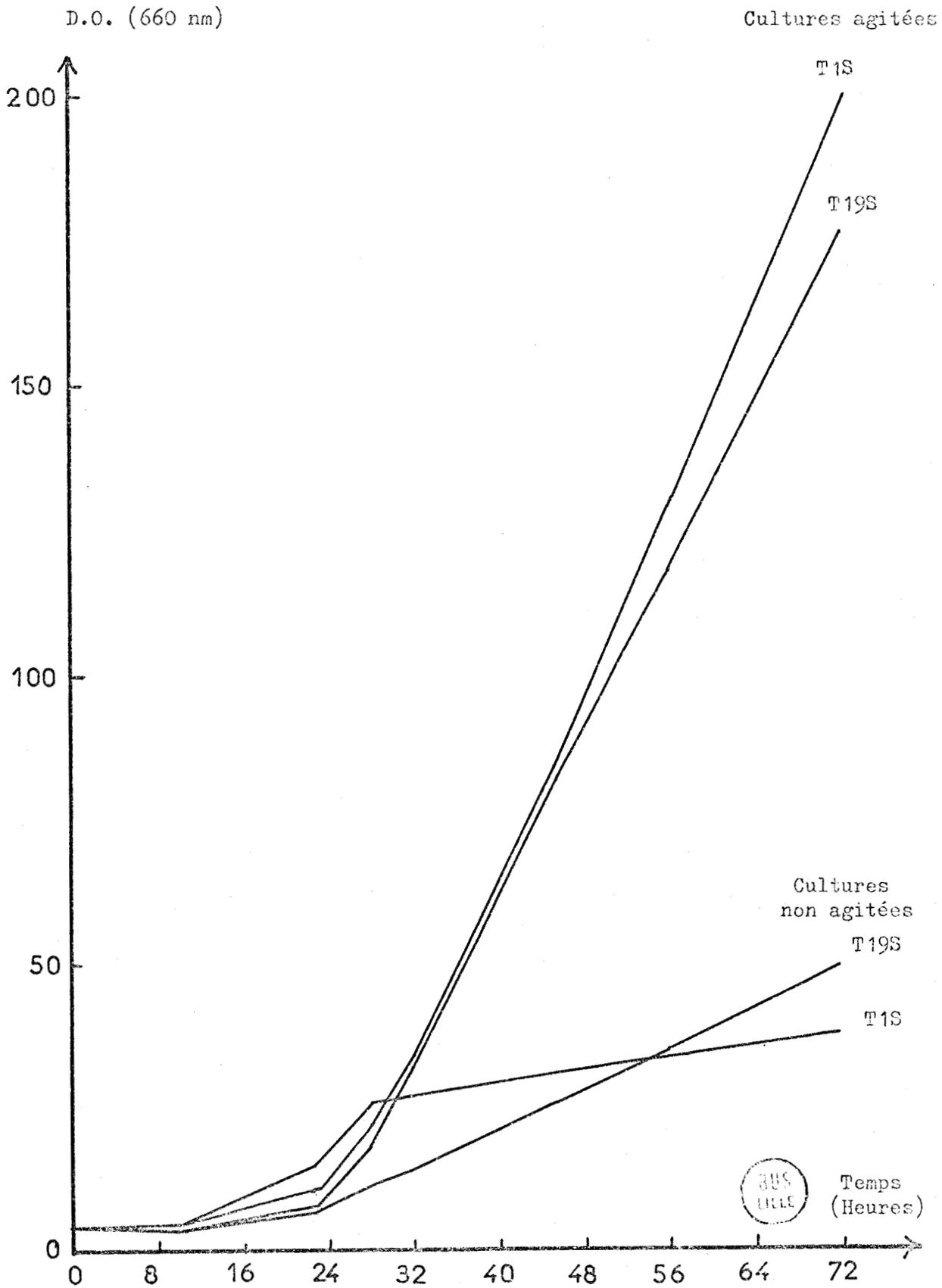
INFLUENCE DE L'AERATION DES CULTURES SUR LA CROISSANCE

DE RHIZOBIUM TRIFOLII

Souches : T1S et T19S

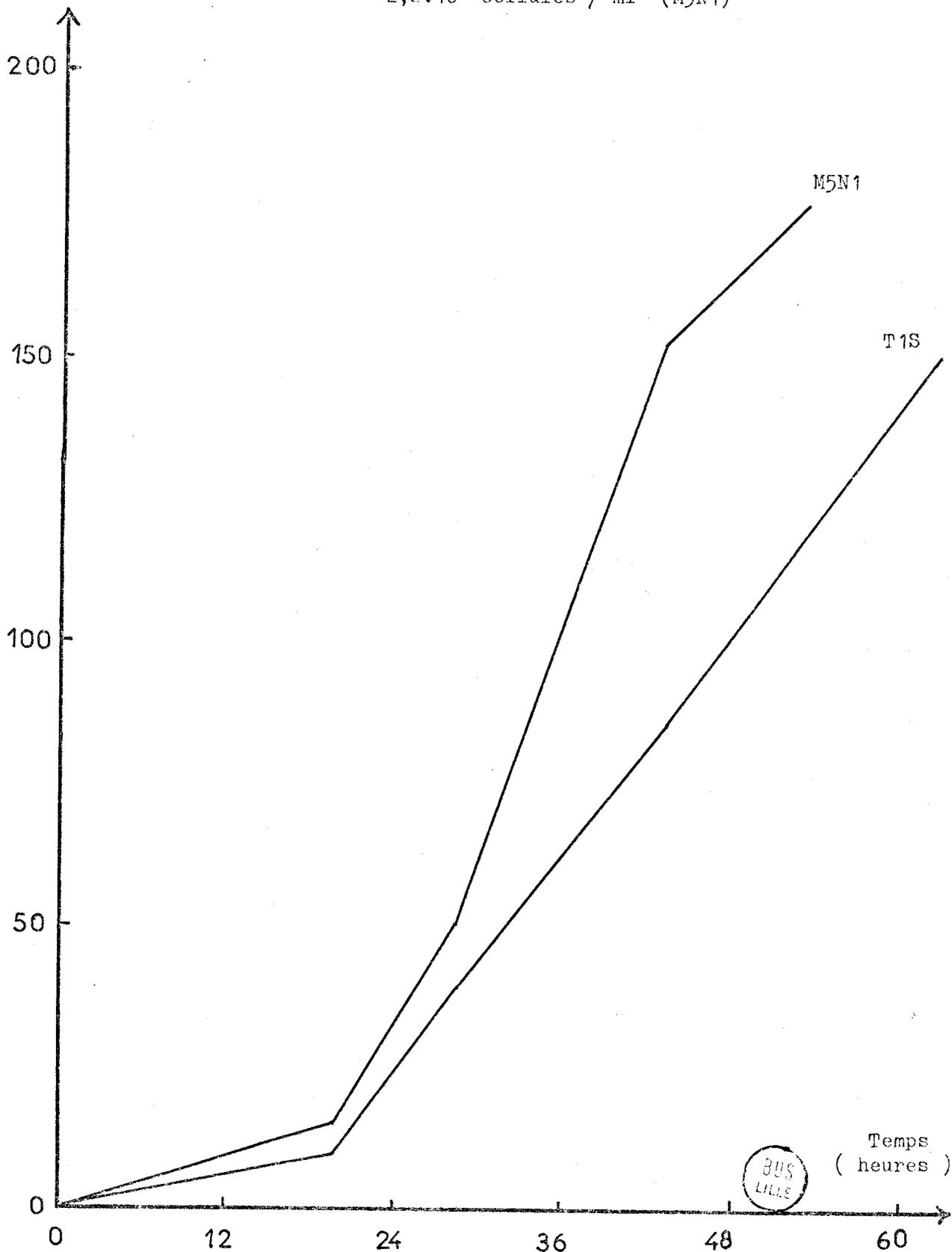
Milieu : YM

Inoculum : environ  $5 \cdot 10^4$  cellules viables / ml.



CROISSANCE DE RHIZOBIUM TRIFOLII (T1S) ET RHIZOBIUM MELILOTI (M5N1)

D.O. en cultures agitées, sur milieu RC, à 30°C.  
 (600 nm) Inoculum :  $4,5 \cdot 10^6$  cellules / ml (T1S)  
 $2,2 \cdot 10^6$  cellules / ml (M5N1)



1) Un temps de latence plus long (même à inoculum égal) pour les souches de Trèfle (24 h environ pour une culture diluée au 1/100°) que pour les souches de Luzerne.

2) Une phase exponentielle avec un temps de génération plus faible pour M 5 N 1 que pour T 1 S.

Toutes les souches de Luzerne ont un temps de génération plus faible que les souches de Trèfle, Pois, Vesce, Fève et Haricot.

Dans la plupart des cultures, il apparaît en fin de croissance exponentielle, des grumeaux de plus en plus importants qui gênent les mesures de DO.

Une correspondance a été établie entre la DO et le nombre de germes par ml, aux différents stades de la croissance (figure 6 page 79). La technique de numération est la suivante :

Dilutions successives : au 1/10 (0,5 ml dans 4,5 ml)

Milieu : base pour RC (RC sans glucose) ou  
base pour R (R sans glucose, milieu synthétique)

Étalements : 0,1 ml par boîte de milieu RC gélosé à 15 g/l, étalé à l'étaleur coudé.

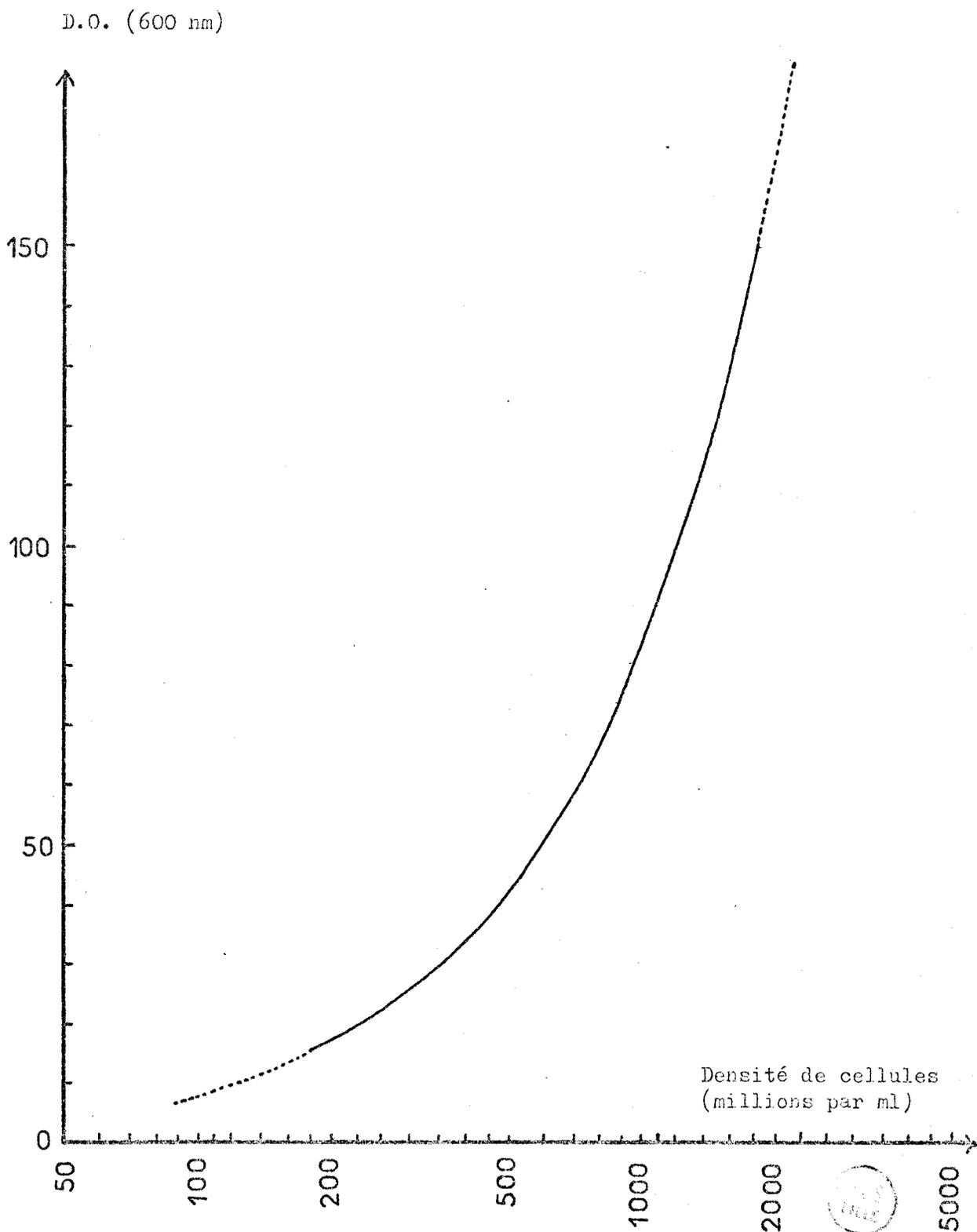
#### 3.4. - SOURCES ET TAUX D'AZOTE

Dans l'espoir d'augmenter la vitesse de croissance, l'influence du taux d'extrait de levure sur la croissance en milieu liquide, de la souche T 1 S, a été étudiée (figure 7 page 80). La croissance optimum a été obtenue avec 1 g/l d'extrait de levure. A la dose de 4 g/l, il y a induction de bactéroïdes artificiels, mais la croissance est inhibée.

## CORRESPONDANCE ENTRE DENSITE OPTIQUE ET DENSITE DE CELLULES

VIABLES DANS LES CULTURES DE RHIZOBIUM

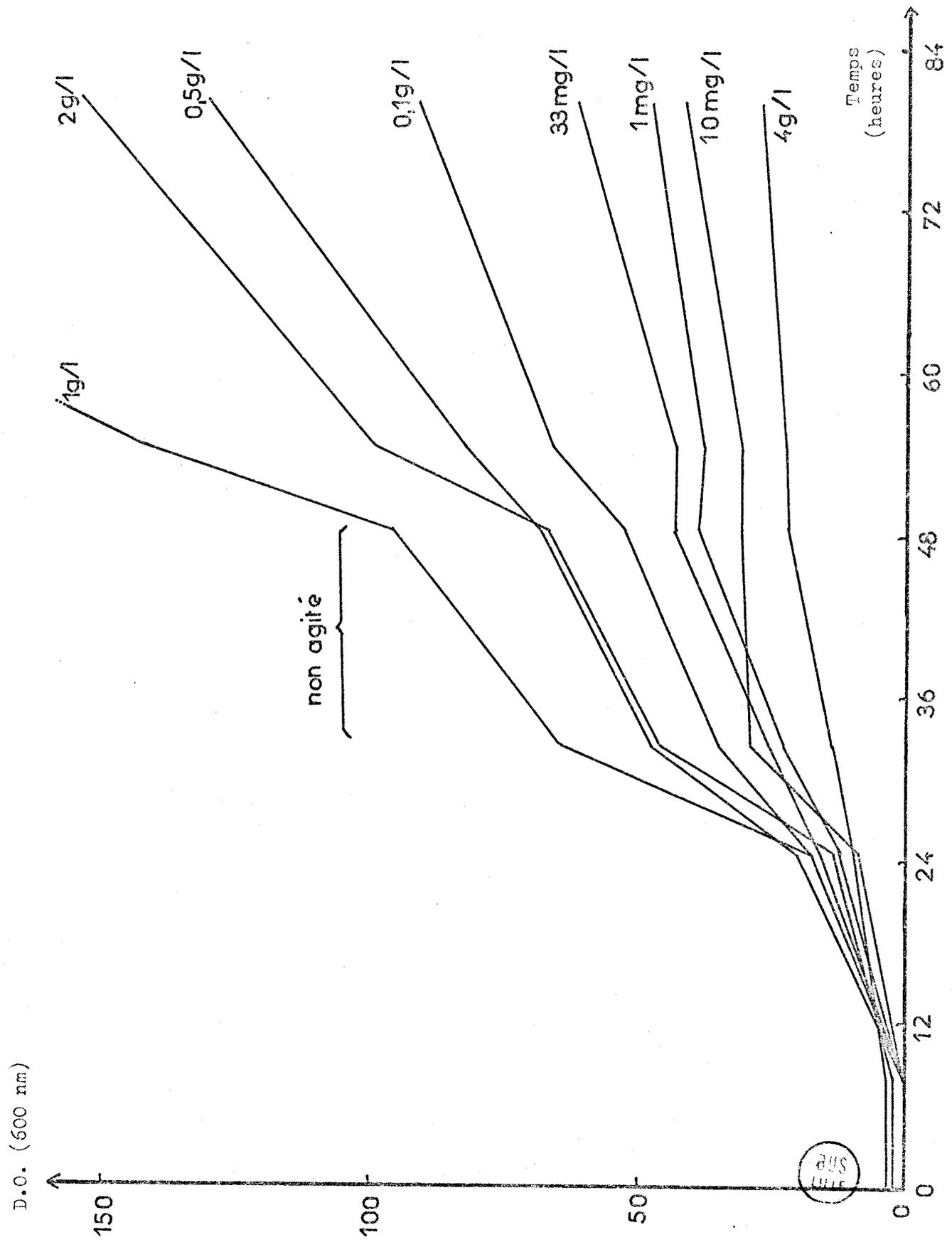
(Les numérations à D.O. < 15, avant la phase exponentielle de croissance, et à D.O. > 150, faussées par la présence de grumeaux, n'ont pas été prises en considération.)



INFLUENCE DE DIFFERENTES DOSES D'EXTRAIT DE LEVURE SUR LA  
CROISSANCE DE RHIZOBIUM TRIFOLIUM (T1S)

Milieu : RC

pH : 7,2



Ceci confirme l'opinion de ALMON (1933, 268) selon laquelle les bactéroïdes seraient incapables de se diviser.

L'extrait de levure est une source d'azote, mais aussi de vitamines (100  $\gamma$  de thiamine par gramme). Or, certains auteurs ont observé que des concentrations élevées de thiamine induisaient la formation de bactéroïdes (NAUNDORF et NILSSON, 1943, 269).

Pour augmenter le taux d'azote sans augmenter celui des vitamines, nous avons essayé d'ajouter au milieu RC des "vitamin-free Casamino-acids" (Difco). Cette addition devait aussi permettre l'entretien de mutants exigeants en acides aminés.

Les résultats obtenus pour T 1 S et M 5 N 1 sont portés sur la figure 8 page 82. Une dose de 4 g/l de Casamino-acids permet une augmentation nette de la croissance de M 5 N 1 ; une dose de 10 g/l est inutile. Par contre, pour la souche T 1 S, il y a inhibition totale de la croissance à 4 g/l de Casamino-acids. L'inhibition est presque négligeable à 0,5 g/l.

La même inhibition, à 4 g/l, sur milieu RC gélosé, a été notée pour toutes les souches de Trèfle sauf une. Elle n'existe pas pour les souches de Luzerne et certaines souches de Lupin (K 1 S, K 2 S, K 3 S, K 5 S) et de Haricot (P 2 S, P 3 S).

Pour d'autres souches de Haricot (P 5 S, P 7 S, P 8 S), certaines de Lupin (K 6 S, K 8 S), celle de Pois, Vesce, Fève et pour une souche de Trèfle (T 30 S) quelques colonies à aspect normal ont apparu, tardivement, sur ce milieu.

Comme l'effet inhibiteur du chlorure de sodium dans des milieux de culture pour Enterobactéries, avait déjà été observé sur les

INFLUENCE DE L'HYDROLYSAT DE CASEINE ET DE SES COMPOSANTS

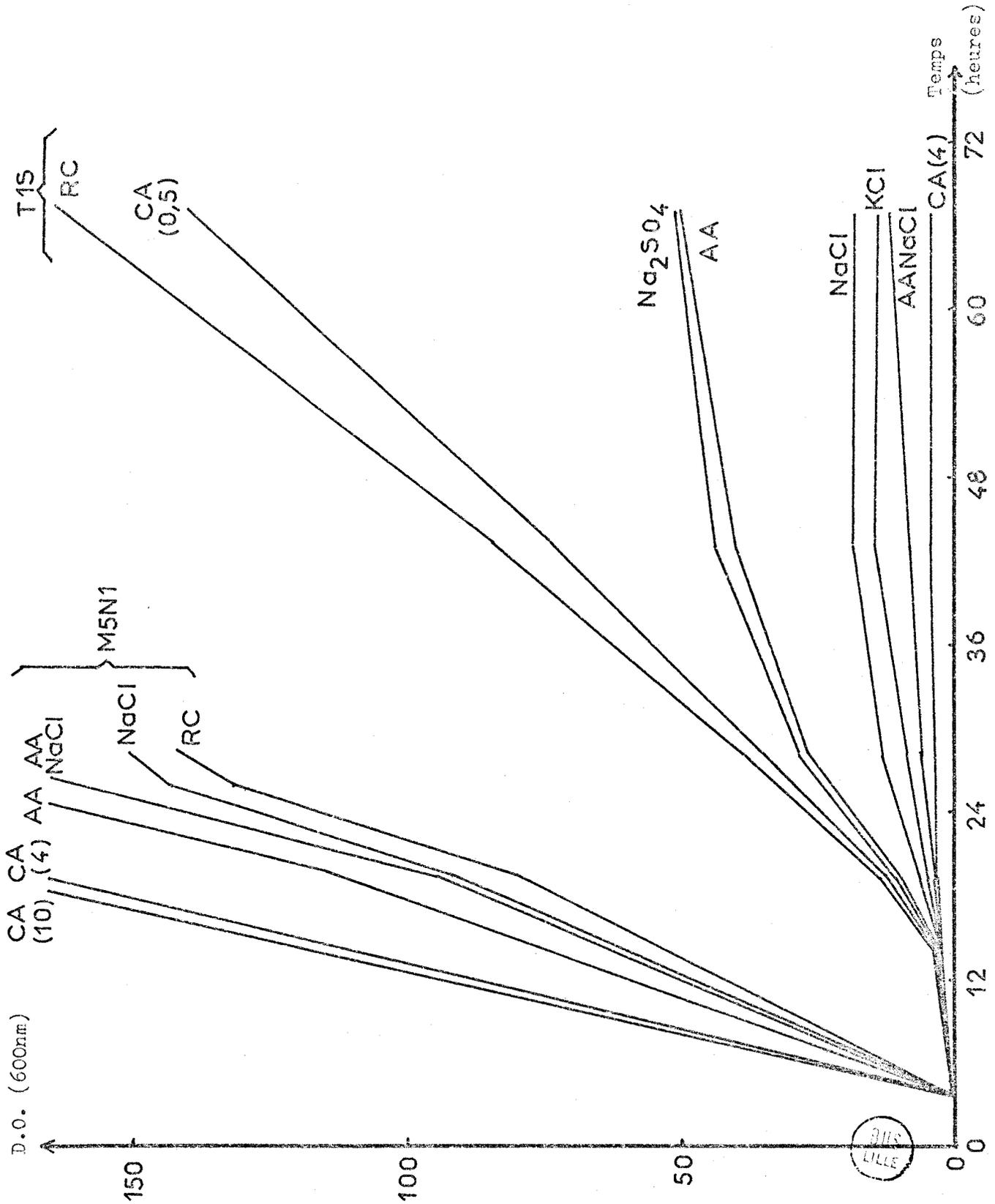
SUR LA CROISSANCE DE RHIZOBIUM TRIFOLII (T1S) ET RHIZOBIUM MELILOTI (M5N1)

RC : Milieu complet

Suppléments au milieu RC : AA : mélange d'acides aminés.

CA (...) : Vitamin-free Casamino-Acids Difco (g/l)

Voir composition des milieux dans le texte.



Rhizobium, nous avons cherché à savoir si l'inhibition de croissance des Rhizobium de Trèfle était due à la présence de NaCl dans les Casamino-acids qui en contiennent en effet 40 p. 100, provenant de la neutralisation par la soude de l'acide chlorhydrique servant à l'hydrolyse de la caséine.

L'effet de différentes doses de NaCl sur la croissance de T 1 S est porté sur la figure 9 page 84.

A la dose de 1,6 g/l soit l'équivalent du NaCl présent dans 4 g/l de Casamino-acids, la croissance de T 1 S est inhibée. Dans une même expérience nous avons testé pour les souches T 1 S et M 5 N 1 l'effet :

- du NaCl (1,6 g/l)
- de l'ion  $\text{Na}^+$  sous forme  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (1,94 g/l)
- de l'ion  $\text{Cl}^-$  sous forme KCl (2,04 g/l)
- d'un mélange d'acides aminés, avec et sans NaCl (1,6 g/l)

les témoins étaient : Milieu RC

Milieu RC + Casamino-acids (4 et 10 g/l pour M 5 N 1)  
(0,5 et 4 g/l pour T 1 S)

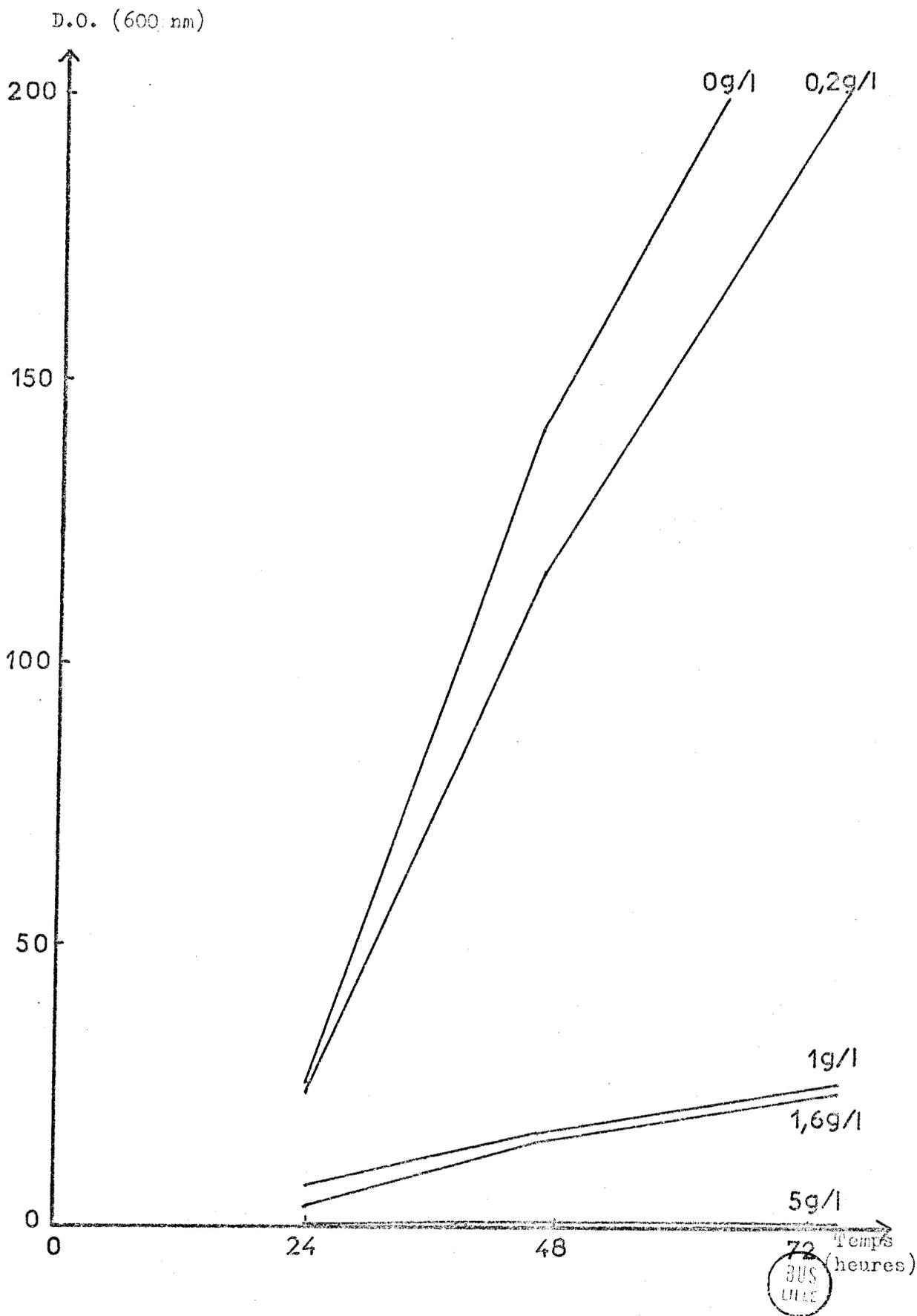
Le mélange d'acides aminés utilisé est composé de la façon suivante

(BBL, 1968, 270) :

L. Arg	0,060 g/l
L. Asp	0,165
L. Cys	0,015
Gly	0,045
L. Glu	0,640
L. His	0,035
L. Ileu	0,125
L. Leu	0,155
L. Lys	0,145
L. Mét	0,075
L. Pha	0,035
L. Pro	0,180
L. Thr	0,110
L. Tyr	0,140
L. Val	0,180
	<hr/>
	2,105 g/l

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE CHLORURE DE SODIUM SUR LA CROISSANCE  
DE RHIZOBIUM TRIFOLII (T1S)

Milieu : RC



Avec ce mélange riche en acide glutamique, le milieu RC a un pH de 5,1. Il a été ajusté à 7,2 avec de la potasse.

On vérifie sur la figure 8 (page 82) que 1,6 g/l NaCl inhibe T 1 S, mais non M 5 N 1.

D'autre part, à partir de la souche T 1 S, il est possible d'obtenir des clones résistants à 2 g/l NaCl et la croissance de ces clones n'est pas inhibée par 4 g/l de Casamino-acids. Pour la souche T 1 S la présence de KCl est aussi nocive que celle de NaCl.

En conclusion, il semble donc que l'inhibition de croissance de la souche T 1 S par les casamino-acids est due à la présence de NaCl (40 p. 100) dans cette préparation, et que ce soit l'ion  $\text{Cl}^-$  qui soit toxique.

Néanmoins, la croissance de la souche T 1 S obtenue en présence de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  n'est pas optimum (figure 8 page 82). En outre, le mélange d'acides aminés utilisé, bien que favorable pour la souche de Luzerne, déprime la croissance de celle de Trèfle. L'ion  $\text{Cl}^-$  n'est donc pas seul responsable de l'inhibition par les casamino-acids, de la croissance de Rhizobium trifolii.

LONGLEY et col. (1937, 271) et SCHWINGHAMER (1960, 272) ont d'ailleurs observé un effet toxique de certains acides aminés (glycocolle, cystéine) sur la croissance de souches de Trèfle.

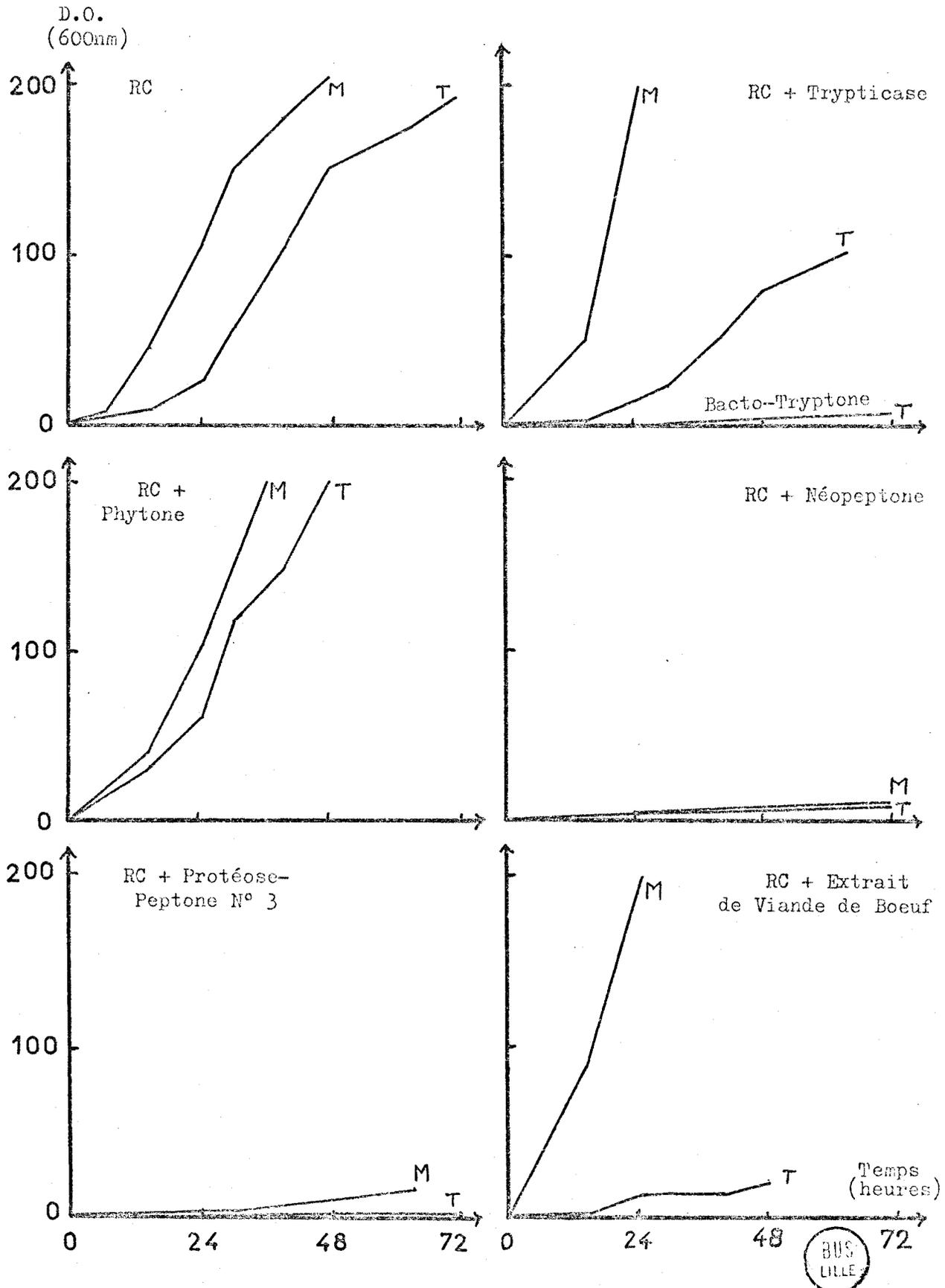
D'autres préparations protéiques ont été testées sur R. trifolii (T 1 S) et R. meliloti (20-1). Les résultats obtenus sont figurés sur la figure 10 page 86 ; il apparaît que certaines préparations (protéose - peptone n°3, néopeptone) inhibent la croissance des deux souches.

L'extrait de viande de boeuf inhibe seulement R. trifolii (T 1 S). Cette action s'explique par la richesse de ce produit en NaCl.

INFLUENCE DE DIVERSES PREPARATIONS PROTEIQUES SUR LA CROISSANCE

DE RHIZOBIUM TRIFOLII (T1S) (— T) ET RHIZOBIUM MELILOTI (20-1) (— M)

Milieu : RC + 5 g/l de la préparation.



Trypticase et Phytone n'inhibent aucune des deux souches. La croissance de T 1 S est même accrue en présence de phytone. Or la trypticase est, comme les casamino-acids, un hydrolysate de caséine (Tableau VI). Toutefois, comme ce produit provient d'une hydrolyse enzymatique, il est pauvre en NaCl, ce qui explique son manque de toxicité. Par contre, un autre hydrolysate (pancréatique) de caséine (bacto-tryptone) inhibe la souche T 1 S.

TABLEAU VI

NATURE ET COMPOSITION DES PREPARATIONS PROTEIQUES

Fabri- cant	Nom	Nature	Agent d'hydrolyse	% N total	% NaCl
BD	Trypticase	Hydrolysate de caséine	trypsine	11	0,5
BD	Phytone	Hydrolysate de protéines de Soja	papaine	9	4,4
Difco	Bacto-Trypt.	Hydrolysate de caséine	pancréatine	13	3
Difco	Casamino-acids	Hydrolysate de caséine	HCl	7	38
Difco	Bacto peptone	-	-	16	1,35
Difco	Protéose "	-	-	14	7
Difco	Yeast extract	levure	chaleur	10	0,5
Difco	Neopeptone	-	enzyme	14	1,3
Difco	Extrait V.Boeuf	muscle	HCl		

### 3.5. - MILIEUX SYNTHETIQUES ET MINIMUM

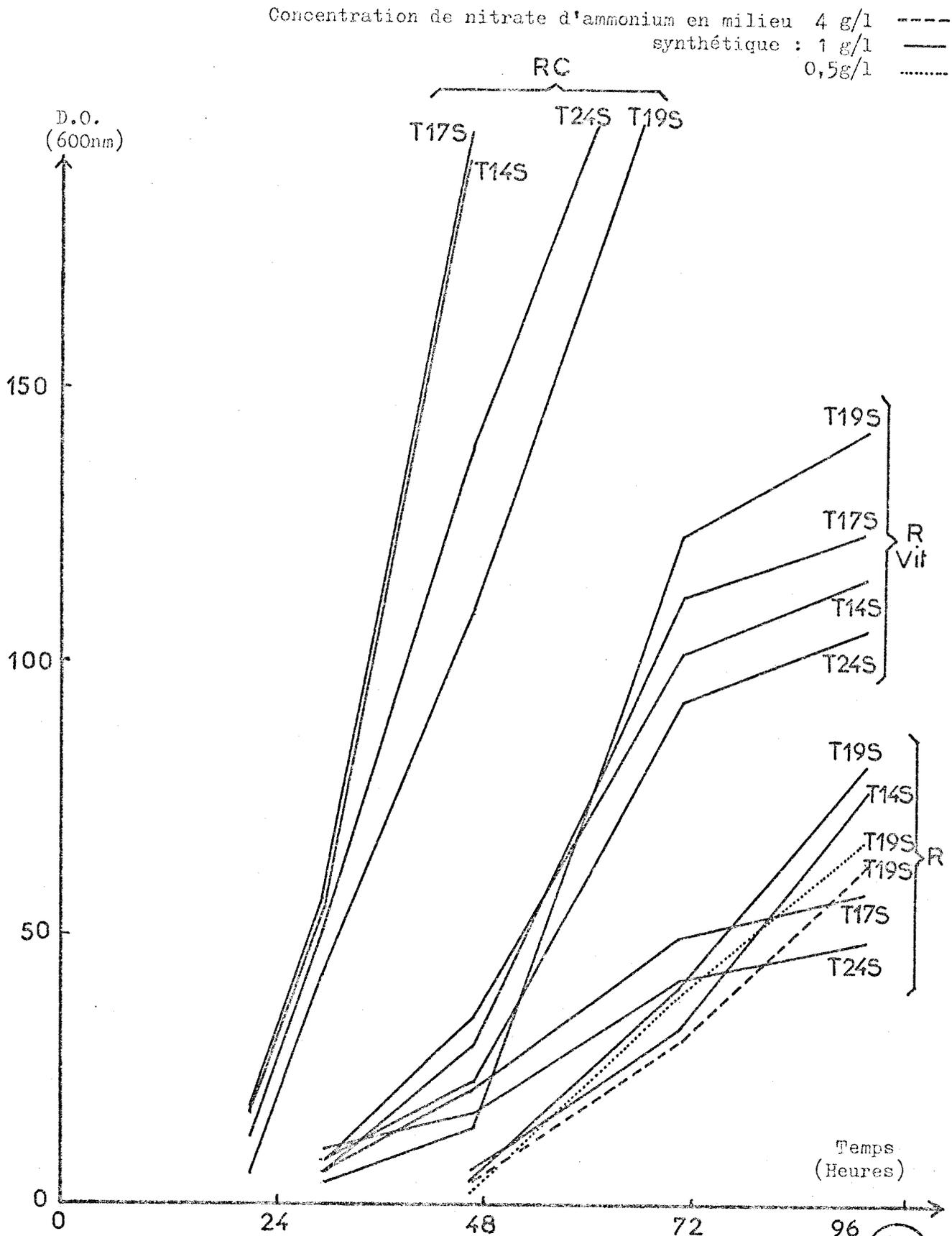
#### 3.5.1. - SOURCE D'AZOTE

Dans le milieu RC, l'extrait de levure contient des acides aminés, basés puriques et pyrimidiques et des vitamines. Pour permettre d'étudier les exigences métaboliques de mutants, nous avons remplacé l'extrait de levure par une source d'azote de nature connue. Les Rhizobium étant réputés incapables de réduire les nitrates au-delà des nitrites, l'étude a porté sur les sels d'ammonium. Des essais préliminaires, sur milieu gélosé ont montré néanmoins une croissance plus forte avec le nitrate qu'avec les sulfate et carbonate d'ammonium, urée et glutamate de sodium.

Les résultats obtenus en milieu liquide, avec des cultures de R. trifolii carencées en vitamines, sont portés sur la figure XI page 89. Les concentrations de nitrate d'ammonium sont 0,5, 1 et 4 g/l. Les vitamines ajoutées sont (LOCHHEAD et BURTON, 1957, 273) :

Thiamine	0,5 $\gamma$ /ml
Panhoténate de Ca	0,5 $\gamma$ /ml
Biotine	1 $m\gamma$ /ml
Ac. folique	0,1 $\gamma$ /ml
Riboflavine	0,5 $\gamma$ /ml
Pyridoxamine-2 HCl	0,1 $\gamma$ /ml
Pyridoxal-HCl	0,5 $\gamma$ /ml
p-amino-benzoïque	0,5 $\gamma$ /ml
Ac. nicotinique	0,5 $\gamma$ /ml
Choline Cl	20 $\gamma$ /ml
m-Inositol	50 $\gamma$ /ml
Cyanocobalamine	2 $m\gamma$ /ml

CROISSANCE DE RHIZOBIUM TRIFOLII (T14S, T17S, T19S, T24S) SUR  
MILIEU COMPLET (RC), MILIEU SYNTHETIQUE AVEC (R Vit) ET SANS (R)  
VITAMINES.



Il apparait d'après ces résultats que les 4 souches de R. trifolii sont capables de pousser sans vitamines, mais qu'en leur présence la croissance est nettement augmentée.

Par repiquages successifs sur milieu minimum sans vitamines, il est possible de perpétuer indéfiniment les souches de Trèfle. La croissance est améliorée au cours des repiquages successifs mais n'atteint pas (après 10 repiquages) celle obtenue avec l'extrait de levure.

Il semble donc, au moins pour les souches de Trèfles, que la synthèse de tous les facteurs nécessaires à la croissance soit possible, mais que certains de ces facteurs soient synthétisés en quantité insuffisante pour une croissance optimum. Ceci gêne considérablement l'étude des exigences en vitamines.

Sur la figure 11 on peut observer également que la concentration de 1 g/l de nitrate d'ammonium est plus favorable que 0,5 ou 4 g/l.

Le milieu synthétique utilisé dans toutes les expériences qui suivent (milieu R) a donc la composition suivante (g/l) :

<u>Milieu R</u> :	Mg SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
	K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 g
	Glucose	10 g

La nature et les proportions des vitamines ajoutées à ce milieu varient avec les souches.

### 3.5.2. - EXIGENCES EN VITAMINES POUR LA SOUCHE T 1 S (R. TRIFOLII)

Nous avons obtenu une très bonne croissance de cette souche sur milieu minimum solide, avec le mélange de vitamines suivant, modifié de LEDERBERG (1950, 274) :

B1	Thiamine	0,5 $\gamma$	} par ml (concentrations finales)
Pa	Panhoténate	0,5 $\gamma$	
H	Biotine	1,66 m $\gamma$	
Fol	Ac. folique	0,083 $\gamma$	
B2	Riboflavine	0,41 $\gamma$	
B6	Pyridoxine	0,5 $\gamma$	

Nous avons donc supprimé dans la suite des expériences avec T 1 S :

p. amino-benzoïque

Choline

m. inositol

Cyanocobalamine

Ac. nicotinique

Les résultats de la croissance en milieu liquide avec une culture carencée en vitamines, après 44 heures d'incubation en tubes, sont portés sur le tableau VII

TABLEAU VII

CROISSANCE DE R. TRIFOLII (T 1 S) EN MILIEU MINIMUM AVEC DIVERSES VITAMINES

Milieu	D.O. 600	Concentrations
RC	77	B1 : 0,5 $\gamma$ /ml
R	13	B6 : 0,5 $\gamma$ /ml
RH	15	Pa : 0,5 $\gamma$ /ml
R B1 B6 Pa	13	H : 1,66 m $\gamma$ /ml
R B1 B6 Pa H	30	H (*) : 20 m $\gamma$ /ml
R B1 B6 Pa H (*)	38	Fol : 0,1 $\gamma$ /ml
R B1 B6 H	11	B2 : 0,5 $\gamma$ /ml
R B1 B6 Pa H B2	15	
R B1 B6 Pa H Fol	16	

Les résultats montrent que :

- le panthoténate est indispensable,
  - la biotine est indispensable et que la dose de 1 ou 1,6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  n'est pas suffisante,
  - la thiamine ou la pyridoxine est indispensable (des essais en milieu solide ont montré que les deux sont nécessaires),
  - l'acide folique et la riboflavine aux doses utilisées sont inhibitrices.
- Cette action a été vérifiée sur plusieurs autres souches (T 14 S, T 17 S, T 19 S, T 24 S).

En conséquence, nous avons utilisé dans la suite de nos expériences avec les souches de Trèfle les concentrations suivantes :  
(mélange U) (= mélange V sans B12) :

Thiamine	0,5 $\gamma/\text{ml}$
Panthoténate	0,5 $\gamma/\text{ml}$
Biotine	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Ac. folique	0,05 $\gamma/\text{ml}$
Riboflavine	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Pyridoxine	0,5 $\gamma/\text{ml}$

### 3.5.3. - EXIGENCES EN VITAMINES DE LA SOUCHE 1-99 (R. LUPINI)

Pour la souche 1-99, réputée exigeante en biotine, riboflavine et cyanocobalamine (HEUMANN, 1968, 275) la croissance obtenue sur différents milieux, après 50 heures d'incubation en tube, est notée dans le tableau VIII

## TABLEAU VIII

CROISSANCE DE *R. LUPINI* (1-99) EN MILIEU MINIMUM AVEC DIVERSES  
VITAMINES

Milieu	DO 600	Concentrations finales	
RC	70	B2	0,5 $\gamma$ /ml
R	7,5	B2 (*)	2,5 $\gamma$ /ml
R + B2 + B12	10,5	B2 (**)	5 $m\gamma$ /ml
R + B12 + H	23		
R + B2 + H	52	B12	2 $\gamma$ /ml
R + B2 + B12 + H (**)	23	B12 (*)	20 $m\gamma$ /ml
R + B2 + B12 + H (*)	29	B12 (**)	2 $m\gamma$ /ml
R + B2 + B12 + H	35		
R + B2 + B12 (**)+ H	66	H	1 $\gamma$ /ml
R + B2 + B12 (*) + H	32	H (*)	10 $m\gamma$ /ml
R + B2 (*) + B12 + H	16	H (**)	1 $m\gamma$ /ml
R + B2 (**)+ B12 + H	36		

Il ressort de ces observations que :

- biotine et riboflavine sont indispensables. La croissance obtenue sans B12 est importante. Ceci peut être dû à un auto-apport, la dose active étant très faible (2  $m\gamma$ /ml). Néanmoins, à cette dose, l'effet favorable de la B12 est indiscutable. La souche 1-99 sous ce rapport, est une exception dans le genre *Rhizobium*, qui a toujours été considéré comme producteur d'importantes quantités de B12 (BURTON et LOCHHEAD, 1952, 276),

- comme pour la souche T 1 S, il y a inhibition par les fortes doses de riboflavine (0,5 et 2,5  $\gamma$ /ml),

- la B12 est très inhibitrice aux fortes doses (20  $m\gamma$  et 2  $\gamma$ /ml).

En conséquence, pour la souche 1-99 nous avons utilisé les concentrations suivantes de vitamines :

Riboflavine	5	mg/ml
Biotine	2	mg/ml
Cyanocobalamine	2	mg/ml

#### 3.5.4. - EXIGENCES EN VITAMINES POUR LA SOUCHE M 5 N 1 (R. MELILOTI)

Les résultats obtenus en présence de diverses vitamines sont portés sur la figure 12 page 95.

La croissance obtenue en présence de biotine et thiamine étant satisfaisante, nous avons utilisé pour toutes les expériences avec la souche M 5 N 1, les mêmes concentrations de ces vitamines que pour la souche T 1 S soit :

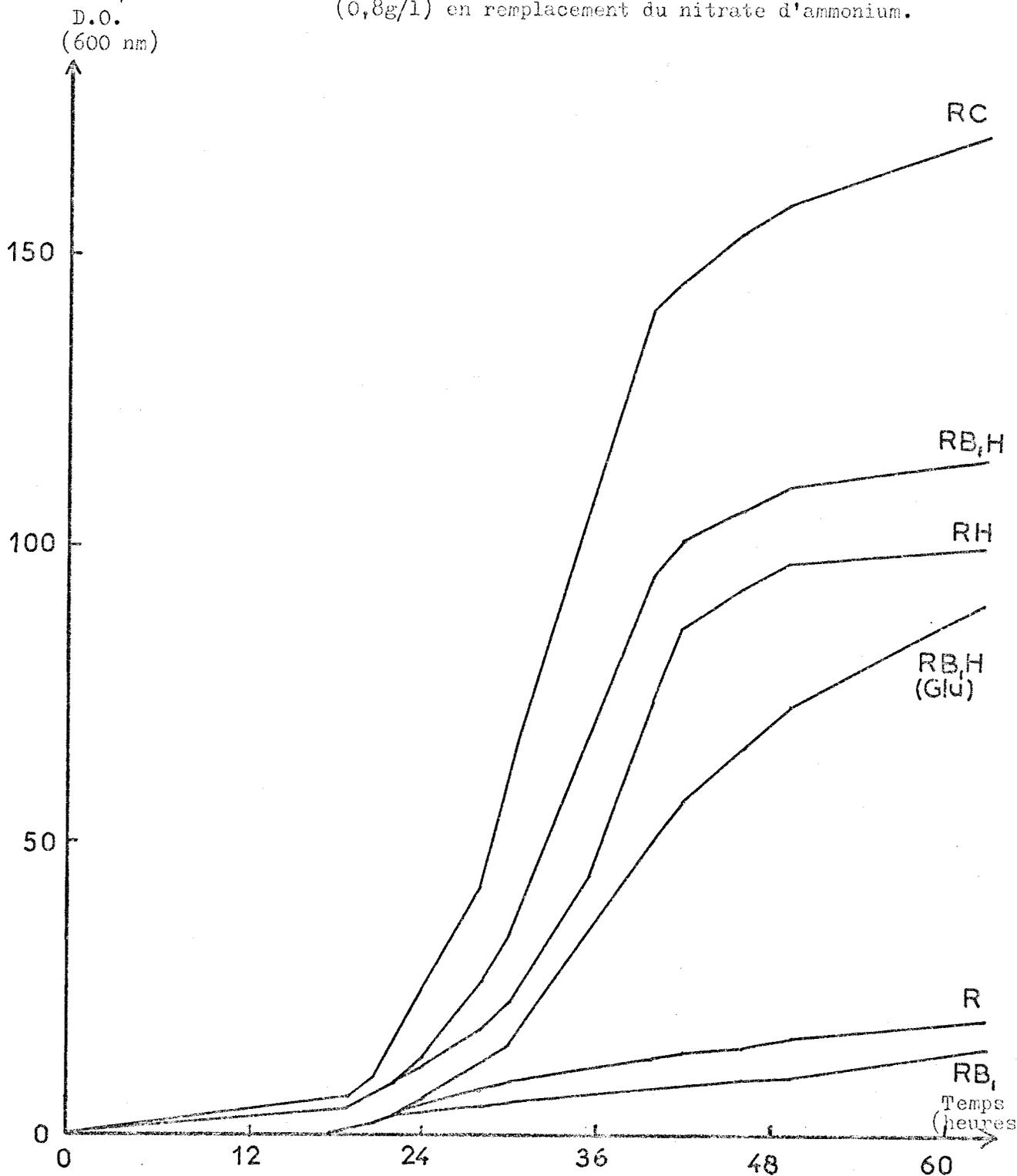
Thiamine	0,50	γ/ml
Biotine	10	mg/ml

Il est remarquable que la troisième souche de Rhizobium étudiée ait également une exigence très nette pour la biotine et que la thiamine, totalement insuffisante seule, augmente la croissance obtenue avec la biotine. Ces résultats confirment ceux de RIGAUD (1965, 277) qui a proposé le milieu suivant pour R. meliloti (g/l) :

NaCl	0,2
$\text{HK}_2 \text{PO}_4$	0,5
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{Ca SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{Ca CO}_3$	0,1
Mannitol	10
Glutamate de Na	1
Thiamine	70 γ/l
Biotine	0,5 γ/l

CROISSANCE DE RHIZOBIUM MELILOPI (M5N1) EN MILIEUX COMPLET ET SYNTHETIQUES

RC : Milieu complet  
 R : Milieu synthétique, sans vitamines } Voir composition dans le texte.  
 RB<sub>1</sub> : " " + Thiamine (0,5 γ/ml)  
 RH<sub>1</sub> : " " + Biotine (10 mg/ml)  
 RB<sub>1</sub>H : " " " " " + Thiamine (0,5 γ/ml)  
 RB<sub>1</sub>H(Glu) : même milieu que le précédent, mais avec glutamate de sodium (0,8g/l) en remplacement du nitrate d'ammonium.



Une comparaison des sources d'azote (figure 12 page 95) ne nous a pas permis de déceler un avantage à remplacer le nitrate d'ammonium utilisé dans nos milieux minimum par le glutamate de sodium préconisé par RIGAUD.

### 3.5.5. - EXIGENCES EN VITAMINES DES AUTRES SOUCHES

Pour les tests d'identification des Rhizobium (chapitre 2.2) en milieu synthétique, nous avons utilisé le mélange U (page 92 ) avec un supplément de vitamine B12 (5  $\mu$ y/ml, concentration finale) de façon à satisfaire les exigences de toutes les souches. Il semble que seules quelques souches (X 18 S, X 20 S ...) n'aient pas une croissance normale avec ces vitamines, mais le milieu RC lui-même ne semble pas leur convenir. L'étude des exigences en vitamines de plusieurs autres souches a donné les résultats suivants (tableau IX).

## TABLEAU IX

EXIGENCES EN VITAMINES DE DIVERSES SOUCHES (RHIZOBIUM spp.)

<u>Souche</u>		<u>Croissance normale sur milieu</u>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	B5	R
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Tr6	R
<i>R. meliloti</i>	20-1	R
<i>R. meliloti</i>	M 2 S	R
<i>R. meliloti</i>	M 3 S	R + B1 + H
<i>R. meliloti</i>	M 5 S	R + B1 + H
<i>R. trifolii</i>	T 8 S	} R + mélange U
<i>R. trifolii</i>	T 14 S	
<i>R. trifolii</i>	T 19 S	
<i>R. trifolii</i>	T 17 S	
<i>R. trifolii</i>	T 24 S	
<i>R. leguminosarum</i>	L 5 S	R + mélange V
<i>R. phaseoli</i>	P 2 S	R
<i>R. phaseoli</i>	P 3 S	R
<i>R. lupini</i>	K 1 S	R

En conclusion, ces études préliminaires de physiologie nous ont permis de définir un milieu complet adapté aux souches utilisées : il supporte une bonne croissance et, quoique dépourvu de calcium, n'altère pas les aptitudes symbiotiques des souches.

Ces études ont également permis de déceler une influence inhibitrice de certaines préparations protéiques généralement utilisées dans les expériences d'obtention de mutants. Une des causes de cet effet inhibiteur, au moins pour les souches de Trèfle, est la présence de NaCl.

Ces études nous ont aussi permis de définir un milieu minimum simple, et les exigences en vitamines, pour plusieurs souches.

Enfin, les résultats des études de la vitesse de croissance des souches sur ces milieux et de la correspondance entre densité de germes et densité optique des cultures nous ont permis d'aborder l'obtention de mutants, qui fait l'objet du chapitre 4.

4.

C H A P I T R E 4OBTENTION DE MUTANTS

Les études de biochimie permettent actuellement d'entrevoir les mécanismes de la fixation de l'azote dans la symbiose Rhizobium-légumineuses. Néanmoins, ces études n'expliquent pas pourquoi certaines symbioses restent inefficaces. Les processus de l'infection et de la nodulation restent également en grande partie inexpliqués, ainsi que la spécificité. C'est pourquoi des études de génétique ont été entreprises, dans divers buts :

- compléter la connaissance qu'apporte la chimie, des mécanismes de la fixation symbiotique de l'azote,
- étudier d'autres aspects des propriétés symbiotiques des Rhizobium : spécificité, processus d'infection,
- analyser au niveau moléculaire les déterminants génétiques des propriétés symbiotiques,
- étudier le comportement génétique des Rhizobium dans tous ses caractères et non seulement ses propriétés symbiotiques.

Depuis la découverte de la "dissociation" chez Rhizobium par ISRAILSKY et STARYGIN en 1930 (278), de nombreux travaux ont porté sur les mutants de Rhizobium, sur les effets des mutations sur les propriétés symbiotiques et sur l'utilisation des mutants dans l'étude de l'hérédité du microorganisme.

Le nombre des mutations décrites chez Rhizobium reste toutefois très faible. Certaines mutations, naturelles ou induites, portent directement sur une propriété symbiotique (infectivité ou efficacité) et n'ont pu être mises en relation avec aucune autre propriété. Les autres mutations connues portent sur :

- le type de colonies : mucosité, pigmentation,
- la résistance aux antibiotiques et antimétabolites,
- la résistance aux bactériophages,
- les exigences métaboliques (acides aminés, bases puriques et pyrimidiques, vitamines).

Certaines s'accompagnent de modifications des propriétés symbiotiques.

L'obtention de mutants de Rhizobium est compliquée par différentes caractéristiques des souches sauvages : elles sont très muqueuses, poussent lentement et leur vitalité est assez faible : en particulier certaines sont très sensibles aux pH bas. De plus, elles exigent pour leur croissance des milieux à base d'extrait de levure et de sucres, sur lesquels de nombreux germes contaminants peuvent se développer. De plus, les mutants de Rhizobium sont très rares et, comme la plupart perdent leurs aptitudes symbiotiques, il est difficile de les identifier.

C'est pourquoi nous avons d'abord cherché à marquer les souches sauvages par des caractères de résistance à des antibiotiques, de façon à pouvoir éliminer facilement les contaminations. Nous avons ensuite essayé de supprimer le caractère muqueux des souches, en recherchant des mutants sur le type de colonies. Enfin, nous avons abordé l'obtention de mutants auxotrophes.

#### 4.1. - MUTANTS RESISTANTS AUX ANTIBIOTIQUES ET ANTIMETABOLITES

La résistance aux antibiotiques est facile à obtenir et c'est au moyen de mutants résistants qu'ont été mises en évidence, chez les Rhizobium, la transformation, par BALASSA (1953, 279), la conjugaison par HEUMANN (1960, 280) et la transduction, par KOWALSKI (1966, 281).

##### 4.1.1. - MUTANTS RESISTANTS A LA STREPTOMYCINE (Str<sup>R</sup>)

La résistance naturelle à la streptomycine (dose maximum à laquelle la croissance est possible) varie de 0,1 à 2  $\gamma$ /ml pour R. trifolii (BALASSA, 1963, 282). Pour d'autres groupes d'inoculation, elle peut être de 50  $\gamma$ /ml et plus (SCHWINGHAMER, 1964, 283).

Il est possible d'obtenir des résistances élevées : 10 mg/ml selon BALASSA (1963, 284). Toutefois, des études de transformation (GABOR, 1965, 285) ont montré que la dose tolérée (ou exigée, dans le cas de la dépendance à la streptomycine) est contrôlée par un gène différent de celui qui gouverne la résistance (et la dépendance). Ceci explique qu'à la différence de E. coli, les Rhizobium n'acquièrent pas de résistance aux doses élevées en une seule étape.

D'autre part, l'expression du phénotype Str<sup>R</sup> n'apparaît qu'après plusieurs divisions. Pour certaines souches, cette expression est soumise à la présence dans le milieu d'un (lysine) ou plusieurs acides aminés libres. Ce besoin passe avec le marqueur Str<sup>R</sup>, par transformation (BALASSA, 1963, 285).

GUPTA et KLECZKOWSKA (1962, 287) et BALASSA (1963, 288) ont également observé l'apparition de mutants dépendants pour la streptomycine

(Str<sup>D</sup>). Ces mutants ne se développent qu'en présence de concentrations élevées (1000  $\gamma$ /ml) de l'antibiotique. Pour certaines souches de Rhizobium trifolii, l'utilisation de la streptomycine en milieu synthétique supprime les exigences en vitamines (GUPTA et KLECZKOWSKA, 1962, 289).

Par transformation de cellules Str<sup>S</sup> par de l'ADN Str<sup>D</sup>, on obtient des Str<sup>R</sup>, des Str<sup>D</sup> et des "instables", formant de petites colonies en absence de l'antibiotique. Ces "instables" ségrègent continuellement en Str<sup>R</sup>, Str<sup>D</sup> et "instables" (BALASSA, 1963, 290).

Outre la possibilité d'obtenir une résistance à des doses beaucoup plus élevées que la dose inhibant la souche sauvage, le caractère Str<sup>R</sup> présente plusieurs avantages :

- Il ne s'accompagne pas de résistance croisée à d'autres antibiotiques (SCHWINGHAMER? 1964, 291 et 1967, 292).

- Il n'entraîne pas de modification du métabolisme (sauf une baisse de l'activité de la phosphatase alcaline : LORKIEWICZ et col. (1965, 293).

- Il n'est accompagné, sauf rares exceptions (GUPTA et KLECZKOWSKA, 1962, 294) d'aucune modification des propriétés symbiotiques (SCHWINGHAMER, 1964, 295 ; 1967, 296).

Ce caractère serait donc un marqueur intéressant pour des études de génétique. Il a été utilisé largement dans les expériences de transformation et transduction.

#### 4.1.1.1. - TECHNIQUES

Pour l'obtention de mutants résistants à la streptomycine, ainsi qu'à tous les autres antibiotiques utilisés, nous avons étalé la souche

sauvage sur milieu RC gélosé à 15 g/l et additionné de l'antibiotique ; $\beta$  chaque mutant a ensuite été repiqué sur milieu RC liquide avec la même concentration d'antibiotique. Aucun agent mutagène n'a été utilisé, de façon à éviter la superposition d'autres mutations.

#### 4.1.1.2. - RESULTATS ET DISCUSSION

Dans nos essais nous avons obtenu des résistants à 200  $\gamma$ /ml de dihydrostreptomycine ( $\text{Str}_{200}^{\text{R}}$ ) à partir de 24 souches (T 1 S à T 24 S) de R. trifolii. La fréquence des  $\text{Str}_{200}^{\text{R}}$ , pour la souche T 1 S, est de  $6.10^{-8}$ . Dans un deuxième temps, nous avons obtenu, à partir des  $\text{Str}_{200}^{\text{R}}$  des résistants à 1000  $\gamma$ /ml de streptomycine ( $\text{Str}_{1000}^{\text{R}}$ ).

Les  $\text{Str}_{200}^{\text{R}}$  sont incapables de se développer en présence de 1000  $\gamma$ /ml de l'antibiotique. Ceci confirme les observations de BALASSA (1963, 297) selon lesquelles l'acquisition de la résistance à des doses faibles de streptomycine chez Rhizobium, ne confère pas la résistance à des doses élevées.

D'autre part, si un  $\text{Str}^{\text{R}}$  est repiqué trois fois de suite sur du milieu dépourvu de streptomycine, la fréquence des  $\text{Str}^{\text{R}}$  dans la population tombe à des taux comparables à celui de la population naturelle.

Enfin, toutes les souches  $\text{Str}^{\text{R}}$  ont provoqué la formation de nodules normaux sur Trèfle, mais ces clones, réisolés des nodules, ont montré une sensibilité à la streptomycine comparable à celle des souches parentales.

L'utilisation de ce marqueur est donc fortement compromise par sa grande instabilité chez Rhizobium.

#### 4.1.2. - MUTANTS RESISTANTS A D'AUTRES ANTIBIOTIQUES

SCHWINGHAUER (1964, 298 ; 1967, 299), dans une étude de la résistance de R. trifolii, leguminosarum, meliloti et phaseoli, à 15 antibiotiques, note les faits suivants :

- Il existe de grandes différences de sensibilité à un même antibiotique, entre souches d'une même "espèce" de Rhizobium.

- Les concentrations de ces antibiotiques pour lesquelles il est possible d'avoir des mutants résistants, ne dépassent pas 3 à 5 fois celles tolérées par la souche sauvage, alors qu'elles sont de 30 à 50 fois supérieures dans le cas de la streptomycine.

- Il existe des résistances croisées entre : chloramphénicol, puromycine, tétracycline, oxacilline. D'autre part, les résistants à la néomycine, résistent à la viomycine et vice-versa. Les résistants à la kanamycine sont résistants à la néomycine, mais pas à la viomycine.

- La résistance à un antibiotique peut s'accompagner de modifications des propriétés symbiotiques :

Pour la novobiocine : les résistants à 4-10  $\gamma$ /ml sont effectifs

les résistants à 20-40  $\gamma$ /ml sont ineffectifs ou même non-nodulants.

En dehors des variations dues à la dose employée ou à l'espèce bactérienne, les antibiotiques se répartissent en trois groupes :

1) L'acquisition de la résistance ne modifie pas les propriétés symbiotiques : puromycine, spiramycine, chloramphénicol, tétracyclines, oxacilline.

2) La résistance s'accompagne d'une perte partielle de l'efficacité : pénicilline, bacitracine, D. cyclosérine, polymyxine B, vancomycine, novobiocine, parfois kanamycine.

3) La résistance s'accompagne d'une perte totale de l'efficacité :  
viomycine, néomycine, parfois kanamycine.

HENDRY et JORDAN (1969, 300) ont observé que la viomycine provoquait chez R. meliloti la formation de bactéroïdes artificiels et que la résistance à cet antibiotique amenait la perte de l'efficacité.

IMSENECKI et col. (1970, 301) ont également observé une perte de l'efficacité chez les résistants à la néomycine, mais parfois partielle.

DAMERY et ALEXANDER (1969, 302) ont observé que la résistance à la kanamycine s'accompagnait parfois de la perte de l'efficacité et qu'après réisolement du nodule, ces souches retrouvaient leur sensibilité à l'antibiotique mais non leur efficacité.

Les caractères de résistance à tous ces antibiotiques semblent donc moins intéressants que la résistance à la streptomycine, comme marqueurs génétiques. Seule la résistance à la viomycine ou à la néomycine peut être utile, pour obtenir des souches inefficaces par mutation connue (sans faire intervenir les agents mutagènes ou les pertes naturelles d'efficacité, dont on ne peut connaître le site d'action et qui nécessitent une sélection fastidieuse).

A partir de la souche T 1 S et de ses mutants Str<sup>R</sup> (sensibles à 10  $\gamma$ /ml de kanamycine, 50  $\gamma$ /ml de chloramphénicol et à l'azide de sodium M/1300) nous avons obtenu des mutants résistants à :

15 et 25  $\gamma$ /ml de kanamycine (Kana<sup>R</sup>)

50, 75, 100 et 200  $\gamma$ /ml de chloramphénicol (Cal<sup>R</sup>)

l'azide M/1000 puis M/886 (Azi<sup>R</sup>)

Ces mutants sont très instables, sauf un, résistant à la kanamycine (25  $\gamma$ /ml) et deux résistants à des concentrations faibles

(50 et 75  $\gamma$ /ml) de chloramphénicol. Leurs propriétés symbiotiques ne sont pas altérées. Le mutant Kana<sup>R</sup><sub>25</sub> conserve ce caractère même après passage sur plante.

#### 4.1.3. - RESISTANCE AUX ANTIMETABOLITES ET ACIDES AMINES

Il a été observé que certains acides aminés inhibent la croissance des Rhizobium : glycocolle et L-cystéine en particulier (LONGLEY et col., 1937, 303) (STRIJDOM et ALLEN, 1966, 304 ; 1969, 305). Par contre la croissance de R. meliloti est stimulée par la L-alanine, la L-phénylalanine, la L-méthionine (STRIJDOM et ALLEN, 1966, 306) (HANDI, 1969b, 307).

Il est possible d'obtenir des souches résistant à cet effet toxique, par culture prolongée en présence de l'acide aminé. Mais les souches ainsi "adaptées" montrent parfois des propriétés symbiotiques altérées.

Chez R. meliloti, trifolii et leguminosarum, les souches adaptées à la L-cystéine ou au glycocolle sont inefficentes ou même ne nodulent plus (HOLDING et coll., 1960, 308) (STRIJDOM et ALLEN, 1966, 309 ; 1969, 310) (LONGLEY et col., 1937, 311). Ces modifications peuvent être permanentes même quand l'adaptation est interrompue.

SCHWINGHAMER (1968, 312) a également observé une perte de l'efficience chez R. trifolii par adaptation à la L-phénylalanine, mais l'efficience est parfois rétablie par culture prolongée en présence de l'acide aminé. Dans ces conditions, certaines clones

deviennent dépendants pour la L-phénylalanine. Le même auteur a observé que des souches de R. trifolii adaptées à des acides aminés de série L devenaient capables d'infecter des Pois, mais rarement de façon efficiente (SCHWINGHAMER, 1962, 313).

L'adaptation à d'autres acides aminés : L-alanine et L-phénylalanine pour R. meliloti ou L-méthionine à concentration faible (HAMDI, 1969b, 314) est sans effet sur l'efficiencia. Pour certains acides aminés (L-histidine et parfois L-arginine) l'adaptation est même accompagnée d'une augmentation de l'efficiencia (STRIJDOM et ALLEN, 1966, 315 ; 1969, 316).

Les acides aminés de la série D ont tous une influence néfaste sur la croissance des Rhizobium, et l'adaptation à ces antimétabolites amène la perte de l'efficiencia. Ainsi les souches adaptées à la D-méthionine sont inefficiencia, même après culture en présence de L-méthionine, L-cystéine ou divers acides aminés de la chaîne de synthèse de la L-méthionine (HAMDI, 1968, 317 ; 1969b, 318).

SCHWINGHAMER (1969, 319) a également observé que les R. trifolii adaptés à la D-alanine ou à la D-histidine perdaient parfois leur efficiencia. HOLDING et col. (1960, 320) ont observé le même phénomène avec les DL-valine, DL-alanine, DL-leucine mais non avec la D-histidine.

STRIJDOM et ALLEN (1966, 321) et HAMDI (1969b, 322) ont observé qu'en présence d'acides aminés (D,L ou DL) les cellules de Rhizobium sont déformées et transformées en bactéroïdes (comme en présence d'extrait de levure) ou en sphéroplastés (comme en présence d'urée :

STRZELCOWA, 1970, 323). Les mêmes phénomènes ont été observés avec certains antibiotiques et la résistance aux acides aminés toxiques, tout comme la résistance à ces antibiotiques, s'accompagne de modifications des propriétés symbiotiques. Cette ressemblance s'explique par la similitude du mode d'action de ces composés : dérèglement de la synthèse protéique et altération dans la synthèse de la paroi. Néanmoins, on ne sait laquelle de ces deux actions est à relier aux modifications des propriétés symbiotiques.

SCHWINGHAMER (1969, 324) a observé une proportion non négligeable d'auxotrophes parmi les clones de R. trifolii dont les propriétés symbiotiques ont été modifiées par adaptation aux acides aminés D. Les exigences sont généralement partielles et la réversion fréquente.

SCHWINGHAMER propose néanmoins l'adaptation à la D-his ou la D-ala, comme méthode d'obtention de mutants auxotrophes. Les exigences les plus fréquentes concernent les vitamines (thiamine et panthoténate) et les purines. La réversion vers la prototrophie s'accompagne parfois d'un retour à l'efficiencence et dans certains cas, une addition du facteur exigé (riboflavine) à la plante-hôte, ou la mise en présence d'une variété de Trèfle riche en riboflavine, permet à la symbiose d'être efficiente, sans que la bactérie ne réverse (SCHWINGHAMER, 1970, 325).

Les caractères de résistance aux antibiotiques et antimétabolites étant généralement peu stables et accompagnés de modifications imprévisibles

des propriétés symbiotiques, nous avons cherché à obtenir des caractères d'exigences métaboliques.

#### 4.2. - MUTANTS NON MUQUEUX (M<sup>-</sup>)

##### 4.2.1. - HISTORIQUE ET METHODES

L'obtention de mutants auxotrophes nécessite le repiquage par répliques de nombreuses colonies. Or, avec les souches muqueuses dont les colonies atteignent 1 à 3 cm de diamètre en fin de croissance et dont le mucus adhère au velours, les répliques sont très difficiles.

L'utilisation de milieux synthétiques ou le remplacement du glucose par le galactose, le mannose ou le mannitol dans les milieux que nous avons utilisés, ne permettent pas de réduire la production de mucus. HEBERLEIN et col. (1967, 325) ont utilisé pour réduire cette production, en vue d'extractions d'ADN, un milieu à base de glycérol. Mais la faible vitesse de croissance obtenue sur ce milieu le rend inutilisable pour des expériences de génétique. Nous avons donc entrepris la sélection de clones non muqueux dans le but de faciliter la recherche des auxotrophes.

Les souches naturelles de Rhizobium sont toutes muqueuses. Néanmoins dans la plupart des clones, il existe des différences d'opacité entre colonies. Les colonies d'un type, opaque ou translucide, par réisolement sur milieu solide, ségrègent et donnent naissance à une culture en tous points semblable à la culture d'origine. Il n'est pas possible d'aboutir à des clones non muqueux ou moins muqueux par

repiquages successifs sur milieu solide.

L'apparition de formes "R" a été décelée pour la première fois en 1930 par ISRAILSKY et STARYGIN (327). Il existerait, d'après ces auteurs, deux types "R" dont un seul serait stable. Les colonies de ce type ont un aspect de goutte de stéarine, sont parfois ridées, toujours surélevées et ne s'étalent pas à la surface du milieu. Elles ont une consistance ferme, sont difficiles à dissocier et accrochent à la gélose. En milieu liquide, elles donnent naissance à des flocons indissociables plus rapidement que les cultures muqueuses.

Rhizobium meliloti, à la différence des autres espèces, forme des colonies à mucus très transparent et fluide, avec des zones ou un centre opaque. JENSEN (1942, 328) a observé avec cette espèce une dissociation en deux types : normal et non-muqueux, tous deux efficaces. Le type normal est stable, mais le type non-muqueux réverse, en particulier par passage sur plante.

ALMON et BALDWIN (1933, 329) ont également obtenu des variants non muqueux de R. trifolii, ainsi que des variants pigmentés, par plusieurs méthodes : isolement des nodules ou de milieux artificiels ; filtration ( $4 \mu$ ) ; lyse phagique ; culture sur sol stérilisé ou sur milieu épuisé par une culture préalable du même organisme. Bien que ces variants ne nodulent pas, les cas de réversion d'un type (non muqueux ou pigmenté) à l'autre ou au type sauvage nodulant, permettent de penser que ces variants ne sont pas des souillures.

KLECZKOWSKA (1950, 330) a observé que l'acquisition de la résistance au phage chez R. trifolii s'accompagnait généralement d'autres modifications : perte de l'efficacité ou, pour certaines souches, du caractère infectieux ; acquisition d'une pigmentation ; modification

des caractères sérologiques ; non production de mucus. Toutes ces modifications, y compris la résistance au phage, réversent dans une proportion importante, en particulier par passage sur plante. Pour tous ces caractères, il existe des variants stables et des "non-uniformes" qui ségrégent continuellement. Tous ces caractères varient indépendamment de la sensibilité au phage et toutes les combinaisons existent. Il est ainsi possible de trouver des mutants stables ne différant du sauvage que par l'absence de mucus.

Selon NOVAK (1956, 331) la formation d'étoiles ou rosettes par les Rhizobium est une caractéristique des clones non-muqueux. La méthode appliquée avec succès par HEUMANN (communication personnelle) pour sélectionner des clones formant des étoiles (clones Sta<sup>+</sup>) peut donc être considérée comme une méthode de sélection des non-muqueux. Cette méthode consiste à sélectionner par repiquages successifs les clones formant une "collerette" au niveau d'affleurement du milieu liquide, dans des tubes placés en rotation sur eux-mêmes, en position inclinée.

Chez E. coli, DERIEUX et col. (1964, 332) ont observé qu'un mutant (W 222-1) galacto-épipimérase négatif, était incapable de produire du mucus en absence de galactose. L'absence de galacto-épipimérase l'empêche de transformer le glucose en galactose, et vice-versa. Il a donc le phénotype galactose négatif et c'est ce caractère qui a été utilisé pour sa sélection (culture sur galactose en présence de pénicilline, puis passage sur milieu glucosé; BUTTIN, 1963, 333).

Comme la plupart des auteurs ayant étudié la composition du mucus de Rhizobium s'accordent à y déceler du galactose, la méthode

employée par les mêmes auteurs que ci-dessus, pour E. coli, peut également s'appliquer à la sélection de muqueux conditionnés chez Rhizobium.

Enfin, l'observation de GUILLAUME et col. (1965, 334) selon laquelle chez E. coli les non-muqueux se développent plus vite que les muqueux, fournit un autre moyen de sélection, par repiquages successifs rapprochés, de milieu liquide à milieu liquide.

#### 4.2.2. - RESULTATS

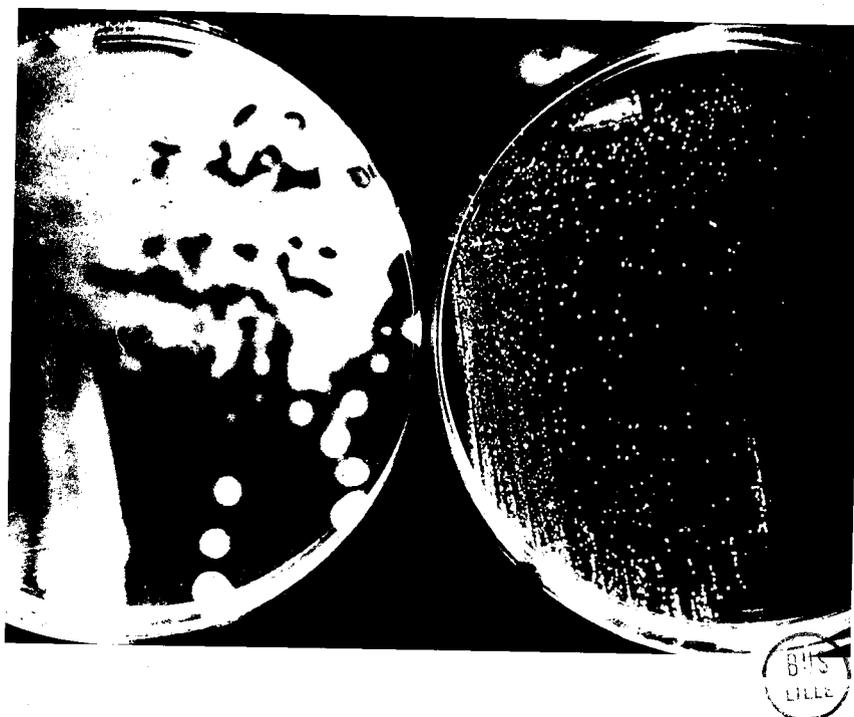
Nous avons appliqué ces méthodes à différentes souches de Rhizobium :

T 8 S	<u>Trifolium pratense</u>
T 31 S	<u>Trifolium repens</u>
L 4 S	<u>Pisum sativum</u>
L 5 S	<u>Vicia sativa</u>
M 2 S et M 3 S	<u>Medicago sativa</u>
M 5 S	<u>Medicago falcata</u>
P 2 S et P 3 S	<u>Phaseolus vulgaris</u>
K 1 S et K 3 S	<u>Lupinus polyphyllus</u>
J 1 S	<u>Onobrychis sativa</u>

ainsi qu'à Agrobacterium tumefaciens B6

et Agrobacterium radiobacter Tr6

Dans la suite du texte, nous entendons par "non muqueux" un clone dont les colonies sur milieu solide ne confluent pas quand elles sont serrées, mais restent séparées et plus petites que les colonies bien isolées (photo 3, page 113).



T30S

T30N2

Photo 3

Rhizobium trifolii miqueux (T 30 S) et non miqueux (T 30 N 2).

Milieu RC

Age : 6 jours. Environ 2/3 grandeur  
naturelle.

#### 4.2.2.1. - METHODES DIVERSES

- Par repiquages sur milieux solides, nous n'avons jamais observé de colonies non muqueuses dans tous les clones muqueux utilisés.

- Au cours des isolements à partir de nodules, les résultats ont été également négatifs.

- Par culture à des températures inhabituelles (37°C pour les souches de Luzerne, 31°C pour les autres), ou par culture sur milieux riches en azote (RC + 4 g/l de casamino-acids) toutes les colonies apparues étaient muqueuses (souches testées : T 1 S, T 8 S, T 20 S, T 30 S, L 4 S, L 5 S, M 2 S, M 3 S, M 5 S, P 2 S, P 3 S, K 1 S, K 3 S).

- Par filtration sur papier (papier Eton Dickman, grade 263, 18 épaisseurs, sur filtre Seitz) selon la méthode de MARUYAMA (1956, 335), destinée à sélectionner les cellules les plus petites pour obtenir des cultures synchrones, il n'a pas été possible d'obtenir de clones non muqueux ou moins muqueux (souches testées : L 5 S et T 1 S).

- Au cours des essais d'obtention de mutants auxotrophes ou pigmentés par action de la nitrosoguanidine, de l'acide nitreux, de la 2-amino-purine, des rayons UV, par chauffage à 70 ou 80°C (voir méthodes page 135 et résultats page 140), nous n'avons jamais observé de variation de mucosité (souches testées page 141) sauf avec la souche T 20 S. Cette souche, par action des UV, a fourni un mutant non muqueux (T 20 U 3) stable.

4.2.2.2- REPIQUAGES EN MILIEUX LIQUIDES

Cette méthode est fondée sur l'observation selon laquelle les souches non muqueuses se développent plus rapidement que les muqueuses. La souche est repiquée, dès le début de la phase exponentielle de croissance (DO 10 à 20) sur le même milieu liquide (RC), indéfiniment. On obtient ainsi, après de nombreux repiquages, un enrichissement en non muqueux, jusqu'à des proportions qui permettent de les déceler parmi les muqueux, par isolement sur milieu gélosé. Les résultats suivants ont été obtenus :

Souche :	T 1 S	:	aucune variation (après 20 repiquages)
	T 31S	:	aucune variation (après 20 repiquages)
	T 8 S	:	un clône (T 8 N 2) formant des colonies moins muqueuses et plus opaques que T 8 S
	T 20 S	:	deux clônes (T20 N2 et T20 N3) non muqueux stables
	M 2 S	}	: pour chacune de ces souches, après quelques repiquages, on a observé plusieurs types de colonies :
	M 3 S		
	M 5 S		
		-	type parental : colonies à mucus très abondant, transparent et fluide, entourant un centre opaque,
		-	type non muqueux (respectivement M2 N1, M3 N1, M5 N1) : colonies non muqueuses, petites, opaques, dont l'aspect est celui du centre des colonies muqueuses,
		-	type muqueux (respectivement M2 N2, M3 N2, M5 N2) semblables au type sauvage, mais dont les colonies sont entièrement transparentes, sans centre opaque.
	M 1 S	}	: Ces souches dont les colonies sont strictement semblables à celles de M 2 S, M 3 S et M 5 S, n'ont jamais montré la dissociation caractéristique de ces dernières, après 20 repiquages.
	J 1 S		
	L 4 S, L 5 S, P 2 S, K 1 S, K 3 S	:	aucune variation après 20 repiquages
	P 3 S	:	un clône P3 N1, très peu muqueux, mais instable, a été obtenu après sélection progressive.

Agrobacterium tumefaciens B6 : après 15 repiquages : un clône stable moins maqueux, à colonies plus bombées, plus réfringentes, ne confluent pas quand elles sont serrées.

Agrobacterium radiobacter Tr6 : un clône ayant même aspect que le précédent, obtenu après 22 repiquages.

- Par repiquages des "collerettes", nous avons obtenu les mêmes résultats qu'avec la méthode précédente, mais beaucoup plus lentement.

Souches testées : T 1 S, T 8 S, T 20 S, T 30 S, M 2 S, M 3 S, M 5 S, J 1 S, L 4 S, L 5 S, P 2 S, P 3 S, P 7 S, K 1 S, K 3 S, A. tumefaciens B6 et A. radiobacter Tr6.

#### 4.2.2.3. - SELECTION DE MUTANTS GALACTOSE NEGATIFS (Gal<sup>-</sup>)

Toutes les souches utilisées sont capables d'utiliser le galactose.

- Pour la souche T 1 S : nous n'avons pas trouvé de Gal<sup>-</sup> dans 500 colonies répliquées sur milieu galactosé.

- Traitements avec pénicilline :

##### a) Essais préliminaires

Bien que la sensibilité des souches varie assez largement et que pour certaines (de Pois en particulier) la dose bactériostatique soit élevée (près de 1000 UI/ml) toutes les souches sont sensibles à la dose de 2000 UI/ml utilisée dans la suite des expériences.

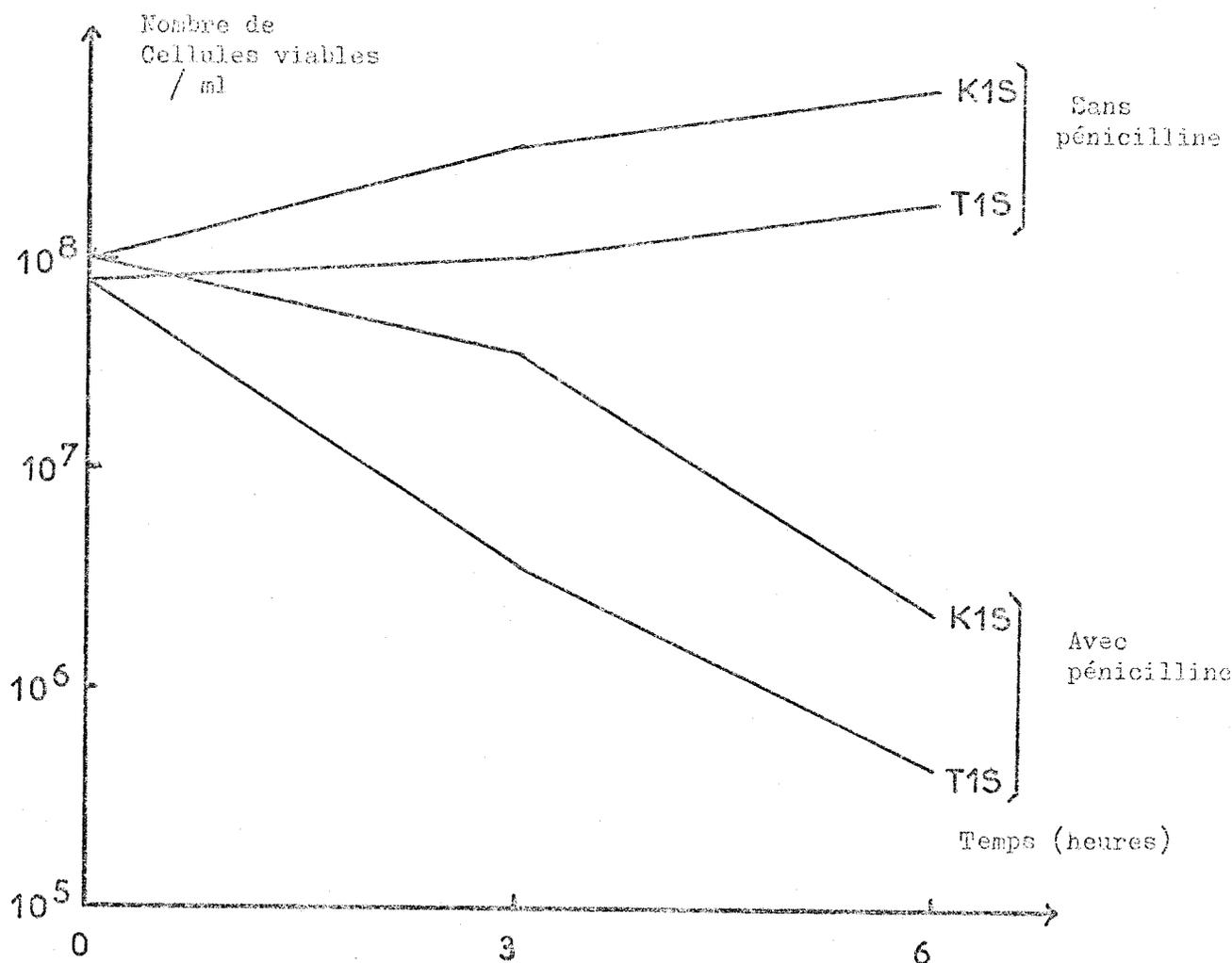
Le temps d'action nécessaire pour obtenir une chute de population de 100 à 1 ou 1000 à 1, a été déterminé pour deux souches : une sensible

(T 1 S) et une peu sensible (K 1 S) à la pénicilline.

Les souches ont été cultivées en milieu RC, puis centrifugées, lavées à l'eau distillée et remises en suspension dans du milieu R avec les vitamines nécessaires. Après avoir dégorgé 3 heures dans ce milieu, elles ont été mises en présence de pénicilline (2000 UI/ml). Les prélèvements (à 3 et 6 heures) ont été incubés 30 min avec de la pénicillinase, puis dilués et numérés. Les résultats sont portés sur la figure 13.

Figure 13

MORTALITE DE RHIZOBIUM TRIFOLII (T 1 S) ET RHIZOBIUM LUPINI (K 1 S)  
EN PRESENCE DE PENICILLINE



Le temps d'action nécessaire semble donc être de plus de 6 heures. Néanmoins, au cours d'autres expériences, nous avons obtenu une chute de population de 1000 à 1 pour la souche T 1 S, en 4 heures. Cette différence doit sans doute être attribuée à des variations du mode opératoire : les prélèvements n'ont pas été traités par la pénicillinase, mais centrifugés, lavés à l'eau distillée et replacés en milieu complet glucosé avant d'être dilués et numérés ou remis en incubation.

#### b) Mode opératoire

Le mode opératoire utilisé pour l'obtention de Gal<sup>+</sup> a donc été le suivant : après culture sur milieu minimum galactosé, jusqu'à densité optique d'environ 80, la pénicilline est ajoutée (2000 UI/ml). Après 4 à 6 heures d'incubation, la culture est centrifugée, lavée à l'eau et reprise dans du milieu RC glucosé. Quand la croissance a repris, la culture est diluée et étalée sur milieu RC glucosé et éventuellement répliquée sur milieux minimum plus galactose et plus galactose et glucose.

#### c) Résultats

Avec la souche T 1 S, nous n'avons observé aucun non muqueux sur 5000 colonies et aucun Gal<sup>+</sup> dans les 110 colonies testées. Les résultats ont été identiques avec : P 2 S, P 3 S, L 4 S, K 1 S et Agrobacterium tumefaciens B6. Des cultures de T 1 S, P 2 S et K 1 S ayant subi deux fois ce traitement, n'ont pas fourni non plus de colonies non muqueuses.

Avec la souche T 1 S, après dégorgement en milieu minimum porté à 6 h et traitement par la pénicilline (2000 UI/ml) porté à 16 h, sur 380 colonies testées, 6 se sont montrées sensibles à l'addition de glucose au milieu RC + galactose, mais aucun Gal<sup>+</sup> stable n'a pu être obtenu. Aucune colonie n'était non-muqueuse. Avec les souches T 1 S, K 1 S et P 2 S, les résultats ont également été négatifs après 12 h de traitement à 5000 UI/ml.

- Sélection par la pénicilline après action d'agents mutagènes

Au cours des essais d'obtention de mutants auxotrophes avec la nitrosoguanidine (souches T 1 S, P 2 S, L 5 S) ou les UV (souches T 1 S et P 2 S) ( $10^{-3}$  survivants), nous avons soumis des prélèvements au traitement à la pénicilline en présence de galactose. Les résultats ont été négatifs pour toutes les souches.

4.2.2.4. - ACTION DES BACTERIOPHAGES

a) Isolement

L'isolement des phages a lieu à partir de terres ayant porté une culture d'au moins un an de la légumineuse-hôte de la souche pour laquelle on cherche des phages.

La terre est délayée dans un minimum d'eau distillée, filtrée sur papiers de plus en plus fins, puis sur membrane stérilisante (0,45  $\mu$ ). 1 ml de l'extrait de sol est mélangé à 1 ml de la culture de Rhizobium (DO 80 à 100) en présence de  $Ca^{++}$  (1,5 mg  $CaCl_2$ /ml). Après 20 min

d'incubation sans agitation, le mélange est coulé en double couche avec 3 ml de gélose à 7,5 p. 1000, sur milieu RC.

On observe ainsi, avec certains sols, l'apparition de plages de lyse. Pour certaines souches (T 1 S, T 17 S, T 19 S, T 30 S) on observe même de rares plages en l'absence d'extrait de sol.

Les plages de lyse, reportées dans des cultures en début de phase exponentielle de croissance, en provoquent la lyse. A partir de ces cultures lysées, on peut préparer une suspension de phages dépourvue de bactéries en ajoutant 0,1 ml de chloroforme par ml de culture. Après agitation vive et décantation (30 min), le surnageant est stérile.

#### b) Utilisation

Une suspension de phages actifs sur T 20 S (titre : entre  $10^8$  et  $10^9$  particules/ml) a été utilisée pour l'obtention de non muqueux. Les souches suivantes sont sensibles à ce phage : T 11 S, T 21 S, T 24 S, T 28 S, T 30 S, T 32 S. Les souches suivantes lui sont résistantes : T 1 S, T 5 S, T 12 S, T 17 S, T 18 S, T 19 S, T 25 S, T 34 S.

Une plage de lyse est mise en émulsion dans 0,2 ml de la culture en présence de  $Ca^{++}$  et coulée sur milieu RC. Environ 20 p. 100 des colonies de T 20 S et 35 p. 100 des colonies de T 24 S résistantes aux phages, sont non muqueuses.

Les souches non muqueuses T20 N 4 à T20 N 13, T20 N15, T20 N18 et T20 N21, ainsi que T24 N1 et T24 N2 ont été obtenues par cette méthode. Certaines sont instables : T20 N9, T20 N10, T20 N12, T20 N13, T20 N15, T20 N18 et T20 N21 et n'ont pas été étudiées.

Un autre phage, isolé de T 30 S (plage formée en absence d'extrait de sol) a servi à obtenir les clones T30 N2, T30 M3 et T30 N4, non muqueux, capables de pousser sur RC + 4 g/l de casamino-acids.

Tous les sols de Luzerne testés sur M5 N1 se sont révélés dépourvus de phages, sauf un qui a donné lieu à des plages de lyse peu distinctes et n'a pas été étudié.

#### 4.2.3. -- DISCUSSION

Il ressort de ces essais que les techniques classiques d'obtention de mutants bactériens ne s'appliquent pas bien à l'obtention de mutants à colonies anormales chez Rhizobium. Outre leur rareté, les mutants obtenus par ces méthodes (T20 U3) ont perdu leurs aptitudes symbiotiques.

Deux méthodes seulement parmi celles employées pour la sélection de mutants non muqueux ont donné des résultats nettement positifs. La sélection par repiquages successifs sur milieu liquide a permis d'obtenir les clones suivants :

T8 N2, T20 N2, T20 N3, H2 N1, M3 N1, M5 N1, P3 N1

Tous ces clones ont gardé les propriétés symbiotiques des souches sauvages. Ils sont tous stables, même après passage sur plante, sauf T8 N2 et P3 N1.

Il faut remarquer que cette méthode n'est pas applicable à toutes les souches (T 1 S, T 31 S, H 1 S, J 1 S, L 4 S, L 5 S, P 2 S, K 1 S, K 3 S sont restées stables). Néanmoins, cette méthode a

l'avantage de ne pas influencer sur les propriétés symbiotiques. D'autre part, la mutation ( $\text{Mu}^-$ ) obtenue par cette méthode est très stable, comme toutes les mutations naturelles. Dans deux cas seulement (T 8 N2 et P3 N1) un taux important de réversion vers le type  $\text{Mu}^+$ , avec tous les intermédiaires entre  $\text{Mu}^-$  et  $\text{Mu}^+$  a été observé. Il faut noter toutefois que cette observation est limitée aux deux seuls clones qui n'ont pas été obtenus par mutation brutale, mais par sélection progressive du type  $\text{Mu}^+$  vers le type  $\text{Mu}^-$ . En outre, cette méthode a l'avantage de sélectionner des clones à croissance rapide.

Certaines souches de Luzerne (M 1 S) ne peuvent être séparées en  $\text{Mu}^+$  et  $\text{Mu}^-$  malgré l'aspect mélangé de leurs colonies, exactement semblables à celles (M 2 S, M 3 S, M 5 S) qui sont dissociables facilement en  $\text{Mu}^+$  et  $\text{Mu}^-$ . JENSEN (1942, 336) avait déjà observé cette dissociation et rapporte que les deux types ( $\text{Mu}^-$  et  $\text{Mu}^+$ ) sont également capables d'entrer en symbiose efficiente avec la Luzerne. Nos résultats confirment ces observations, mais à la différence de JENSEN, nous n'avons pas observé de réversion des  $\text{Mu}^-$  vers le type  $\text{Mu}^+$  dans les nodules, même les plus âgés (deux mois).

Le problème reste entier de savoir pourquoi des souches de Luzerne se perpétuent sous forme d'un mélange  $\text{Mu}^+$  et  $\text{Mu}^-$  en proportion constante.

L'autre méthode employée avec succès est basée sur l'observation de KLECZKOWSKA (1950, 337) selon laquelle il apparaît de nombreux variants  $\text{Mu}^-$  dans les résistants aux phages.

KLECZKOWSKA a observé que d'autres mutations pouvaient accompagner l'acquisition de la résistance aux phages : perte d'aptitudes symbiotiques, acquisition de pigmentation.

Nous n'avons observé aucun variant pigmenté dans nos essais, mais pour certains des clônes ( $Mu^-$  et  $Mu^+$ ) les propriétés symbiotiques ont été modifiées :

T20 N4	$Mu^-$	ne nodule pas
T20 N6	$Mu^-$	ne nodule pas
T20 N14	$Mu^+$	ne nodule pas
T20 N20	$Mu^+$	ne nodule pas
T20 N11	$Mu^-$	nodule. Inefficient

Les autres clônes résistants aux phages qui ont été testés, sont restés efficaces :

T20 N5	} $Mu^-$	T20 N16	} $Mu^+$
T20 N7		T20 N17	
T20 N8		T20 N22	

Un autre inconvénient de cette méthode, également signalé par KLECZKOWSKA est le taux de réversion important de nombreux variants obtenu par ce moyen. Par contre, cette méthode semble pouvoir s'appliquer à toutes les souches : les quatre testées par KLECZKOWSKA et les trois testées par nous, ont fourni de nombreux variants  $Mu^-$ . L'explication de l'apparition de tels variants dans les résistants aux phages reste inconnue.

Il semblerait, en première hypothèse, que les cellules non muqueuses soient moins sensibles aux phages. Néanmoins, aucune relation directe n'est connue entre le caractère muqueux d'une souche et sa sensibilité aux phages et il faut admettre que celui-ci ne fait que révéler des mutants préexistants, sans les sélectionner.

La méthode d'obtention de clones  $\text{Gal}^-$  par traitement à la pénicilline en présence de galactose, employée avec succès chez E. coli n'a pas donné de résultat positif avec les souches de Rhizobium que nous avons utilisées. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce fait :

- 1) il n'y a pas de galactose dans le mucus des souches testées,
- 2) le galactose n'est pas indispensable à la biosynthèse du mucus.

Toutefois, les modifications dans la composition doivent s'accompagner de modification de structure et donc d'aspect, que nous n'avons jamais observées.

Le mucus de nos souches n'ayant pas été analysé, ces deux hypothèses ne peuvent être écartées. Nous avons supposé que le mucus de ces souches comprenait du galactose, comme l'ont rapporté différents auteurs (CLAPP et DAVIS, 1970, 338) (DE LEIZAOLA et DEDONDER, 1955, 339) (AMARGER et col., 1967, 340). Néanmoins, d'autres auteurs ont observé une absence de galactose (GRAHAM, 1965, 341) et l'hypothèse a été émise que la composition du mucus pouvait varier selon le milieu de culture (HUMPHREY et VINCENT, 1959, 342).

- 3) le métabolisme intermédiaire des Rhizobium étant inconnu, et peut être différent de celui des Enterobacteriaceae, il est possible qu'il n'existe pas d'enzymes servant à la fois et obligatoirement au catabolisme et à l'anabolisme du galactose. Il serait ainsi impossible d'obtenir des  $\text{Gal}^0$  parmi les  $\text{Gal}^-$ .

- 4) aucun mutant  $\text{Gal}^-$  n'est apparu dans nos expériences. Ceci semble avoir été le cas pour le petit nombre de colonies testées, et cette hypothèse serait compatible avec la très grande stabilité des Rhizobium que nous avons observée lors d'essais d'obtention de mutants auxotrophes.

#### 4.3. - MUTANTS PIGMENTES

##### 4.3.1. - HISTORIQUE

L'apparition de mutants pigmentés chez Rhizobium a été maintes fois rapportée.

ALMON et BALDWIN (1932, 343 ; 1933, 344) en ont obtenu chez R. trifolii par diverses méthodes ; lyse phagique, culture sur sol stérilisé ou sur milieu épuisé par une culture préalable du même organisme, par filtration, etc... Les pigmentations obtenues étaient : jaune, orange, rose, brune. Ces mutants ne nodulent pas, mais un reverse non pigmenté a pu être isolé, qui nodule.

Mc CALLA (1937, 345) avec des souches de Luzerne et de Soja, a également obtenu des mutants pigmentés en rose, jaune ou rouge, par culture sans calcium ni magnésium. Ces mutants ne sont stables qu'en absence de calcium. La réversion suit l'ordre suivant : rouge, jaune, rose, sauvage. Les mutants ne sont pas infectifs, mais les reverses le sont. NORRIS (1958b, 346) a isolé d'un nodule de Lotononis bainesii Baker un clone rouge qui nodule.

KLEINHAUF (1966, 347) a obtenu par traitement d'une souche de Lupin par l'acide nitreux, des pigmentés, dont les aptitudes symbiotiques n'ont pas été rapportées.

HEUMANN (1968, 348) également avec une souche de Lupin et par la même méthode, a obtenu des souches pigmentées, dont la 1-99, qui ne nodule pas. Aucun reverse capable de noduler n'a été rapporté.

BISSET (1952, 349) avec R. meliloti, R. lupini et R. leguminosarum a observé l'apparition de variants pigmentés en orange, après chauffage à 100°C (10 min) de souches formant des "spores".

GILLBERG (1968, 350) étudiant dans des conditions contrôlées des cultures de R. meliloti productrices de structures analogues à des spores, a montré que ces souches pouvaient résister 30 min à 70°C avec des taux de survie de  $10^{-3}$  à  $10^{-2}$  en utilisant des cultures de 7 jours sur milieu avec mannitol et saccharose au lieu de glucose.

Le même auteur, dans des études ultérieures (1969a, 351 ; 1969b, 352) rapporte que parmi les survivants à ce traitement, il apparaît fréquemment des mutants pigmentés en jaune ou orangé, dont certains résistent 20 min à 100°C. Ces mutants pigmentés, thermorésistants, sont également résistants aux UV et ne nodulent pas. Certains réversent dans des proportions importantes (4 p. 100) , d'autres ne réversent que sous l'action de traitements mutagènes. Tous les mutants réverses perdent, avec leur pigmentation, leur résistance aux températures élevées et aux UV, et retrouvent leurs aptitudes symbiotiques.

GILLBERG a observé des fréquences de 80 à 90 p. 100 de pigmentés en soumettant certaines souches à plusieurs passages sur chloramphénicol ou néomycine à des concentrations juste inhibitrices, puis à un chauffage (30 min à 70°C) ou à une irradiation aux UV.

Par contre, GRAHAM et col. (1963, 353) sur 79 souches isolées de légumineuses diverses, n'en ont trouvé aucune capable de survivre 30 min à 60°C après 3 jours de culture en milieu à base d'extrait de levure et mannitol. Sur les 164 souches examinées au 10ème jour de culture, aucune ne formait de spores, même en présence de divers acides gras, d'acide dipicolinique ou sels minéraux. De nombreux autres auteurs ont également rejeté catégoriquement la possibilité d'une sporulation ou d'une thermo-résistance chez les Rhizobium, et par

conséquent, l'apparition de pigmentés dans les thermorésistants.

#### 4.3.2. - METHODES

Pour l'obtention de thermorésistants, 1 ml de culture (âge : 3 jours ou une semaine) en milieu RC liquide, avec glucose ou mannitol, est porté à 70, 80 ou 100°C pendant 30 min. La température est contrôlée au moyen d'un thermomètre plongé dans un tube contenant 1 ml d'eau et placé dans le même bain-marie que les cultures.

Après 30 min à 70, 80 ou 100°C, la culture est immédiatement diluée et étalée sur milieu RC gélosé. Pour l'obtention de pigmentés par traitements mutagènes, les modes opératoires sont ceux utilisés pour l'obtention de mutants auxotrophes, sans sélection (page 135).

#### 4.3.3. - RESULTATS

Au cours des multiples contrôles de pureté effectués sur nos souches, nous n'avons jamais observé la présence de structures analogues à des spores.

Néanmoins, par chauffage à 70°C, 30 min, nous avons observé l'apparition de survivants avec toutes les souches testées : T 1 S, T 2 S, L 2 S, L 3 S, M5 N1, P 1 S, K 1 S. Tous les résistants apparus, sauf ceux obtenus avec K 1 S, ont été testés sur plante et tous nodulent leur hôte. Le taux de survie (souches T 1 S et T 2 S) est de l'ordre de  $10^{-5}$  en milieu RC avec glucose comme avec mannitol. Pour la

souche M5 N1, après chauffage à 80 ou 100°C (30 min) aucun survivant n'a été décelé.

Nous n'avons toutefois observé aucune colonie pigmentée par étalement des cultures chauffées à 70°C. Pour la souche M5 N1, la méthode préconisée par GILLBERG (1969b, 354) (plusieurs passages sur chloramphénicol puis chauffage ou traitement aux UV) n'a pas permis l'isolement de pigmentés.

Par contre six mutants pigmentés ont été obtenus au hasard d'autres essais d'obtention de mutants (Gal<sup>-</sup>, Mu<sup>-</sup>, auxotrophes):

- T20 A1, jaune-ocre, a été obtenu par culture de T20 N3 (Mu<sup>-</sup>, blanc) en milieu R + thiamine + biotine + 2-aminopurine (100  $\gamma$ /ml, une semaine). Les colonies de T20 A1 accrochent à la gélose et sa croissance est très lente. Ses propriétés physiologiques et biochimiques (galerie) sont identiques à celles de T20 S et T20 N3. Ses propriétés symbiotiques n'ont pas été testées.

- T20 A3 et T20 A4, orange-ocre, ont été obtenus par culture de T20 N3 en milieu R + thiamine + Biotine + 2-aminopurine (100  $\gamma$ /ml) + phénylalanine (100  $\gamma$ /ml) lors d'un essai d'obtention de Pha<sup>-</sup>. Ces deux clones ont été obtenus ensembles, mais T20 A3 est plus ou moins dépendant pour la phénylalanine. La croissance de T20 N4 est très lente. Leurs galeries sont identiques à celles de T20 S et T20 N3. la souche T20 A3, seule testée sur Trèfle, ne nodule pas.

- T20 U1, jaune, muqueux, a été obtenu par traitement de T20 S aux UV. Les colonies sont très bombées et difficiles à dissocier. Sa croissance est rapide et sa galerie normale, sauf sur milieu au rouge congo :

sur ce milieu, les colonies ont un aspect cireux, ridé, très différent des cultures obtenues sur les autres milieux. Cette souche ne nodule pas.

- T20 U2, jaune, non muqueux. Dérive du précédent par mutation naturelle. Par irradiation aux UV, il a été possible d'en obtenir des colonies muqueuses, du type T20 U1. Cette souche T20 U2 ne nodule pas.

- M5 N4, non muqueuse, orangé. Dérive de M5 N1 par traitement dans du tampon acétate (pH 5,55, 3 heures) sans nitrosoguanidine (essai témoin), puis par la pénicilline (5000 UI/ml, 6 heures, en milieu minimum). Les colonies ont une consistance ferme et accrochent à la gélose. Cette souche ne nodule pas.

Dans trois de ces mutants, T20 U1, T20 U2 et M5 N4, il apparait, surtout dans les cultures âgées, des formes très longues parfois branchées donnant un aspect d'actinomycète à la culture (photos page 130).

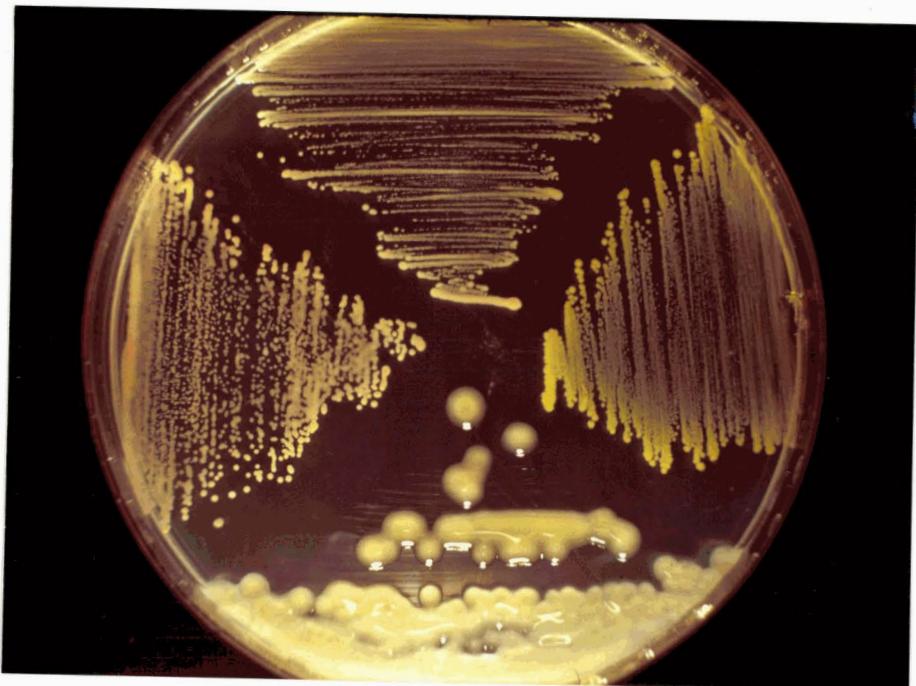
#### 4.3.4. - DISCUSSION

La "sporulation" et la thermorésistance chez Rhizobium sont très controversées. GRAHAM et col. (1963, 355) n'ont pas observé ces phénomènes. BISSET (1952, 356) a rapporté de tels phénomènes, mais pas pour toutes les souches ; en particulier celles isolées des légumineuses des régions tempérées sembleraient rarement capables de produire des "spores". GILLBERG (1969a, 357) a montré en outre qu'il



Photo 4 : Formes longues chez la souche T20U1  
(Rhizobium trifolii). Milieu : RC. Coloration :  
Fuschine basique. (X 1000)

T 20 A3



M 5 N4

T 20 U2

T 20 U1

Photo 5 : Mutants pigmentés de Rhizobium trifolii  
(T20U1, T20U2, T20A3) et Rhizobium meliloti (M5N4)  
Milieu : RC. Age : une semaine. Environ grandeur  
naturelle.

existait, en dehors des questions de souches, une influence déterminante de l'âge de la culture et du milieu et il suppose que les conditions employées par GRAHAM et col. ne sont pas adéquates.

Il faut admettre que dans nos essais, même si les milieux conviennent à la sporulation, nos souches en sont incapables, car nous n'avons jamais observé de spores quel que soit l'âge des cultures. Nous avons par contre observé l'apparition de survivants après 30 min à 70°C et cette résistance n'altère pas les aptitudes symbiotiques.

Nous n'avons pas observé de pigmentés parmi les survivants au chauffage, contrairement à BISSET (1952, 358) et GILLBERG (1969b, 359). Néanmoins, comme ces auteurs ont observé ce phénomène avec des souches "sporulantes", il est possible que la méthode utilisée avec succès pour de telles souches ne convienne pas pour les souches que nous avons utilisées, qui ne forment pas de spores.

Par contre, nous avons pu obtenir des mutants pigmentés à partir de deux souches (T 20 S, M5 N1) lors de divers traitements mutagènes.

L'isolement, par diverses méthodes, de pigmentés, avait été rapporté à maintes reprises avant les travaux de GILLBERG. Néanmoins ces observations ont été négligées et l'appartenance de tels clones pigmentés au genre Rhizobium a même été mise en doute, parce que leurs propriétés symbiotiques ont disparu et que d'autres caractères, absents chez les Rhizobium typiques, accompagnent la pigmentation : résistance aux UV et aux températures élevées, aspect anormal des colonies ou mêmes propriétés physiologiques inhabituelles ou encore

absence de bactéroïdes artificiels (voir propriétés physiologiques et biochimiques de la souche pigmentée 1-99, tableau V page 62 ). De même chez les mutants pigmentés que nous avons obtenus, plusieurs caractères ont varié en même temps que l'acquisition de la pigmentation :

- la vitesse de croissance est très réduite pour T20 A1 et T20 A4,
- la production de bactéroïdes artificiels n'a pas lieu pour T20 A3, T20 U1, T20 U2,
- les propriétés symbiotiques sont altérées : des quatre mutants testés sur plante (T20 A3, T20 U1, T20 U2 et M5 N4) aucun ne nodule,
- les colonies, chez T20 U1, sont bombées et réfrigentes sur tous les milieux. Sur le milieu au Rouge Congo, elles ont un aspect cireux et ridé très différent des colonies normales de Rhizobium,
- chez les six mutants pigmentés que nous avons isolés, les colonies ont une consistance ferme, accrochent à la gélose et sont difficiles à mettre en suspension,
- il existe des formes longues, chez trois de ces souches (T 20 U1, T20 U2, M5 N4). Ce phénomène n'a jamais été rapporté chez les Rhizobium, et sa signification est inconnue. Nous avons pu observer des formes longues très semblables chez Chromobacterium, cultivé en présence de pénicilline. Ces formes longues pourraient être responsables de la consistance spéciale des mutants pigmentés que nous avons isolés.

Malgré tous ces caractères qui les différencient des souches sauvages, les clones pigmentés ont gardé les mêmes propriétés biochimiques et physiologiques que les souches d'origine. Leur appartenance au genre Rhizobium semble donc indiscutable, quoiqu'ils diffèrent nettement, pour d'autres caractères, du type, très homogène, rencontré dans la nature.

#### 4.4. - MUTANTS AUXOTROPHES

##### 4.4.1. - HISTORIQUE

L'obtention de mutants auxotrophes chez Rhizobium a été rapportée par quelques auteurs seulement, jusqu'aux travaux de HEUMANN.

BALASSA (1963, 360) par action de moutarde azotée et sélection à la pénicilline sur une souche isolée de Lupinus hartwegii, a obtenu deux mutants dépendants, l'un pour la cystéine, l'autre pour la valine. Sur milieu minimum, ils donnent naissance à trois types de colonies :

- colonies réverses, de type sauvage Cys<sup>+</sup>,
  - "instables", phénotypiquement Cys<sup>-</sup> mais qui par étalement, ségrègent en Cys<sup>+</sup>, Cys<sup>-</sup> et "instables",
  - microcolonies Cys<sup>-</sup> pour lesquelles le taux de réversion est de  $5 \cdot 10^{-9}$ . Le mutant dépendant pour la valine a le même comportement.
- Les propriétés symbiotiques de ces mutants n'ont pas été rapportées.

GUPTA et KLECZKOWSKA (1962, 361) ont obtenu par action des UV sur une souche de R. trifolii, exigeante en biotine, un mutant indépendant vis à vis de cette vitamine, mais de mutants auxotrophes.

JORDAN (1952, 362) dans une étude sur l'action de divers agents mutagènes (rayons X et UV, nitrate d'uranium, diazométhane) sur R. meliloti, rapporte l'obtention de mutants auxotrophes, mais leurs exigences n'ont jamais été décrites.

IMSENECKI et col. (1970, 363) ont obtenu de nombreux résistants aux antibiotiques, mais pas d'auxotrophes dans des essais pratiqués avec les UV, la nitrosométhylurée, l'acide nitreux et l'éthylèneimine.

SCHWINGHAMER (1960, 364 ; 1961, 365 ; 1968, 366 ; 1970, 367)

a également observé chez R. trifolii et R. leguminosarum que les traitements mutagènes classiques (rayons X et UV, nitrosoguanidine) ne permettaient pas d'obtenir facilement de mutants à déficiences métaboliques. Il a par contre obtenu, parmi des clones résistants à des antimétabolites (page 108) des mutants inefficients, dont certains sont exigeants en vitamines, particulièrement en thiamine. Certains de ces mutants retrouvent leur efficacité par réversion vers le type thiamine<sup>+</sup>. Cet auteur a également obtenu un mutant exigeant en riboflavine, nodulant, mais effectif seulement en présence de riboflavine.

RAINA et MODI (1969, 368) et DENARIE (1969, 369) chez des souches de Vigna sinensis et de Luzerne, respectivement, ont obtenu par action de la nitrosoguanidine, des mutants dépendants pour l'adénine. Celui décrit par DENARIE est inefficace, mais tous les réverses obtenus sont efficaces.

KOWALSKI (1970, 370) avec R. meliloti, a obtenu par traitement aux UV et enrichissement à la streptomycine, sur 135 clones testés, un mutant stable dépendant pour la lysine. Celui-ci est inefficace et les lysine<sup>+</sup> obtenus à partir de ce mutant, par réversion ou transduction, sont également inefficaces.

KLEINHAUF (1966, 371) avec R. lupini, a obtenu par action de l'acide nitreux, au cours de recherches sur les mutants pigmentés, des clones dépendants pour la proline, la cystéine et la thiamine.

Enfin HEUMANN (1968, 372) a rapporté l'obtention de nombreux mutants auxotrophes avec R. lupini. A partir d'une souche sauvage, très muqueuse, non pigmentée, ne formant pas d'étoiles, par action de l'acide nitreux, des variants pigmentés ont apparu, parmi lesquels

un clône (1-99) a été sélectionné par examen microscopique pour sa capacité de former de nombreuses étoiles.

Cette souche (1-99), traitée à l'acide nitreux, fournit de nombreux variants auxotrophes, ou à pigmentation différente du sauvage, etc... Cette souche présente néanmoins des caractères aberrants pour un Rhizobium (tableau V page 62) elle est non-muqueuse, pigmentée, uréase <sup>-</sup>, ne forme pas ou peu de bactéroïdes et ne nodule pas. Elle ne produit pas de cyanocobalamine, mais en exige (voir page 92). Toutefois, selon HEUMANN (communication personnelle) elle est sensible à différents phages lytiques pour des R. lupini nodulants et elle a donné un mutant qui fournit constamment une forte proportion de bactéroïdes.

Nous avons essayé d'obtenir des mutants auxotrophes à partir de différentes souches dont la 1-99, par plusieurs méthodes.

#### 4.4.2. - METHODES

##### 4.4.2.1. - AGENTS MUTAGENES

##### 4.4.2.1.1. - RAYONS ULTRA-VIOLETS (UV)

Les cultures, en phase exponentielle de croissance (densité optique 40 à 80), sur milieu complet RC, sont diluées, étalées et irradiées. Quand un enrichissement est nécessaire, l'irradiation a lieu en milieu liquide (1 ml dans une boîte de Pétri en verre). Deux lampes ont été utilisées :

- MAZDA TO 16-496, Germicide (30 W)
- SYLVANIA G30 T8 Germinicidal (30 W) type A.

La première a été étalonnée ( $300 \text{ erg/s.cm}^2$ ), mais fournit beaucoup d'ozone et a été ensuite remplacée par la seconde qui n'en produit pas. L'ordre croissant de sensibilité des souches est : P 2 S, M 5 S, T 1 S, K 1 S, T 31 S, T 8 S, M 1 S, T 20 S. Le temps d'irradiation nécessaire pour obtenir  $10^{-2}$  à  $10^{-3}$  survivants est de 10 à 15 S pour la lampe MAZDA et de 14 à 20 S pour la SYLVANIA.

Nous n'avons pas observé de différence sensible de mortalité entre les cultures irradiées sur milieu solide et celles irradiées en milieu liquide. Toutes les cultures traitées aux UV ont ensuite été incubées à l'obscurité.

#### 4.4.2.1.2. - NITROSOGUANIDINE

##### Mode opératoire :

- Centrifuger 20 ml d'une culture de DO 80 environ sur milieu RC.
- Laver avec 10 ml de tampon acétate et reprendre le culot dans 0,5 ml du même tampon.
- Ajouter la solution de N-méthyl N'-nitro N-nitroso-guanidine et incubé.
- Ajouter 10 ml de milieu RC et centrifuger.
- Reprendre le culot dans 20 ml de milieu RC (plus 4 g/l de casaminoacids pour les souches de Luzerne et 1-99).
- Remettre en incubation jusqu'à reprise de la croissance et enrichissement par la pénicilline.

La mortalité observée dans le tampon acétate après 3 heures est la suivante (tableau X).

TABLEAU X

MORTALITE DE RHIZOBIUM spp. DANS LE TAMPON ACETATE A DIFFERENTS pH  
EN 3 HEURES

Souche	pH	Mortalité
T 1 S	5,0	totale
	5,5	totale
	5,7	10 p. 100
	6,0	négligeable
M5 N1	5,5	60 p. 100
	5,7	10 p. 100
P 2 S	5,7	65 p. 100
1-99	5,7	inférieure à 10 p. 100

La plupart des expériences ont donc eu lieu à pH 5,7. A ce pH, les temps d'action et taux de survie observés ont été les suivants (tableau XI).

TABLEAU XI

TAUX DE SURVIE DE RHIZOBIUM spp. APRES TRAITEMENTS PAR LA NITROSOGUANIDINE

Souche	Concentration finale de nitrosoguanidine ( $\gamma/ml$ )	Temps d'action (h)	taux de survie
T 1 S	3000 (pH 6)	4	$10^{-3}$
	1200	2,5	$6,6 \cdot 10^{-3}$
	1200	2	$3 \cdot 10^{-2}$
	666	3	$5 \cdot 10^{-3}$
M5 N1	666	2	$10^{-3}$
P 2 S	666	3	$10^{-4}$
1-99	30	3,6	$8 \cdot 10^{-3}$



#### 4.4.2.1.3. - ACIDE NITREUX

La technique utilisée a été celle de HEUMANN (1962, 373). Pour les souches de Trèfle, le pH préconisé (4,5) étant létal, nous avons pratiqué des essais à pH 6, mais les taux de survie obtenus (80 p. 100 et plus) montrent qu'à ce pH le nitrite est sans action. Cet agent mutagène n'a été utilisé qu'avec la souche 1-99. Le taux de survie a été de 7,5 p. 1000.

#### 4.4.2.1.4. - 2-AMINOPURINE

Les cultures sontensemencées sur milieu complet ou minimum, additionné soit de casaminoacids (4 g/l) soit d'un acide aminé (0,1 mg/ml) et de 2-aminopurine (100 ou 500  $\gamma$ /ml).

Quand la culture a poussé, elle est diluée et étalée sur le même milieu sans aminopurine et les colonies sont testées par répliques sur milieu minimum.

#### 4.4.2.2. - METHODES D'ENRICHISSEMENT

##### 4.4.2.2.1. - PENICILLINE

L'enrichissement par la pénicilline a été effectué comme pour l'obtention de Gal<sup>-</sup> (page 116 ).

#### 4.4.2.2.2. - AMINOPTERINE

On a observé chez E. coli que les cellules thymine<sup>+</sup> étaient peu ou pas perméables à la thymine, alors que les thymine<sup>-</sup> viables doivent forcément être perméables à cette base. Or l'aminoptérine inhibe la méthylation de l'acide déoxyuridilique en acide thymidilique. Si donc on cultive une bactérie en présence de thymine et d'aminoptérine, seules les cellules thymine<sup>-</sup> vont pouvoir se développer (OKADA et col., 1962, 374) (HARRISON, 1965, 375) (FRIESEN et MAALØE, 1965, 376) (SMITH, 1967, 377). Cette technique a été utilisée pour l'enrichissement en thymine<sup>-</sup> avec les souches 1-99 et T 1 S.

#### Mode opératoire :

Après action d'un agent mutagène, on relance la culture en milieu minimum avec thymine (40  $\gamma$ /ml) puis on la repique sur le même milieu avec 200  $\gamma$ /ml d'aminoptérine (Triméthoprim, aimablement fournie par HITCHINGS (\*)). Après 48 heures d'incubation, on isole sur milieu minimum avec thymine, puis on réplique sur milieu minimum sans thymine.

#### Résultats :

Le produit utilisé n'est soluble qu'à pH très bas (1 mg/ml d'acide acétique 5N). La solution ainsi obtenue acidifie le milieu de culture et le développement des souches de Trèfle est inhibé. Par la suite, le pH a été ajusté à 7,2, avec de la soude stérile.

---

(\*) HITCHINGS : I SCARSDALE RD BURROUGHS WELCOME and Co (USA) INC.  
TUCKAHOE NY 10707

#### 4.4.2.3. - ANALYSE DES EXIGENCES

Nous avons utilisé la méthode des répliques (LEDERBERG, 1950, 378) en modifiant les concentrations de vitamines comme indiqué page 96 .

#### 4.4.3. - RESULTATS

##### 4.4.3.1. - SOUCHE 1-99 (R. LUPINI)

Lors d'un premier essai avec la nitrosoguanidine (30  $\gamma$ /ml) sans sélection par la pénicilline, il est apparu de nombreux mutants à pigmentation changée (plus de 10 p. 100, dont 1 p. 100 totalement blancs et 1 p. 1000 orange vif, avec tous les intermédiaires). Le taux d'auxotrophes a été de 10 p. 100 environ. Parmi les monoauxotrophes stables dont l'exigence a été déterminée, nous avons obtenu :

10		exigeants en cystéine
2	"	en cystéine ou méthionine
1	"	en méthionine
6	"	en histidine
2	"	en arginine
9	"	en adénine
1	"	en leucine
1	"	en proline
2	"	en isoleucine ou valine
1	"	en lysine
1	"	en phénylalanine

Nous avons également obtenu parmi les auxotrophes et parmi les prototrophes, différentes colorations (blanc, jaune citron, orangé). Ces résultats sont exactement comparables à ceux obtenus par HEUMANN.

Avec l'acide nitreux, nous avons obtenu 2 à 3 p. 100 d'auxotrophes, sans enrichissement par la pénicilline et environ 1 p. 100 de mutants à pigmentation changée.

Avec la 2-aminopurine, le taux d'auxotrophes n'a pas été évalué, mais la proportion de colonies à pigmentation changée n'a pas dépassé 1 p. 1000, même en utilisant 500  $\gamma$ /ml de l'agent mutagène. Les mêmes résultats ont été obtenus avec un mutant de la souche 1-99, exigeant en adénine, cultivé avec 2-aminopurine (10  $\gamma$ /ml) au lieu d'adénine.

#### 4.4.3.2. - SOUCHES DE TREFLE

Au cours de nombreux essais sur T 1 S, avec la nitrosoguanidine et la pénicilline, avec des taux de survie de  $10^{-4}$  à  $10^{-2}$  pour chacun de ces traitements, nous n'avons jamais isolé de mutants d'aucune sorte. Les mêmes résultats ont été obtenus par action des UV. L'acide nitreux ne peut être employé avec cette souche. Les essais de sélection de thymine  $^{-}$  par emploi d'aminoptérine, après action de la nitrosoguanidine, ont également été négatifs.

Avec les souches T 8 S et T 31 S, les essais effectués avec les UV et la nitrosoguanidine n'ont pas permis de trouver de clones exigeants.

Avec la souche T20 N3 (Mu  $^{-}$ ) seule la 2-aminopurine a été utilisée (100  $\gamma$ /ml, en milieu minimum avec un acide aminé : proline, phénylalanine, histidine). Sur 50 000 colonies observées, aucune n'était incapable de pousser en milieu minimum. Néanmoins, sur deux

colonies étudiées pour leur pigmentation, l'une (T20 A3) réagit à l'addition de phénylalanine en milieu minimum. Ce mutant a les mêmes propriétés physiologiques et les mêmes exigences en vitamines que la souche sauvage, mais forme peu ou pas de bactéroïdes et ne nodule pas.

#### 4.4.3.3. - SOUCHE M5 N1

Par traitement par la nitrosoguanidine, repiquage sur milieu RC avec casaminoacids et sélection par la pénicilline, il n'a pas été possible d'obtenir de mutants exigeants en acides aminés.

Par le même traitement mais repiquage sur milieu minimum avec adénine et traitement par la pénicilline, un clône nettement exigeant en adénine, mais instable a été isolé. Il n'a pas été possible d'en obtenir un clône stable.

Après action de la 2-aminopurine en présence de proline ou histidine ou phénylalanine, sur 6600 colonies étudiées, aucune n'a montré d'exigence. Les résultats obtenus après traitement aux UV et sélection par la pénicilline ont également été négatifs.

#### 4.4.3.4. - AUTRES SOUCHES

La souche P 2 S, traitée à la nitrosoguanidine puis par la pénicilline, n'a pas fourni de mutants exigeants. Par contre la même souche, ainsi que la L 4 S, ont fourni, après traitement aux UV et sélection par la pénicilline, des colonies à croissance ralentie sur milieu minimum. Toutefois aucune exigence précise n'a pu leur être attribuée.

4.4.4. - DISCUSSION

Lors d'essais préliminaires sur R. trifolii (T 1 S) avec la nitrosoguanidine et les UV, il a été impossible d'obtenir des mutants auxotrophes. Pour savoir si cet échec était dû à la souche ou aux méthodes employées, nous avons utilisé les mêmes méthodes avec R. lupini 1-99 avec laquelle HEUMANN (1968, 379) avait obtenu de nombreux mutants.

Les méthodes que nous avons employées sans succès avec R. trifolii (T 1 S) se sont révélées efficaces avec la souche 1-99, même en diminuant les doses ou temps d'action des agents mutagènes. Ces méthodes sont d'ailleurs employées couramment pour l'obtention de mutants à partir d'autres microorganismes et elles peuvent donc être mises hors de cause.

Pour savoir si la remarquable stabilité génétique de R. trifolii (T 1 S) était un caractère de souche ou un caractère de l'espèce R. trifolii ou du genre Rhizobium tout entier, nous avons étendu nos essais à d'autres souches : R. trifolii (T 8 S, T 20 S, T 31 S), R. meliloti (M5 N1), R. phaseoli (P 2 S), R. lupini (K 1 S).

A quelques exceptions près, les résultats obtenus pour toutes ces souches sont les mêmes que ceux obtenus avec T 1 S. Il semble donc que la stabilité génétique ou du moins la résistance aux agents mutagènes que nous avons employés, soit une caractéristique du genre Rhizobium tout entier et que sous ce rapport, comme pour plusieurs autres caractères (tableau V page 62) la souche 1-99 soit une exception.

#### 4.5. - MUTANTS FORMANT DES ETOILES (Sta<sup>+</sup>)

Dès 1902, BEIJERINCK et VAN DELDEN (380) ont observé chez Rhizobium et A. radiobacter dans certaines conditions, la formation d'amas de cellules, disposées en étoiles ou rosettes. Cette formation a été décrite également par LOHNIS (1905, 381), LOHNIS et HANSEN (1921, 382) et LIESKE (1928, 383). LOHNIS a donné à ce phénomène le sens d'une conjugaison, et les travaux de STAPP et BORTELS (1931, 384) par des colorations spécifiques des acides nucléiques, ont confirmé cette opinion. Ce n'est qu'en 1960 que HEUMANN (385) prouve qu'il y a recombinaison génétique au cours de ce processus, chez Rhizobium.

Néanmoins certains auteurs (BOSE et VENKATARAMAN, 1969, 386) ont rapporté une recombinaison, à fréquence faible ( $5.10^{-7}$ ) chez R. leguminosarum, par culture mixte, en milieu liquide, de clones résistant à la pénicilline et résistant à la streptomycine, sans mentionner de formation d'étoiles.

Selon NOWAK (1956, 387) la formation d'étoiles est une caractéristique de certaines souches, en particulier de souches non-muqueuses. Néanmoins, STAPP et BORTELS (1931, 388) ont noté une influence déterminante du milieu sur l'apparition de ce phénomène. Ainsi le milieu le plus approprié pour la formation d'étoiles chez Rhizobium doit être solide et contenir des catalyseurs d'oxydo-réduction ( $Fe^{++}$  et  $Mn^{++}$ ) alors que la formation d'étoiles a lieu plus facilement en milieu liquide pour les autres Rhizobiaceae, les Pseudomonas et Phyllobacterium. C'est également sur milieu solide que les auteurs suivants ont observé la formation d'étoiles chez Rhizobium : NOWAK (1956, 389), LEHNER et NOWAK (1957, 390), HEUMAN

(1968, 391), KNOSEL (1962, 392), STAPP et KNOSEL (1954, 393 ; 1956a, 394 ; 1956b, 395). KNOSEL, en particulier, rapporte que les milieux à base de peptones ou d'extrait protéiques et les bouillons minéraux avec la plupart des mono, di, ou polysaccharides, alcools et alcaloïdes, ne conviennent pas.

Nos souches ne forment pas d'étoiles sur les milieux ordinaires. D'une part, contrairement aux observations de BOSE et VENKATARAMAN (1969, 396) il nous a été impossible d'obtenir une recombinaison entre mutants de Rhizobium trifolii (T 1 S) résistant à l'azide de sodium et résistant au chloramphénicol, que le croisement ait lieu en milieu liquide comme décrit par BOSE et VENKATARAMAN ou sur milieu solide comme préconisé par HEUMANN (1968, 397).

Nous avons donc cherché, pour permettre la recombinaison, à obtenir des clones formant des étoiles (Sta<sup>+</sup>). La technique utilisée avec succès par HEUMANN (page 110) pour la souche 1-99, a été appliquée à diverses souches pour l'obtention de non-muqueux. L'examen microscopique des collerettes après 15 à 20 repiquages successifs, n'a jamais permis d'y voir d'étoiles", même pour les souches qui ont fourni, par ce moyen, des non-muqueux.

Dans un deuxième temps, nous avons essayé de modifier les milieux de culture. Aucune de nos souches, pas même les non-muqueuses (M5 N1, T20 N3, T24 N1, T30 N2) n'a formé d'étoiles sur les milieux solides préconisés par STAPP et BORTELS (1931, 398). Par contre, au cours d'expériences sur les sources d'azote, nous avons observé sur milieu liquide (RC + 4 g/l de phytone) une formation importante d'étoiles par une bactérie contaminante, indéterminée (souche Z 4 S)(\*) (voir photos page 146).

---

(\*) voir page 147

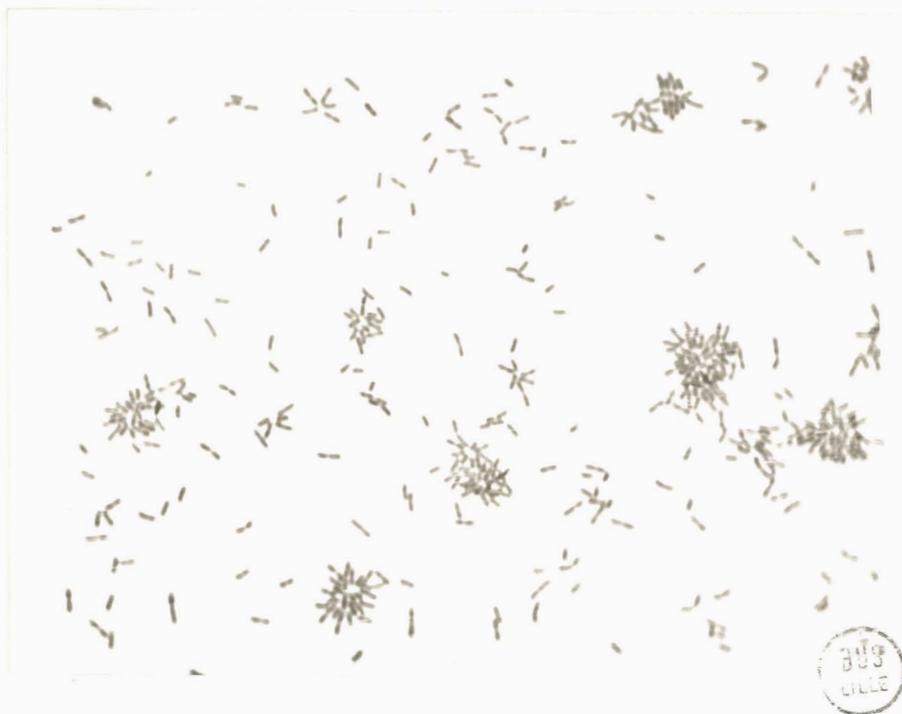


Photo 6



Photo 7

Photos 6 et 7 : Formation d'étoiles chez la souche Z4S (indéterminée)  
Milieu : RC + Phytone (4g/l). Coloration : Fuschine basique.(X 1000)

(\*) Les caractères de la souche Z 4 S sont :

Bâtonnets Gram  $^-$  ; 2,5 x 5  $\mu$  ; extrêmités arrondies ; un seul flagelle polaire ; non sporulés.

Colonies plates, petites, translucides, légèrement bleutées.

Caractéristiques physiologiques :

Aérobic à microaérophile	HUGH et LEIFSON : alcalinisee
Gélatinase -	Kligler : lactose -
Mobilité + (faible)	glucose -
Catalase + (faible)	H <sub>2</sub> S -
Uréase -	Cyt. oxydase -
Citrate (Simmons) -	Citrate (Christensen) -
APP -	AIA -
Utilise, sans produire d'acides :	glucose
	lactose
	mannitol
N'utilise pas : arabinose	dulcitol
amidon	salicine
Ne prend pas le Rouge Congo	
Incapable de se développer à pH 5,5	
Utilise le malonate	
Ne forme pas de pigments solubles sur les milieux pour détermination des <u>Pseudomonas</u>	
Ne provoque pas la formation de nodules sur Trèfle, Luzerne, Haricot, Pois.	

Cette souche n'est pas un Rhizobium. Elle présente certains caractères des Pseudomonas (aspect des colonies, flagellation), mais ne forme pas de pigment soluble, alcalinise les milieux et elle est Cyt. oxydase négative. Par ces caractères, elle s'apparente aux Achromobacteriaceae mais elle en diffère par sa flagellation. Ses caractéristiques sont très proches de celles de la souche 1-99.

Le milieu (RC + phytone) dans lequel cette bactérie a été isolée et sur lequel elle forme de nombreuses étoiles, a été essayé avec une souche non muqueuse de Rhizobium meliloti (M5 N1). Nous avons pu observer dans ces conditions une formation d'étoiles à branches peu nombreuses, très semblables à des bactéroïdes branchés, mais en différant nettement par le fait que les branches des étoiles (photos page 149) sont mobiles et se détachent les unes des autres pour former d'autres étoiles, alors que les bactéroïdes branchés sont immobiles et unicellulaires (photo page 58).

L'addition de phytone (peptone papaïnique de Soja) semble donc être un moyen de provoquer, en milieu liquide, la formation d'étoiles chez cette souche qui n'en forme normalement pas.

La formation d'étoiles semble donc être une adaptation au milieu plus qu'un caractère constitutif héréditaire. Néanmoins, cette adaptation est sous contrôle génétique et on connaît des mutants qui ne forment jamais d'étoiles dans les conditions où la souche sauvage en forme (MAYER, 1969, 399).

Ces étoiles sont très fragiles et disparaissent si des précautions sérieuses ne sont pas prises lors de l'étalement et de la coloration.



Photo 8



Photo 9

Photos 8 et 9 : Formation d'étoiles chez la souche M5N1  
(Rhizobium meliloti). Milieu : RC + Phytone (4g/l).  
Coloration : Fuschine basique . (X 1000)

#### 4.6. - DISCUSSION

De cette étude sur l'obtention de mutants de Rhizobium, il ressort une nette différence de comportement entre les souches isolées dans la nature et la souche 1-99 prise pour témoin.

Les seules mutations qu'il a été possible de mettre en évidence chez les premières concernent la pigmentation et la production de mucus. Des méthodes indirectes (sélection en milieu liquide, action de bactériophage) se sont révélées plus efficaces que l'emploi d'agents mutagènes pour l'obtention de non muqueux. Dans deux cas sur six, l'isolement de pigmentés a eu lieu sans agent mutagène et les méthodes préconisées par d'autres auteurs (GILLBERG, page 126) pour obtenir des pigmentés à partir de souche "sporulantes" ne font d'ailleurs pas non plus intervenir d'agents mutagènes.

Pour l'isolement de mutants auxotrophes, chez les souches naturelles, les agents mutagènes se sont révélés totalement inefficaces et aucune autre méthode n'a été employée (la méthode indirecte proposée par SCHWINGHAMER page 108, entraînent systématiquement des altérations des aptitudes symbiotiques). Par contre, avec la souche 1-99, des auxotrophes ont été obtenus avec tous les agents mutagènes essayés, et en grand nombre.

L'hypothèse selon laquelle la souche 1-99 ne serait pas un Rhizobium ne nous semble pas pouvoir être retenue, malgré ses caractères aberrants. En effet, d'après les observations de GILLBERG (page 126) et les nôtres, l'apparition simultanée de plusieurs caractères anormaux semble être la règle chez les mutants pigmentés, qui constitueraient ainsi un groupe atypique, mais à inclure dans le genre Rhizobium, à

côté du groupe très homogène et stable, seul reconnu jusqu'ici, des souches isolées dans la nature, infectieuses, non pigmentées. Néanmoins, nos essais ne permettent pas de savoir pourquoi les Rhizobium typiques, contrairement à la souche 1-99, présentent une grande résistance aux traitements mutagènes.

Le fait que la souche 1-99, à la différence de celles utilisées dans cette étude, soit non-muqueuse, ne peut être mis en cause, puisque la souche 1-99 dérive elle-même, par mutation, d'une souche muqueuse et que dans deux essais avec des mutants non-muqueux (T20 N3 et M5 N1) nous n'avons pas obtenu de meilleurs résultats qu'avec les souches muqueuses. On ne voit d'ailleurs pas comment le mucus pourrait entraver l'action des agents mutagènes utilisés et ceci est confirmé par nos observations sur la mortalité qu'ils provoquent : la 2-aminopurine inhibe fortement la croissance, la nitrosoguanidine et les UV provoquent une forte mortalité, chez les souches muqueuses comme chez les autres.

Il n'existe pas non plus de relation apparente entre la pigmentation de la souche 1-99 et sa haute mutabilité. GILLBERG (1969b, 400) a montré au contraire que les Rhizobium pigmentés avaient une résistance accrue aux UV. Néanmoins nous n'avons fait aucun essai d'isolement de mutants à partir des souches pigmentées que nous avons obtenues).

Une différence de sensibilité aux agents de sélection (pénicilline) entre la souche 1-99 et les autres souches utilisées ne peut non plus être mise en cause, puisque tous les auxotrophes dérivés de la 1-99 ont été obtenus sans l'aide de la pénicilline.

Aucun caractère connu de la souche 1-99 et absent chez les autres souches ne semble pouvoir être mis en relation avec sa haute

mutabilité.

Nos résultats concernant l'isolement de mutants auxotrophes de Rhizobium (souche 1-99 exceptée) confirment ceux des autres auteurs (page 133) : ces mutants sont très rares, les exigences généralement partielles et la réversion fréquente.

Pour expliquer ces faits, on peut penser que les mutations vers l'auxotrophie sont létales, ou qu'il existe chez les Rhizobium un système particulièrement efficace de réparation de l'ADN.

La seconde hypothèse expliquerait que la réversion soit fréquente, mais pas qu'on puisse isoler assez facilement des mutants résistants aux antibiotiques, non muqueux, pigmentés, inefficients, non-nodulants ou à caractères sérologiques changés. Tous ces faits seraient par contre compatibles avec la première hypothèse, qui expliquerait en outre qu'on ne trouve pas de mutants exigeants, mais seulement dépendants. Il est possible que les cellules de Rhizobium soient très peu perméables aux acides aminés qui ont généralement un effet nul ou défavorable sur leur croissance. Néanmoins la toxicité de certains d'entre eux fait penser qu'une certaine perméabilité existe et les souches à croissance stimulée par les acides aminés (M5 N1) ne sont pas plus sensibles que les autres à l'action des agents mutagènes.

Il existe de toute façon chez les souches naturelles de Rhizobium une résistance à l'action mutagène de la nitrosoguanidine, de la 2-aminopurine et des UV, pour tous les gènes, y compris ceux qui mutent naturellement ou après action des phages (mucosité, pigmentation, caractères sérologiques, efficacité, infectivité). Tous les agents mutagènes utilisés dans cette étude et dans les travaux d'autres

auteurs sont des agents de substitution ou de petites délétions et il est possible que des résultats positifs puissent être obtenus avec des agents de grandes délétions. De toute façon, l'usage des UV semble à condamner, la plupart des mutants obtenus par ce moyen ayant perdu tout ou partie de leurs aptitudes symbiotiques (T20 N3 dans notre étude et mutants obtenus par JANSEN et col. (1968, 401) et KOWALSKI (1970, 402)).

Enfin, pour expliquer que les mutations, quand elles se manifestent, portent sur plusieurs caractères, on peut faire intervenir un effet pléiotropique. Un tel effet a été invoqué par DENARIE (1969, 403) pour expliquer qu'à partir de mutants adénine-dépendants et inefficients, on peut isoler des réverses adénine-indépendants, qui sont tous efficients. SCHWINGHAMER (1967, 404 ; 1970, 405) a proposé la même explication pour le même phénomène observé avec des résistants à certains antibiotiques et des thiamine-dépendants.

Néanmoins, le nombre même des mutations (résistance aux phages, aux UV, aux températures élevées, à certains antibiotiques, pigmentation, dépendance pour l'adénine, la thiamine, la riboflavine...) qui sont accompagnées de modifications des propriétés symbiotiques, semble condamner cette explication.

On peut par contre supposer que chez les Rhizobium, les mutations affectent plusieurs caractères, parce que ceux-ci sont gouvernés par des gènes liés en unités importantes. Pour échapper au système de réparation, les mutations devraient alors correspondre à des altérations en bloc d'importants fragments d'ADN, ce qui expliquerait que de nombreuses mutations soient létales.

## C O N C L U S I O N

On ne dispose actuellement que d'observations fragmentaires à propos de l'influence de mutations déterminées sur les aptitudes symbiotiques des Rhizobium.

La résistance à la néomycine (et à la viomycine, l'une entraînant l'autre) amène une perte totale d'efficacité. La résistance à la Kanamycine entraîne la résistance à la néomycine, mais n'amène pas toujours de perte d'efficacité.

La résistance à plusieurs autres antibiotiques ou antimétabolites, notamment ceux qui interfèrent avec la synthèse de la paroi ou la synthèse protéique, s'accompagne également de modifications des aptitudes symbiotiques, variables suivant les souches et les inhibiteurs utilisés. (SCHWINGHAMER, 1964,406 ; 1967,407 ; 1968,408). On ne connaît rien des propriétés symbiotiques des mutants réverses sensibles à ces inhibiteurs.

L'auxotrophie amène parfois des modifications du comportement symbiotique :

- La dépendance pour la thiamine, la riboflavine, l'adénine, l'histidine mais pas le pantothénate, entraîne la perte de l'efficacité (SCHWINGHAMER, 1969,409 ; 1970,410) (DENARIE, 1969,411).

- Tous les mutants réverses indépendants pour ces composés, retrouvent leur efficacité. Parfois l'addition au système bactérie-plante hôte du composé exigé (Adénine, thiamine, riboflavine) redonne l'efficacité à la symbiose (SCHWINGHAMER, 1967,412 ; 1970,413).

- La résistance aux phages amène également des modifications des aptitudes symbiotiques, mais pas systématiquement (KLECZKOWSKA, 1950,414). Par contre, l'acquisition d'une pigmentation entraîne toujours la perte de

l'infectivité ((ALMON et BALDWIN, 1932, 415 ; 1933, 416) (Mc CALLA, 1937, 417) (GILLBERG, 1969a, 418 ; 1969b, 419)). Selon GILLBERG (1969b, 420) elle entraîne également la résistance aux UV et aux températures élevées. La perte de la pigmentation amène le retour à l'efficacité et à la sensibilité aux UV et températures élevées. Enfin, concernant la structure des gènes de l'efficacité et de la nodulation, on sait seulement que les UV, l'acriflavine et l'acridine orange induisent la perte de l'infectivité (JANSEN et col., 1968, 421 ; HIGASHI, 1967, 422).

Ces dernières observations font penser que les déterminants génétiques des propriétés symbiotiques chez Rhizobium sont portés par un facteur "extranucléaire".

Par contre, le petit nombre de mutations étudiées ne permet pas de tirer de conclusion ni en ce qui concerne les mécanismes d'infection et de fixation d'azote, ni sur la nature des gènes qui les gouvernent.

Ceci est dû au fait qu'il est difficile d'obtenir des mutants avec les souches infectieuses de Rhizobium, tandis que les souches qui mutent facilement (1-99) ont perdu leur infectivité.

Notre but en commençant cette étude était de trouver des souches infectieuses capables de muter et présentant des caractères intéressants (non mucosité, éventuellement pigmentation et formation d'étoiles).

Il nous a été possible d'obtenir des Mu<sup>-</sup> sans que les propriétés symbiotiques ne soient altérées. Aucune des souches ne forme d'étoiles dans les conditions normales de culture, mais un moyen a été trouvé, au moins pour une souche, de provoquer cette formation. D'autre part, il a été possible avec deux souches d'obtenir des pigmentés, mais ce caractère, lié à la perte de l'infectivité, ne peut être utilisé

pour l'étude génétique des propriétés symbiotiques. Enfin, il a été impossible d'isoler des mutants à déficiences métaboliques, mais un moyen de les identifier, sous forme de galerie, a été mis au point. Des techniques d'étude des propriétés symbiotiques sont également au point pour l'étude de mutants de Rhizobium, de Trèfle, et Luzerne. Or, les deux souches qui ont fourni des mutants (Mu<sup>-</sup> et pigmentés) (T 20 S et M5 N1) proviennent respectivement de Trèfle et de Luzerne. Toutes ces considérations nous font penser que l'obtention de mutants à déficiences métaboliques à partir de ces deux souches, par d'autres moyens que ceux utilisés dans cette étude, mérite d'être entreprise.

B I B L I O G R A P H I E

- ALLEN, O. N. et ALLEN, E. K. 1936. Root nodule bacteria of some tropical leguminous plants ; I. Cross-inoculation studies with Vigna sinensis.  
Soil Sci., 42 : 61-77. 59.68.
- ALLEN, O. N. et ALLEN, O. N. 1947. A survey of nodulation among leguminous plants.  
Proc. Soil Sci. Soc. Amer., 12 : 203-208. 32.
- ALLEN, E.K. et ALLEN, O.N. 1950. Biochemical and symbiotic properties of Rhizobia.  
Bact. Rev., 14 : 273-330. 34.
- ALLEN, O. N. et BALDWIN, I. L. 1954. Rhizobia-legume relationships.  
Soil Sci., 78 : 415- 427. 36.65.66.
- ALMON, L. 1933. Concerning the reproduction of bacteroids.  
Zbl. Bakt. Parasitenk., Abt. II, 87 : 289-297. 268.
- ALMON, L. et BALDWIN, I. L. 1932. Aberrant cultures of Rhizobium.  
J. Bact., 23 : 65. 343.415.
- ALMON, L. et BALDWIN, I.L. 1933. The stability of cultures of Rhizobium.  
J. Bact., 26 : 229-250. 329.344.416.
- AMARGER, N., OBATON, M. et BLACHERE, H. 1967. Polysaccharides extra-cellulaires de Rhizobium meliloti.  
Can. J. Microbiol., 13 : 99-105. 340.
- ANDRIJENKO, V. I. 1967. Activité catalasique des Rhizobium du pois et du trèfle en relation avec leur activité fixatrice d'azote.  
Mikrobiol. Zh., Ukrajin RSR., 29 : 352-354. 231.
- AQUINO, D. I. et MADAMBA, A. L. 1940. A study of root nodule bacteria of certain leguminous plants.  
Philippine Agr., 28 : 120-132. 45.

- BAIRD, K. J. 1955. Clover root nodule bacteria in the New-England region of New South Wales.  
Austr. J. Agr. Res., 6 : 15-26. 60.
- BALASSA, R. 1953. Directed transformation of heredity in the genus Rhizobium.  
Magy. Tud. Akad. Agrartud. Oszt. Közlemén, 2 : 307-325. 279.
- BALASSA, G. 1963. Genetic transformation of Rhizobium. A review of the work of Balassa.  
Bact. Rev., 27 : 228-241. 147.282.284.286.288.290.297.360.
- BALDWIN, I. et FRED, E. 1929. Nomenclature of the root nodule bacteria of Leguminosae.  
J. Bact., 17 : 141-150. 30.
- B.B.L. (Catalogue) 1970. 5<sup>o</sup> Ed., : 163. 270.
- BEAUD, G., MANIGAULT, P. et STOLL, C. 1963. Observations sur les tumeurs végétales incomplètes.  
Phytopath. Z., 47 : 25-37. 161.
- BEIJERINCK, M. W. 1888. Die Bakterien der Papilionaceenknöllchen.  
Botan. Z., 46 : 725-738 ; 741-750 ; 757-771 ; 781-790 ; 797-804. 3.21.
- BEIJERINCK, M. W. et VAN DELDEN, A. 1902. Über die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien.  
Zbl. Bakt. Parasitenk., Abt. II, 9 : 3-43. 380.
- BERNAERTS, M. J. et DE LEY, J. 1963. A biochemical test for crown-gall bacteria.  
Nature, 197 : 406-407. 227.
- BISSET, K. A. 1952. Complete and reduced life-cycles in Rhizobium.  
J. Gen. Microbiol., 7 : 233-242. 188.349.356.358.
- BISSET, K. A. 1955. Evidence from the cytology of Azotobacter chroococcum of a relationship with Rhizobium and the Bacillaceae.  
J. Gen. Microbiol., 13 : 442-445. 191.
- BISSET, K. A. 1958. Natural relationships of nitrogen-fixing bacteria.  
Nature, 182 : 405. 189.
- BONNIER, C. 1953. Classification et spécificité d'hôte dans le genre Rhizobium.  
Proc. 6th Intern. Congr. Microbiol., 6 : 325-327. 112.

- BONNIER, C. et BROUWERS, L. 1958. Nodulation, en tubes de verre, de légumineuses à grosses graines cultivées aseptiquement.  
Bull. Inst. Agron. Stat. Rech. Gembloux, 26 : 317-321. 216.
- BOSE, P. et VENKATARAMAN, G. S. 1969. Recombination in Rhizobium leguminosarum.  
Experientia, 25 : 772-773. 386.396.
- BRAKEL, J. 1965. Un dispositif simple pour l'étude de la symbiose Rhizobium-légumineuses en conditions aseptiques.  
Biologie du sol. Bull. Int. Inform. Belge, 4 : 22-23. 205.
- BREED, R. S., MURRAY, E. G. D. et SMITH, N. R. 1957. Bergey's manual of determinative microbiology.  
The Williams and Wilkins Co., Baltimore (U.S.A.).(7<sup>e</sup> Ed.). 40.192.
- BROCKWELL, J. et HELY, F. M. 1966. Symbiotic characteristics of Rhizobium meliloti.  
Austr. J. Agr. Res., 17 : 885-889. 70.
- BURRIL, T. et HANSEN, R. 1917. Is symbiosis possible between legume bacteria and non-legume plants ?  
Illinois Agr. Exp. Sta. Bull., 202 : 115-181. 26.
- BUSHNELL, O. A. et SARLES, W. B. 1939. Investigations upon the antigenic structures among the root nodule bacteria of the soybean, cowpea and lupine cross-inoculation groups.  
J. Bact., 38 : 401-410. 94.105.
- BURTON, M. O. et LOCHHEAD, A. G. 1952. Production of vitamin B<sub>12</sub> by Rhizobium species.  
Plant Physiol., 35 : 454-462. 276.
- BUTTIN, G. 1963. Mécanismes régulateurs dans la biosynthèse des enzymes du métabolisme du galactose chez E. coli K12. II : le déterminisme génétique de la régulation.  
J. Mol; Biol., 7 : 183-205. 333.
- CHEN, H. K. 1938. Production of growth-substance by clover nodule bacteria.  
Nature, 142 : 753-754. 232.
- CLAPP, C. E. et DAVIS, R. J. 1970. Properties of extracellular polysaccharides from Rhizobium.  
Soil Biol. Biochem. (G-B), 2 : 109-117. 338.

- COLEMAN, M. F. et REID, J. J. 1945. A serological study of strains of Alcaligenes radiobacter and Phytomonas tumefaciens in the "M" and "S" phases.  
J. Bact., 49 : 187-192. 110.153.
- CONKLIN, M. E. 1936. Studies on the root nodule organism of certain wild legumes.  
Soil Sci., 41 : 167-185. 56.
- CORN, H. J., BOITCHER, E. J. et RANDALL, C. 1945. The value of bacteriophage in classifying certain soil bacteria.  
J. Bact., 49 : 359-373. 128.
- DAMERY, J. T. et ALEXANDER, M. 1969. Physiological differences between effective and ineffective strains of Rhizobium.  
Soil Sci., 108 : 209-216. 230.302.
- DE LEIZAOLA, M. et DEDONDER, R. 1955. Etude de quelques polyosides produits par des souches de Rhizobium.  
C. R. Acad. Sci. Paris, 240 : 1825-1827. 339.
- DE LEY, J. et RASSEL, A. 1965. DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus Rhizobium.  
J. Gen. Microbiol., 41 : 85-91. 83.84.104.150.193.194.197.236.251.255.
- DE LEY, J., BERNALERTS, M., RASSEL, A. et GUILLMOT, J. 1966. Approach to an improved taxonomy of the genus Agrobacterium.  
J. Gen. Microbiol., 43 : 7-17. 163.185.195.198.228.229.237.
- DENARIE, J. 1969. Une mutation provoquant l'auxotrophie pour l'adénine et la perte du pouvoir fixateur d'azote chez Rhizobium meliloti.  
C. R. Acad. Sci. Paris, 269 : 2464-2466. 369.403.411.
- DERIEUX, J. C., GUILLAUME, J., MARTIN, G., WATTEL, F. et LEFRANC, G. 1964. Procédés d'isolement de mutants muqueux à partir d'E. coli K12.  
C. R. Acad. Sci. Paris, 259 : 3663-3666. 332.
- DOROSINSKY, L. M. et LAZAREVA, N. M. 1966. En russe (La spécificité des bactéries des nodosités).  
Microb. Congr. Moscow : 290. 38.
- FEDOROV, M. D. et SVITYC, K. A. 1954. En russe (La spécificité raciale des bactéries des nodosités de lupin).  
Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 97 : 1069-1072. 35.

- FORSYTH, W. G. C., HAYWARD, A. C. et ROBERTS, J. C. 1958. Occurrence of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in aerobic Gram-negative bacteria. Nature, 182 : 800-801. 242.
- FRANK, B. 1877. Leunis, "Synopsis der drei Naturreiche". 2 Theil Botanik. 3 Abt. Kryptogamen. Section 914 : 1944. 4.
- FRANK, B. 1889. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. Ber. Dtsch. Bot. Ges., 7 : 332-346. 6.22.
- FRED, E. B. et DAVENPORT, A. 1918. Influence of reaction on nitrogen assimilating bacteria. J. Agr. Res., 14 : 317-336. 89.97.
- FRED, E. B., BALDWIN, L. et Mc COY, E. 1932, 1938. Root nodule bacteria and leguminous plants. Univ. Wisconsin Stud. Madison, U.S.A. 31.39.41.
- FRIESEN, J. D., MAALØE, O. 1965. On the control of deoxyribonucleic acid synthesis by amino acids in E. coli. B. B. A., 95 : 436-445. 376.
- GABOR, M. 1965. Transformation of Streptomycin markers in rough strains of Rhizobium lupini. The relation between the determinant of Streptomycin dependance and those of Streptomycin resistance and sensitiveness. Genetics, 52 : 905-913. 285.
- GARDOSKY, A. J. et GIAMBIAGI, N. 1963. Thermorésistance chez les Azotobacteraceae. Ann. Inst. Pasteur, 105 : 202-211. 190.
- GEORGI, C. E. et BEGUIN, A. E. 1939. Heteroauxin production by efficient and inefficient strains of Rhizobium. Nature, 143 : 25. 233.
- GEORGI, C. E. et BEITINGER, J. M. 1941. Utilization of carbohydrates and sugar acids by the Rhizobia. J. Bact., 41 : 323-340. 87.
- GERRETSEN, P. C., GRYS, A., SACK, J. et SOHNGEN, N. L. 1923. Das Vorkommen eines Bakteriophagen in den Wurzelknöllchen der Leguminosen. Zbl. Bakt. Parasitenk., 60 : 311-316. 118.

- GILLBERG, B. O. 1968. Heat resistance in Rhizobia.  
Arch. Mikrobiol., 62 : 328-335. 350.
- GILLBERG, B. O. 1969 a. Heat resistance and pigmented variants of Rhizobium.  
Nature, 222 : 574. 351.357.418.
- GILLBERG, B. O. 1969 b. Pigmented variants of Rhizobium. Isolation,  
genetical constitution, heat and UV resistance.  
Arch. Mikrobiol., 69 : 260-265. 352.354.359.400.419.420.
- GONNERMAN, W. 1894. Die Bakterien in den Wurzelknöllchen der Leguminosen.  
Landw. Jahrbücher, 23 : 648-671. 10.
- GOSTKOWSKA, K. 1966. Some physiological properties of Rhizobium.  
In SPRZELCOWA, A. 1968. 88.138.267.
- GRAHAM, P. H. 1961.  
In "Rhizobium Newsletters", 6 : 10-11. 143.
- GRAHAM, P. H. 1963 a. Vitamin requirements of root nodule bacteria.  
J. Gen. Microbiol., 30 : 245-248. 136.
- GRAHAM, P. H. 1963 b. Antibiotic sensitivities of the root nodule bacteria.  
Austr. J. Biol. Sci., 16 : 557-559. 130.168.
- GRAHAM, P. H. 1963 c. A study of the application of serodiagnostic and  
computative methods to the taxonomy of the root nodule bacteria of  
legumes.  
Ph. D. Thesis. Univ. of Western Australia. 54.108.113.
- GRAHAM, P. H. 1964. The application of computer techniques to the taxo-  
nomy of the root nodule bacteria of legumes.  
J. Gen. Microbiol., 35 : 511-517. 14.144.171.199.200.252.257.
- GRAHAM, P. H. 1965. Extracellular polysaccharides of the genus Rhizobium.  
Antonie v. Leeuwenhoek, 31 : 349-354. 170.341.
- GRAHAM, P. H. 1969. Selective medium for growth of Rhizobium.  
Appl. Microbiol., 17 : 769-770. 239.266.
- GRAHAM, P. H., PARKER, C. A., OAKLEY, A. E., LANGE, R. T. et SANDERSON, J. W.  
1963. Spore formation and heat resistance in Rhizobium.  
J. Bact., 86 : 1353-1354. 353.355.

- GREGORY, K. F. et ALLEN, O. N. 1953. Physiological variation and host plant specificities of Rhizobium isolated from Caragana arboroscens L. Can. J. Botany, 31 : 730-738. 58.
- GUILLAUME, J., DERIEUX, J. C., JAKSEVAC, J. R., DESCHAMPS, F. et MARTIN, G. 1965. Obtention de mutants muqueux d'E. coli par culture sous forme de sphéroplastes. Ann. Inst. Pasteur Lille, 16 : 59-66. 334.
- GUPTA, B. M. et KLECZKOWSKA, J. 1962. A study of some mutations in a strain of Rhizobium trifolii. J. Gen. Microbiol., 27 : 473-476. 287.289.294.361.
- HAIN, N. J. 1966. The Congo Red reaction and its usefulness in the identification of Rhizobium. Can. J. Microbiol., 12 : 725-733. 225. 240. 245.
- HAMDI, Y. A. 1968. Effect of the interrupted adaptation to D-methionine on the efficiency of Rhizobium meliloti strains. Arch. Mikrobiol., 63 : 227-231. 317.
- HAMDI, Y. A. 1969 a. Application of the oxydation-reduction potential indicators for characterization of Agrobacterium and Rhizobium species. Folia Microbiol. Tchec., 14 : 92-93. 224.
- HAMDI, Y. A. 1969 b. Effect of D-, L- and DL-methionine on growth and efficiency of Rhizobium meliloti strains. Plant Soil, 31 : 11-121. 307.314.318.322.
- HANSEN, F. 1919. Note on the flagellation of the nodule organism of the Leguminosae. Science, 50 : 568-569. 78.
- HARRISON, A. P. (Jr) 1965. Thymine incorporation and metabolism by various classes of thymine-less bacteria. J. Gen. Microbiol., 41 : 321-334. 375.
- HARTLEB, R. 1900. Die Morphologie und systematische Stellung der sogenannten Knöllchenbakterien. Chem. Ztg., 24 : 887-888. 166.
- HEBERLEIN, G. T., DE LEY, J. et TIJTGAT, R. 1967. Desoxyribonucleic acid homology and taxonomy of Agrobacterium, Rhizobium and Chromobacterium. J. Bact., 24 : 116-124. 151.164.184.186.202.238.254.256.326.

- HENDRY, G. S., JORDAN, D. C. 1969. Ineffectiveness of viomycin-resistant mutants of Rhizobium meliloti.  
Can. J. Microbiol., 15 : 671-676. 300.
- HEUMANN, W. 1960. Versuche zur Rekombination sternbildender Bakterien.  
Naturwiss., 14 : 330-331. 280. 385.
- HEUMANN, W. 1962. Das genetische Verhalten sterbildender Bakterien.  
Naturwiss., 49 : 430-431. 373.
- HEUMANN, W. 1968. Conjugation in starforming Rhizobium lupini.  
Mol. Gen. Genetics, 102 : 132-144. 275.348.355.372.379.391.397.
- HIGASHI, S. 1967. Transfer of clover infectivity of Rhizobium trifolii to Rhizobium phaseoli as mediated by an episomic factor.  
J. Gen. Microbiol., 13 : 391-403. 422.
- HILFNER, L. et STÖRMER, K. 1903. Neue Untersuchungen über die Wurzelknöllchen der Leguminosen und deren Erreger.  
Arb. K. Gesundheits, Biol. Abt., 3 : 151-307. 18.
- HITCHNER, E. R. 1930. The isolation of a bacteriolytic principle from the root nodules of red clover.  
J. Bact., 19 : 191-201. 119.
- HOFER, A. W. 1941. A characterization of Bacterium radiobacter (Beijerinck and Van Delden) Löbner.  
J. Bact., 41 : 193-224. 109.226.
- HOLDING, A. J., TILG, S. N. et ALLEN, O. N. 1960. Modified plant responses induced by Rhizobia cultivated on amino acid media.  
7th Intern. Congr. Soil Sci. Trans. III, 2 : 608-616. 308.320.
- HUBBEL, D. H. et ELKAN, G. M. 1967. Correlation of physiological characteristics with nodulating ability in Rhizobium japonicum.  
Can. J. Microbiol., 13 : 235-245. 73.
- HUGH, R. et LEIPSON, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxydative metabolism of carbohydrate by various Gram-negative bacteria.  
J. Bact., 66 : 24-26. 244.

- HUMPHREY, B. A. et VINCENT, J. M. 1959. Extracellular polysaccharides of Rhizobium.  
J. Gen. Microbiol., 21 : 477-484. 169.342.
- IMSENDOCKI, A. A., PARIJSKAYA, A. N. et LOPEZ, C. E. 1970. Experimental production of Rhizobium meliloti mutants with modified activity. Mikrobiologiya, 39 : 348-351. 301.363.
- ISHIZAWA, S. 1953 a. Studies on the root nodule bacteria of leguminous plants. I : Characters in artificial media. Part I : Morphology. J. Sci. Soil, Tokyo, 23 : 125 et seq. 140.
- ISHIZAWA, S. 1953 b. Studies on the root nodule bacteria of leguminous plants. I : Characters in artificial media. Part 3f : Carbon source (growth and fermentation). J. Sci. Soil, Tokyo, 23 : 163 et seq. 141.
- ISHIZAWA, S. 1953 c. Studies on the root nodule bacteria of leguminous plants. Part 4 : The effect of pH on the growth of Rhizobia. J. Sci. Soil, Tokyo, 23 : 169 et seq. 142.
- ISRAILSKY, W. P. 1929. Vergleichende Untersuchungen über die Rassen-eigentümlichkeiten des B. tumefaciens und verwandter Mikroorganismen. Zbl. Bakt. Parasitenk. Abt. II, 79 : 354-370. 29.120.
- ISRAILSKY, W. P. et STARYGIN, L. 1930. Die Dissoziation bei einigen Bakterienarten. Zbl. Bakt. Parasitenk. Abt. II, 81 : 1-7. 278.327.
- JANSEN VAN RENSBURG, H., STRIJDOM, B. W. et RABIE, C. J. 1968. Nature of the genetic determinant of infectiveness in strains of Rhizobium japonicum. S. Afr. T. Landbouwet, 11 : 623-625. 401.421.
- JENSEN, H. L. 1942. The occurrence of variant types in root nodule bacteria of leguminous plants. Austr. J. Sci., 5 : 69-70. 328.336.
- JORDAN, D. C. 1952. Studies on the legume root nodule bacteria. II : The production and behaviour of colonial mutants produced by X-ray irradiation. Can. J. Botany, 30 : 125-130. 362.

- KERN, H. 1964. DNA-mediated transfer of the ability for tumor-induction from strains of Agrobacterium tumefaciens to Rhizobium spp.  
10th Intern. Botan. Congress, : 397-398. 176.
- KERN, H. 1965 a. Untersuchungen zur genetischen Transformation zwischen Agrobacterium tumefaciens und Rhizobium spp. I : Übertragung der Fähigkeit zur Induktion pflanzlicher Tumoren auf Rhizobium spp.  
Arch. Mikrobiol., 51 : 140-155. 177.
- KERN, H. 1965 b. Untersuchungen zur genetische Transformation zwischen Agrobacterium tumefaciens und Rhizobium spp. II : Vergleichende morphologische, physiologische und biochemische Untersuchungen an den Partner einer Transformation.  
Arch. Mikrobiol., 52 : 206-223. 178.248.
- KERN, H. 1968. Beiträge zur Taxonomie der Rhizobiaceae.  
Arch. Mikrobiol., 63 : 278-291. 165.
- KERN, H. 1969. Interspezifische Transformationen zwischen Agrobacterium tumefaciens und Rhizobium leguminosarum.  
Arch. Mikrobiol., 66 : 63-68. 179.180.
- KIRCHNER, O. 1895. Die Wurzelknöllchen der Sojabohnen.  
Beitr. Biol. Pflanzenernährung, 7 : 213-224. 11.17.
- KLECZKOWSKA, J. 1945. A quantitative study of the interaction of bacteriophage with Rhizobium using the technique of poured plates.  
J. Bact., 50 : 81-94. 122.
- KLECZKOWSKA, J. 1950. A study of phage-resistant mutants of Rhizobium trifolii.  
J. Gen. Microbiol., 4 : 298-310. 330.337.414.
- KLECZKOWSKA, J. 1957. A study of the distribution and the effects of bacteriophage of root nodule bacteria in the soil.  
Can. J. Microbiol., 3 : 171-180. 117.123.
- KLECZKOWSKA, J., NUTMAN, P. S. et BOND, G. 1944. Note on the ability of certain strains of Rhizobium from peas and clover to infect each other's host plants.  
J. Bact., 48 : 673-675. 53.

- KLECZKOWSKA, J., NUTMAN, P. S., SKINLER, F. A. et VINCENT, J. M. 1968. The identification and classification of Rhizobium. Identification Methods for Bacteriologist, Academic Press, London, B, 51-65. 250.
- KLECZKOWSKI, A. et THORNTON, H. G. 1944. A serological study of root nodule bacteria from pea and clover cross-inoculation groups. J. Bact., 48 : 661-672. 52.106.116.
- KLEIN, D. T. et KLEIN, R. M. 1953. Transmittance of tumor-inducing ability to avirulent crown-gall and related bacteria. J. Bact., 66 : 220-228. 158.174.
- KLEIN, D. T. et KLEIN, R. M. 1956. Quantitative aspects of transformation of virulence in Agrobacterium tumefaciens. J. Bact., 72 : 308-313. 159.
- KLEIN, D. T. et LINK, G. K. K. 1955. The etiology of crown-gall. Quart. Rev. Biol., 30 : 207-277. 160.
- KLEINHAUF, H. 1966. Carotine und Carotinoïdsynthese in Rhizobium lupini Mutanten. Arch. Mikrobiol., 53 : 154-158. 347.371.
- KNÖSEL, D. 1962. Prüfung von Bakterien auf Fähigkeit zur Sternbildung. Zbl. Bakt. Parasitenk. Abt. II, 116 : 79-100. 392.
- KOBUS, J. 1952. Some morphological and physiological properties of Rhizobium. Acta Microbiol. Polon., 1 : 137-150. 132.
- KOWALSKI, M. 1966. Transduction in Rhizobium meliloti. Microbiol. Gen. Bull. U.S.A., 25 : 9-10. 281.
- KOWALSKI, M. 1970. Genetic analysis by transduction of Rhizobium meliloti mutants with changed symbiotic activity. Acta Microbiol. Polon., A, 2 : 115-122. 370.402.
- KOWALSKI, M. et STANIEWSKI, R. 1959. Preliminary investigations on the susceptibility of different strains of Rhizobium to phages. Acta Microbiol. Polon., 8 : 253. 126.

- KOWALSKI, H., STANIENSKI, R. et HALABIS, Z. 1963. The influence of chemical agents on Rhizobium bacteriophages.  
Acta Microbiol. Polon., 12 : 175-179. 127.
- KRASSILNIKOV, N. A. 1949, 1959. Diagnostik der Bakterien und Actinomycoeten.  
Iena, Fisch. 33.85.
- LAIRD, D. J. 1932. Bacteriophage and the root nodule bacteria.  
Arch. Mikrobiol., 3 : 159-193. 121.260.
- LANGE, R. T. 1961. Nodule bacteria associated with the indigenous Leguminosae of South-Western Australia.  
J. Gen. Microbiol., 26 : 351-359. 55.95.
- LANGE, R. T. 1966. Bacterial symbiosis with plants.  
In Symbiosis, 1 : 99-170. (Academic Press, New-York.) 37.
- LANGE, R. T. et ALEXANDER, M. 1961. Anomalous infection by Rhizobium.  
Can. J. Microbiol., 7 : 959-961. 148.
- LEDERBERG, J. 1950. Isolation and characterization of biochemical mutants of bacteria.  
Meth. Med. Res., 3 : 5-22. 274.378.
- LEHNER, A. et NOWAK, W. 1957. Morphological studies on nodule bacteria cultures (Rhizobium spp.).  
Can. J. Microbiol., 3 : 399-410. 390.
- LEIFSON, E. et ERDMAN, L. W. 1958. Flagellar characteristics of Rhizobium species.  
Antonie v. Leeuwenhoek, 29 : 97-110. 82.103.
- LEONARD, R. T. 1923. Nodule production kinship between the soybean and the cow-pea.  
Soil Sci., 15 : 277-283. 62.67.
- LIESKE, R. 1928. Untersuchungen über die Krebskrankheit bei Pflanzen, Tieren und Menschen.  
Zbl. Bakt. Parasitenk. Abt. I, 108 : 118-146. 383.
- LOCHHEAD, A. G. et BURTON, M. O. 1957. Qualitative studies of soil microorganisms. XIV : specific vitamin requirements of the predominant bacterial flora.  
Can. J. Microbiol., 3 : 35-42. 241.273.

- LÖHNIS, F. 1905. Beiträge zur Kenntnis der Stickstoffbakterien.  
Zbl. Bakt. Parasitenk. Abt. II, 14 : 582-604 ; 713-723. 381.
- LÖNNIS, F. et HANSEN, R. 1921. Nodule bacteria and leguminous plants.  
J. Agr. Res., 20 : 543-556. 20.76.79.98.382.
- LONERAGAN, J. F. et DOWLING, E. J. 1958. The interaction of calcium and hydrogen ions in the nodulation of subterranean clover.  
Austr. J. Agr. Res., 9 : 464-472. 221.264.
- LONGLEY, B. J., BERGE, T. O., VAN LANEN, J. M. et BALDWIN, I. L. 1937. Changes in the infective ability of Rhizobium and Phytomonas tumefaciens induced by culturing on media containing glycine.  
J. Bact., 33 : 29-30. 271.303.309.311.
- LORKIEWICZ, Z., ZELAZNA, I., PRZYBOJEWSKA, B. 1965. Alkaline phosphatase activity of Rhizobium trifolii mutants.  
Acta Microbiol. Polon., 14 : 225-230. 293.
- LOWTHER, W. L. et LONERAGAN, J. F. 1968. Calcium and nodulation in subterranean clover (Trifolium subterraneum L.).  
Plant Physiol., 43 : 1362-1366. 222.265.
- Mc CALLA, T. M. 1937. Behaviour of legume bacteria (Rhizobium) in relation to exchangeable calcium and hydrogen ion concentration of the colloidal fraction of the soil.  
Missouri Agr. Expt. Sta., Res. Bull., 256 : 2-44. 220.263.345.417.
- Mc GREGOR, A. N. et ALEXANDER, M. 1971. Formation of tumor-like structures on legume roots by Rhizobium.  
J. Bact., 105 : 728-732. 173.
- MANIL, P. 1960. Essais de "transformation" de souches de Rhizobium par l'ADN extrait de Agrobacterium tumefaciens.  
Bull. Inst. Agron. Stns. Rech. Gembloux, 28 : 272 175.181.
- MANIL, P. et BONNIER, C. 1950. Fixation symbiotique d'azote chez la luzerne (Medicago sativa L.).  
Bull. Inst. Agron. Gembloux, 18 : 89-126. 111.

- 't MANNENJE, L. 1967. A re-examination of the taxonomy of the genus Rhizobium and related genera using numerical analysis.  
Antonie v. Leeuwenhoek, 33 : 477-491. 145.
- MANNINGER, E. 1962. Biochemical examination of Rhizobium strains.  
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hungary, 9 : 219-225. 234.246.
- MARSHALL, K. C. et VINCENT, J. M. 1954. Relation between the somatic antigens of Rhizobium trifolii and susceptibility to bacteriophage.  
Austr. J. Sci., 17 : 68-69. 114.
- MARUYAMA, Y. et YANAGITA, T. 1956. Physical methods for obtaining synchronous culture of E. coli.  
J. Bact., 71 : 542-546. 335.
- MAYER, F. 1969. Die Fimbrien von Rhizobium lupini 1/50 Sta<sup>m</sup>.  
Arch. Mikrobiol., 68 : 179-186. 399.
- MAZE, M. 1898. Les microbes des nodosités des légumineuses.  
Ann. Inst. Pasteur, 12 : 1-25 ; 128-155. 91.
- MOFFLER, M. L. et COLWELL, R. L. 1968. Adansonian analysis of the Rhizobiaceae.  
J. Gen. Microbiol., 51 : 245-266. 15.146.172.187.196.201.253.258.
- MOORE, C. T. 1905. Soil inoculation for legumes with reports upon the successful use of artificial cultures by practical farmers.  
Bull. U.S. Bur. Plant Dept. Agr. Industr., 71 : 1-72. 8.25.
- MULLER, A. et STAPP, C. 1925. Beiträge zur Biologie der Leguminosenknöllchenbakterien mit besonderer Berücksichtigung ihrer Artverschiedenheit.  
Arb. Biol. Reichsanst. Landw. Forstwesen, 44 : 455-554. 27.81.100.
- MUNNS, D. N. 1968 a. Nodulation of Medicago sativa in solution culture. II : Compensating effects of nitrate and of prior nodulation.  
Plant Soil, 28 : 246-257. 209.
- MUNNS, D. N. 1968 b. Nodulation of Medicago sativa in solution culture. III : Effects of nitrate on root hairs and infection.  
Plant Soil, 29 : 33-47. 210.
- MUNNS, D. N. 1968 c. Nodulation of Medicago sativa in solution culture. IV : Effects of indole-3-acetate in relation of acidity and nitrate.  
Plant Soil, 29 : 257-262. 211.

- NAUNDORF, G. et NILSSON, R. 1943. Über formbildende Wirkstoffe bei Azotobacter chroococcum und der Einfluss dieser formativen Wirkstoffe auf die Bildung von Gigasformen bei Bacterium radicumicola.  
Naturwiss., 21 : 346. 269.
- NEAL, O. R. et WALKER, R. H. 1935. Physiological studies of Rhizobium. Utilization of carbonaceous materials.  
J. Bact. 30 : 173-187. 137.
- NICOL, H. et THORNTON, H. G. 1941. Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host.  
Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, 130858 : 32-59. 203.
- NORRIS, D. O. 1956. Legumes and the Rhizobium symbiosis.  
Empire J. Exp. Agr., 24 : 247-270. 42.61.64.90.
- NORRIS, D. O. 1958 a. Rhizobium needs Magnesium, not Calcium.  
Nature, 182 : 734-735. 261.
- NORRIS, D. O. 1958 b. A red strain of Rhizobium from Lotononis bainesii Baker.  
Austr. J. Agr. Res., 9 : 629-632. 346.
- NORRIS, D. O. 1965. Acid production by Rhizobium (a unifying concept).  
Plant Soil, 22 : 143-166. 86.92.247.
- NOWAK, N. 1956. Beobachtungen zur Sternbildung bei Knöllchenbakterien verschiedener Herkunft (Rhizobium spp.).  
Naturwiss., 43 : 22-23. 331.387.389.
- NUTMAN, P. S. 1946. Genetical factors concerned in the symbiosis of clover and nodule bacteria.  
Nature, 157 : 463-465. 208.
- NUTMAN, P. S. 1969. Genetics of symbiosis and nitrogen fixation in legumes.  
Proc. Roy. Soc. Ser. B, 172 : 417-437. 74.
- OKADA, T., HOMMA, J. et SONOHARA, H. 1962. Improved method for obtaining thymine-less mutants of E. coli and Salmonella typhimurium.  
J. Bact., 84 : 602. 374.
- ORLA-JENSEN, S. 1909. Die Hauptlinien des natürlichen Bakteriensystems.  
Zbl. Bakt. Parasitenk. Abt. II, 22 : 305-346. 9.19.

- PILLET, P. E. 1957. Dosage photocolorimétrique de l'AlA. Application à l'étude des auxines-oxydases.  
Rev. Gen. Bot. Fr., 64 : 106-112. 223.
- PRAZMOWSKI, A. 1890. Über die Wurzelknöllchen der Leguminosen.  
Botan. Zbl., 39 : 161-179. 7.23.
- PRIERAM, E. 1933. Klassifikation der Schizomyceten.  
Franz Deuticke, Leipzig, : 143. 167.
- QUADLING, C. 1960. Preservation of Xanthomonas by freezing in glycerol broth.  
Can. J. Microbiol., 6 : 475-478. 259.
- RADULOVIC, V. 1966. Rezultati proucavanja kvrzičnih bakterija nekih Leguminoza.  
Radovi Poljop. fakulteta, Sarajevo, 15 : 105-152. 1.2.
- RAGGIO, M. et RAGGIO, N. 1962. Root nodules.  
Ann. Rev. Plant Physiol., 13 : 109-128. 204.
- RAINA, J. L. et MODI, U. V. 1969. Genetic transformation in Rhizobium.  
J. Gen. Microbiol., 57 : 125-130. 368.
- RIGAUD, J. 1965. Contribution à l'étude d'un milieu synthétique pour Rhizobium.  
Ann. Inst. Pasteur, suppl. n° 3, 273-279. 277.
- RIKER, A.J., BANFIELD, W. M., WRIGHT, W. H., KEITT, G. W. et SAGEN, H. E. 1930. Studies on infectious hairy root of nursery apple trees.  
J. Agr. Res., 41 : 507-540. 154.
- RIKER, A. J., SPOERL, E. et GUTSCHE, A. E. 1946. Some comparisons of bacterial plant galls and of their causal agents.  
Botan. Rev., 12 : 57-82. 155.
- ROPONEN, I., VALLE, E. et EPTALA, T. 1970. Effect of temperature of the culture medium on growth and nitrogen fixation of inoculated legumes and Rhizobia.  
Physiologia Plantarum, 23 : 1198-1205. 219.

- ROSLYCKY, E. B., ALLEN, O. N. et Mc COY, E. 1962. Phages from Agrobacterium radiobacter with reference to host range.  
Can. J. Microbiol., 8 : 71-78. 124.156.
- ROSLYCKY, E. B., ALLEN, O. N. et Mc COY, E. 1963. Serological properties of phages of Agrobacterium radiobacter.  
Can. J. Microbiol., 9 : 709-717. 157.
- SCHNEIDER, A. 1892. Observations on some american Rhizobia.  
Bull. Torr. Bot. Club, 19 : 203-218. 24.
- SCHRÖTER, J. 1886.  
In COHN, 1889, Kryptogamen Flora von Schlesien.  
Pilze, : 131-256. 5.16.
- SHUNK, T. V. 1921. Notes on the flagellation of the nodule bacteria of Leguminosae.  
J. Bact., 6 : 239. 80.99.
- SCHWINGHAMER, E. A. 1960. Studies on induced variation in the Rhizobium.  
I : Defined media and nodulation test techniques.  
Appl. Microbiol., 8 : 349-352. 217.272.364.
- SCHWINGHAMER, E. A. 1962. Studies on induced variation in the Rhizobium.  
III : Host range modification of Rhizobium trifolii by spontaneous and radiation induced mutation.  
Ann. J. Botany, 49 : 269-277. 71.313.
- SCHWINGHAMER, E. A. 1964. Association between antibiotic resistance and effectiveness in mutant strains of Rhizobium spp.  
Can. J. Microbiol., 10 : 221-233. 283.291.295.298.406.
- SCHWINGHAMER, E. A. 1965. Host-controlled modification of Rhizobium bacteriophages.  
Austr. J. Biol. Sci., 18 : 333-343. 125.
- SCHWINGHAMER, E. A. 1967. Effectiveness of Rhizobium as modified by mutation resistance to antibiotics.  
Antonie v. Leeuwenhoek, 33 : 121-136. 292.296.299.404.407.412.
- SCHWINGHAMER, E. A. 1968. Loss of effectiveness and infectivity in mutants of Rhizobium resistant to metabolic inhibitors.  
Can. J. Microbiol., 14 : 355-367. 312.366.408.

- SCHWINGHAMER, E. A. 1969. Mutation to auxotrophy and prototrophy as related to symbiotic effectiveness in Rhizobium leguminosarum and Rhizobium trifolii.  
Can. J. Microbiol., 15 : 611-622. 207.319.324.409.
- SCHWINGHAMER, E. A. 1970. Requirement for riboflavin for effective symbiosis on clover by an auxotrophic mutant strain of Rhizobium trifolii.  
Austr. J. Biol. Sci., 23 : 1187-1196. 72.325.367.405.410.413.
- SCHWINGHAMER, E. A. et DALKAS, R. L. 1961. Studies on induced variation in the Rhizobia. II : Radiation sensitivity and induction of antibiotic resistance markers.  
Appl. Microbiol., 9 : 410-414. 365.
- SEARS, O. H. et CLARK, F. M. 1930. Non reciprocal cross-inoculation of legume nodule bacteria.  
Soil Sci., 30 : 237-242. 44.
- SEN, M., PAL, T. K. et SEN, S. P. 1969. Intergeneric transformation between Rhizobium and Azotobacter.  
Antonie v. Leeuwenhoek, 35 : 533-540. 249.
- SMITH, K. N. 1958. 139.  
In : Nutrition of the Legumes, (Hallsworth, E. G., Ed.) London, 1958.
- SMITH, J. T. 1967. Production of thymine less mutants in Gram-negative bacteria (Aerobacter, Proteus).  
J. Gen. Microbiol., 47 : 131-137. 377.
- SNEATH, P. H. A. 1957. The application of computers to taxonomy.  
J. Gen. Microbiol., 17 : 201-206. 182.
- SNEATH, P. H. A. 1960. A study of the bacterial genus Chromobacterium.  
Iowa State J. Sci., 34 : 243-500. 183.
- STANIEWSKI, R. 1970. Typing of Rhizobium by phages.  
Can. J. Microbiol., 16 : 1003-1009. 129.235.
- STAPP, C. 1927. Der bakterielle Pflanzenkrebs und seine Beziehungen zum tierschen und menlichen Krebs.  
Ber. Deut. Botan. Ges., 45 : 480-504. 152.
- STAPP, C. 1958. Pflanzenpathogene Bakterien.  
Berlin, Parey, P., Ed. 162.

- STAPP, C. et BORTELS, H. 1931. Der Pflanzenkrebs und sein Erreger, Pseudomonas tumefaciens. II Mitteilung : Über den Lebenskreislauf von Pseudomonas tumefaciens.  
Zbl. Bakt. Parasitenk., 4 : 101-125. 384.388.398.
- STAPP, C. et KNOSEL, D. 1954. Zur Genetik sternbildender Bakterien.  
Zbl. Bakt. Parasitenk., Abt. II, 108 : 243-259. 393.
- STAPP, C. et KNOSEL, D. 1956 a. Phasenoptisch-cytologische Untersuchungen sternbildender Bakterien.  
Zbl. Bakt. Parasitenk. Abt. II, 109 : 25-41. 394.
- STAPP, C. et KNOSEL, D. 1956 b. Fortgeführte Untersuchungen über den Entwicklungscyclus und die Karyologie sternbildender Bakterien.  
Zbl. Bakt. Parasitenk. Abt. II, 109 : 416-428. 395.
- STRIJDOM, B. W. et ALLEN, O. N. 1966. Medium supplementation with L- and D-amino-acids relative to growth and efficiency of Rhizobium meliloti.  
Can. J. Microbiol., 12 : 275-283. 304.306.309.315.321.
- STRIJDOM, B. W. et ALLEN, O. N. 1969. Properties of strains of Rhizobium trifolii after cultivation on media supplemented with amino-acids.  
Phytophylactica, S. Afr., 1 : 147-151. 305,310.316.
- STRZELCOWA, A. 1968. The use of the technique of Van Schreven for the taxonomy of Rhizobium strains .  
Acta Microbiol. Polon., 17 : 263-267. 131.
- STRZELCOWA, A. 1970. The effect of urea on spheroplast formation in Rhizobium.  
Acta Microbiol. Polon., B, 2 : 23-24. 323.
- TANNER, J. W. et ANDERSON, I. C. 1963. An external effect of inorganic nitrogen on root nodulation.  
Nature, 198 : 303-304. 212.214.
- TESIC, Z. et TODOROVIC, M. 1963. Jedan predlog za klasifikaciju kvržičnih bakterija. 12.13.  
Agrohemijska, Bgd., 5 : 297-298. Zemjiste i biljka, Bgd., 12 : 279-285.
- THORNTON, H. G. 1936. The action of sodium nitrate upon the infection of lucerne root-hairs by nodule bacteria.  
Proc. Roy. Soc. Ser. B, 119 : 474-492. 218.

- THORNTON, H. G. et NICOL, H. 1936. Reduction of nodule numbers and growth produced by the addition of sodium nitrate to lucerne in sand culture. *J. Agr. Sci.*, 26 : 173-188. 215.
- TONHAZY, N. E. et PELCZAR, M. J. Jr. 1954. An external effect of inorganic nitrogen in root nodulation. *Science*, 120 : 141-142. 213.243.
- VAN SCHRELVEN, D. A. 1959. Effect of added sugars and nitrogen on nodulation of the legumes. *Plant Soil*, 2 : 93-112. 206.
- VINCENT, J. M. 1954. 79th Annual general meeting, 31st March. *Proc. Linn. Soc. NSW.*, 79 : 1-32. 69.
- VINCENT, J. M. 1962 a. Australian studies of the root nodule bacteria (A review). *Proc. Linn. Soc. NSW.*, 87 : 8-38. 107.115.
- VINCENT, J. M. 1962 b. Influence of Ca and Mg on the growth of *Rhizobia*. *J. Gen. Microbiol.*, 28 : 653-663. 262.
- WAGENBREITH, D. 1965. Zur Transformierbarkeit der Knöllchenbakterien. *Arch. Mikrobiol.*, 52 : 154-168. 149.
- WALKER, R. H. 1928. Physiological studies on the nitrogen fixing bacteria of the genus *Rhizobium*. *Iowa Agr. Expt. Sta., Res. Bull.*, : 113. 28.
- WALKER, R. H., ANDERSON, D. A. et BROWN, P. E. 1932. The comparative growth rates of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium japonicum*. II : Quantitative studies. *Zbl. Bakt. Parasitenk. Abt. II*, 87 : 27-44. 77.
- WALKER, R. H. et BROWN, P. E. 1935. The nomenclature of the cowpea group of root nodule bacteria. *Soil Sci.*, 39 : 221. 93.
- WEST, P. M. et WILSON, P. W. 1939 a. Growth factor requirements of the root nodule bacteria. *J. Bact.*, 37 : 161. 133.

- WEST, P. M. et WILSON, P. W. 1939 b. Effect of biotin concentrates on growth of Rhizobium and related species.  
J. Bact., 38 : 110. 134.
- WEST, P. M. et WILSON, P. W. 1940. Biotin as a growth stimulant for the root nodule bacteria.  
Enzymologia, 8 : 152-162. 135.
- WILSON, J. K. 1917. Physiological studies of the Bacillus radicicola of the soybean and of the factors influencing nodule production.  
Bull. Cornell Univ. Agric. Exp. Stn., 386 : 369. 96.
- WILSON, J. K. 1939 a. Leguminous plants and their associated organisms.  
N.Y. (Cornell) Agric. Exp. Stn. Mem., 221 : 1-48. 46.47.
- WILSON, J. K. 1939 b. Symbiotic promiscuity in the Leguminosae.  
Trans. 3d Intern. Soc. Soil Sci., A : 49-63. 48.101.
- WILSON, J. K. 1939 c. Symbiotic promiscuity of two species of Crotalaria.  
J. Am. Soc. Agron., 31 : 934-939. 63.49.
- WILSON, J. K. 1939 d. A relationship between pollination and nodulation of the Leguminosae.  
J. Am. Soc. Agron., 31 : 159-170. 50.
- WILSON, J. K. 1944. Over five hundred reasons for abandoning the cross-inoculation groups of the legumes.  
Soil Sci., 58 : 61-65. 43.51.57.75.102.

