Acta Bot. Neerl. 23(3) June 1974 p. 257–303.

LA FORMATION DES NODULES FIXATEURS D'AZOTE CHEZ ALNUS GLUTINOSA (L.) VILL.

A. F. ANGULO CARMONA

Botanisch Laboratorium, Rijksuniversiteit, Leiden

SUMMARY

In the present study a verification is undertaken of the research published so far on the formation of root nodules in alder plants (*Alnus glutinosa* (L.) Vill.) as a result of a symbiosis between the host plant and an endophyte, probably an actinomycete. After a brief discussion of the growth of the endophyte within the cortex of the host root and of the morphogenesis of root nodules, the hypothesis to the effect that a root nodule is a modified lateral root was tested. This possibility had to be rejected and the conclusion was drawn that root nodules appear adventitiously in-between the normal points of lateral root production. As, from an anatomical point of view, a nodule shows a great deal of resemblance to a lateral root, the hypothesis was formulated that root nodules are adventitious lateral roots – induced by an endophyte – which develop into nodules following the penetration of their cortex by the endophyte. In order to imitate and study the reactions in the host plant set in motion by the endophyte, phytohormones were administered to whole plants as well as to explants of roots. Use was made of kinetin and the following auxins: indole-3-acetic acid (IAA), indole-butyric acid (IBA), naphtalene-acetic acid (NAA), and 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid (2,4-D). The auxins and the mixture of 2,4-D and kinetin produced an induction of primordia; by means of IBA, moreover, a slight increase in the number of nodules in the inoculation experiments was obtained. Finally, some experiments with tetrazolium salts were undertaken in order to ascertain whether the reducing conditions which are essential for the reduction of atmospheric nitrogen are already present in young nodules. Seventeen days after the inoculation a reduction of tetrazolium could be observed on the vesicles.

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'aulne glutineux (*Alnus glutinosa* (L.) Vill.) porte sur ses racines des nodules contenant un microorganisme (fort probablement un actinomycète) qui, en symbiose avec la plante, a le pouvoir de fixer l'azote atmosphérique (DINGER 1895, KREBBER 1932, BOND 1956, AKKERMANS 1971). Les tentatives d'isolement de l'endophyte impliqué dans la symbiose se sont jusqu'à présent toutes soldées par des échecs (VON PLOTHO 1942, QUISPEL 1955, POMMER 1959); de ce fait, l'étude de la morphogénèse des nodules a été fort laborieuse et bon nombre de questions n'ont pas encore reçu de réponse satisfaisante.

Une connaissance plus précise des processus de nodulation et de fixation de l'azote revêt un intérêt certain: d'une part, l'étude de la fixation de l'azote, en particulier par des pionniers de la végétation comme l'aulne glutineux (PIZELLE 1972a), est d'une grande utilité dans les problèmes posés par la mise en valeur de terrains pour l'agriculture et l'enrichissement de terrains pauvres ou appauvris; d'autre part, l'étude de la nodulation chez des non-légumineuses peut jeter

une lumière nouvelle sur les processus de nodulation chez les légumineuses, où l'endophyte impliqué dans la symbiose est une bactérie (BOND 1948).

En nous basant surtout sur les travaux de POMMER (1956) et TAUBERT (1956) qui furent les premiers à étudier de manière approfondie la formation du nodule, nous nous attacherons à l'étude de sa morphogénèse et de son développement et nous nous efforcerons d'apporter une réponse aux questions suivantes. L'invasion du tissu cortical racinaire mène-t-elle toujours à la formation d'un nodule? Quels sont les endroits de la racine les plus propices à la nodulation? Le nodule est-il une racine latérale transformée? Un changement dans le bilan hormonal de la racine à proximité des foyers d'infection conduit-il à la formation de nouveaux primordes qui, par après, deviendront des nodules?

2. MATÉRIEL ET TECHNIQUES

2.1. Espèce végétale utilisée: Alnus glutinosa (L.) Vill.

Les graines sont récoltées dans le bois de Leyde ("Leidse Hout") chaque année au début décembre, après la première gelée automnale, et sont conservées dans le grainier du Jardin Botanique de Leyde.

2.2. La culture des plantes

2.2.1. Stérilisation des graines

a) Pour les cultures en milieu nutritif liquide, on lave les graines à l'eau savonnée; après rinçage à l'eau de robinet, on les plonge dans une solution à 0,1% de brome pendant 5 minutes, finalement on les rince environ 8 fois à l'eau distillée stérile.

b) Pour les cultures en milieu nutritif solide (plantes destinées à rester toujours stériles), on lave les graines à l'alcool à 70% pendant 4 minutes; après rinçage, on les traite pendant 15 minutes par une solution à 0,1% de brome; ensuite on les rince à nouveau et on les plonge pendant $\pm$ 16 heures dans une solution à 0,5% de chlorhydrate d'hydroxylamine (Fluka) exempt de sulfate; on les rince enfin abondamment à l'eau stérile dans un espace fermé (*fig. 1*), qui est une adaptation de BURLET (1940) faite par Libbenga et utilisée dans notre laboratoire.

2.2.2. Germination

a) les graines stérilisées seulement par le brome sont distribuées plus ou moins régulièrement sur de la brique réduite en fragments d'un calibre de $\pm$ 3 mm (Wernink, Matériaux de construction, Leyde). Après lavage à l'eau, la brique concassée est stérilisée dans l'étuve à 125°C pendant 2 heures, on la met ensuite dans des bacs en plastic de 25 $\times$ 25 $\times$ 11 cm, lesquels sont placés à l'ombre dans une chambre maintenue à la température de 25°C le jour et de 21°C la nuit, avec une humidité relative de $\pm$ 75%. Après 5 jours apparaissent les premières plantules; environ 5 jours plus tard les bacs avec les plantes sont transportés dans une pièce où règnent les conditions suivantes: nycthémère de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité; luminosité d'environ 62.000 lux

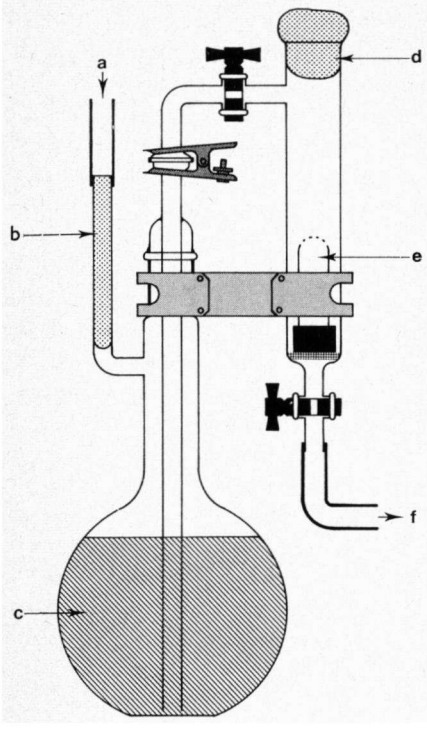

Fig. 1. Espace fermé pour la stérilisation des graines: a) arrivée d'air sous pression, b) filtre d'ouate hydrophile, c) eau stérile, d) bouchon d'ouate hydrophile, e) récipient contenant les graines, f) évacuation.

(tubes TLF Philips de 65W/33 d'une longueur de 1,5 m, à raison de 23 tubes par 1,5 m^2; les tubes se trouvent à environ 1,15 m au-dessus des feuilles des jeunes plantes); température de 21 °C le jour et de 19 °C la nuit; humidité relative de 80 %.

b) les graines stérilisées par le brome et le chlorhydrate d'hydroxylamine sont mises à germer par groupes de 2 ou 3 sur de l'agar incliné dans des tubes de culture. L'agar à 1 % est enrichi d'après WHITE (1943) avec les ingrédients suivants en mg/l: sucrose, 2.000; levure, 100; thiamine, 0,1; $Ca(NO_3)_2$, 100; KCl, 65; $MgSO_4$, 35; KNO_3, 80; KI, 0,75; $Fe_2(SO_4)_3$, 2,5; $MnSO_4$, 4,5; $ZnSO_4$, 1,5; H_3BO_3, 1,5 et KH_2PO_4, 12,5. Les tubes sont placés alors à l'obscurité dans une chambre où la température est maintenue à 25 °C.

2.2.3. Culture

a) Les plantes germées sur l'agar sont placées presque immédiatement après leur germination dans la même chambre que celle où l'on transporte les plantules germées sur de la brique concassée 10 jours après leur mise à germer.

b) Ces dernières, une fois qu'elles ont formé deux feuilles en plus des deux cotylédons, sont transférées dans des bacs contenant de la solution de Crone (BOND 1951) diluée de moitié; après une semaine, on remplace cette solution nutritive par une autre diluée aux trois quarts; une semaine plus tard encore,

cette solution est à son tour remplacée, cette fois par une solution non diluée. Les oligo-éléments de la solution nutritive sont préparés d'après la méthode d'ALLEN & ARNON (1955) et sont dosés à raison de 1 ml par litre de solution de Crone non diluée.

2.3. Procédé d'inoculation

Avant l'inoculation, les plantes portant déjà 4 feuilles sont placées dans la solution de Crone contenant KNO_3, 50 mg/l et KCl, 675 mg/l. On ajoute alors environ 10 ml d'une solution d'inoculum préparée de la façon suivante: on broie 3 g de nodules (poids frais) au mortier; au broyat on ajoute de l'eau de robinet ou un tampon (Na_2HPO_4 et KH_2PO_4) de pH 6,4 et on centrifuge le mélange obtenu 3 fois pendant 20 minutes à 2.000 g; après chaque période de centrifugation, on élimine le surnageant et on dilue à nouveau le sédiment. On obtient finalement 60 ml d'inoculum, dont la quantité employée dépendra de l'intensité de l'infection que l'on veut obtenir (QUISPEL 1954b).

2.4. Microtechnique pour la microscopie photonique

Pour nos études, une excellente conservation du tissu cortical des préparations était indispensable. Nous avons obtenu de bons résultats avec "Paraplast plus" (Sherwood Medical Industries Inc. St. Louis, Missouri; importateur: Van Oortmerssen B.V., La Haye), qui est un composé de paraffine, de polymères plastiques et de diméthyl-sulphoxyde (56°–57 °C).

2.4.1. Fixation

On fixe les segments de racine et les nodules, soit avec FAPA (formol à 40 %, 50 ml; alcool à 96 %, 250 ml; acide propionique, 15 ml et acide acétique glacial, 15 ml), soit avec une solution à 5 % de glutaraldéhyde de pH 6,6.

2.4.2. Inclusion, coupe et étalement

Après rinçage à l'eau courante, on déshydrate le matériel fixé en le portant successivement dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes allant de 10 % à 96 %, et ensuite dans du propanol-2. Le matériel est alors transporté dans du xylène et placé dans une étuve à 60–65 °C. Douze heures plus tard, on renouvelle le xylène et on commence à ajouter périodiquement des écailles de "Paraplast"; lorsque le rapport des concentrations "Paraplast": xylène devient 2:1, on remplace le mélange par du "Paraplast" chaud. L'inclusion définitive se fait environ 6 heures après dans de petites cuvettes en porcelaine. Le matériel ainsi inclus donne de bons rubans de coupes au microtome (épaisseur des coupes: 10 à 15 μm; cadence: environ 80 coupes par minute). Pour l'étalement, on enduit les porte-objets avec l'adhésif de Haupt (JOHANSEN 1940) et on y dépose quelques gouttes d'une solution de formol à 4 %. Sur ce liquide, on étend les rubans de coupes à étaler et on place les porte-objets sur une plaque chauffante (environ 40 °C). Une fois l'étalement obtenu, on draine l'excès de formol et on fait sécher les préparations pendant une nuit dans une étuve à vapeur de formol, réglée à ± 35 °C.

Avant la coloration, on élimine le "Paraplast" des coupes en les plongeant pendant 30 minutes dans du xylène à 40°C et ensuite deux fois dans du xylène à la température de ± 20°C.

2.4.3. Coloration et montage

Comme méthodes de coloration, nous avons employé surtout les suivantes: MAÁCZ & VÁGÁS (1961), Feulgen (STOWELL 1945), acide périodique-Schiff (GERLACH 1969), orangé d'acridine (LIBBENGA & HARKES 1973), bleu de toluidine (FEDER & O'BRIEN 1968) et Fabil (NOEL 1964). Afin de faire disparaître les tannins et les phlobaphènes des coupes, nous avons fait appel à la technique de Stockwell (dans JOHANSEN 1940). Après coloration, les préparations sont déshydratées et montées sous couvre-objet à l'aide de Fluormount (Ed. Gurr) pour le matériel coloré à l'orangé d'acridine, ou à l'aide d'Eukitt (Kindler, Freiburg) dans les autres cas.

2.5 Microscopie électronique

2.5.1. Fixation

Pour la fixation des segments de racine (d'environ 0,7 mm de longueur), nous avons fait appel aux trois procédés suivants:

a) on fixe le matériel, pendant 4 heures, au glutaraldéhyde à 5% tamponné à pH 7,0 par du cacodylate de sodium 0,1 M. Après avoir rincé avec le tampon, on effectue une postfixation, pendant 2 heures, par le tétroxyde osmique à 1% tamponné par du cacodylate de sodium; finalement on rince pendant 15 minutes avec le tampon;

b) on fixe les échantillons par une solution aqueuse à 1,5% de permanganate de potassium pendant 1 heure; on rince à l'eau distillée. La postfixation et le rinçage sont réalisés comme dans la méthode précédente;

c) on fixe par une solution aqueuse à 1,5% de permanganate de potassium pendant une heure et on rince à l'eau distillée.

2.5.2. Déshydratation, inclusion et coupe

Après le dernier rinçage, le matériel est déshydraté de la façon suivante: on le transporte dans des bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes, de 10% à 96%, d'une durée de 5 minutes chacun, ensuite dans l'ordre, ½ heure dans l'alcool absolu, ½ heure dans l'oxyde de propylène, 1 heure dans un mélange d'oxyde de propylène-Epon (2:1), 1 heure dans un mélange à concentrations égales des mêmes constituants, 1 heure dans un mélange d'oxyde de propylène-Epon (1:2), et finalement 12 à 24 heures dans l'Epon pur, lequel est renouvelé pour une période de 6 heures. L'inclusion définitive se fait dans des capsules qui sont maintenues, pendant 4 heures, à 35°C et ensuite, pendant 48 heures, à 60°C. A l'aide d'un ultramicrotome LKB Ultratome III avec des couteaux de verre, on fait des coupes de 2 à 3 μm d'épaisseur destinées à l'examen au microscope photonique et des coupes de 50 nm destinées à l'étude au microscope électronique. Les coupes de 2 à 3 μm sont colorées dans une solution à 1% de bleu de toluidine dans du borax à 1% (pH 8,8) pendant ± 5

minutes. Les coupes de 50 nm sont déposées sur un bain d'eau, étalées à l'aide de vapeurs de chloroforme et transportées sur des grilles munies d'une membrane en Piolophorme F (Wacker Chemie, München). Finalement on laisse sécher les préparations.

2.5.3. Coloration

Le matériel postfixé par le tétroxyde osmique est "coloré", pendant la déshydratation, au moyen des alcools à 30%, 50% et 80%, lesquels ont été préparés à cet effet en diluant l'alcool à 96% avec une solution aqueuse saturée d'acétate d'uranyl. Afin d'augmenter le contraste, on peut "colorer" en outre avec une solution de citrate de plomb pendant 8 minutes, selon la formule de REYNOLDS (1963). L'étude des préparations se fait au moyen d'un microscope électronique Philips EM 300.

2.6. Eclaircissement

Après fixation au FAPA, on colore les systèmes radiculaires par la méthode de Feulgen; on les transporte alors dans des bains successifs d'éthanol jusqu'à l'alcool à 70%, que l'on remplace ensuite par un mélange de n = 1,477 (communication personnelle de P. D. Burggraaf) composé de: alcool benzylique, 576 ml; alcool terbutylique, 324 ml, et eau distillée, 100 ml. On renouvelle le mélange après 24 heures et on examine le matériel à l'aide d'un microscope stéréoscopique.

3. LA FORMATION DES NODULES

3.1. Introduction

Du fait que le nodule racinaire chez *Alnus glutinosa* (L.) Vill. est, par son anatomie, sans conteste fort semblable à une racine latérale, plusieurs chercheurs (SCHACHT 1853, BRUNCHORST 1886, SPRATT 1912, ARCULARIUS 1928, HAWKER & FRAYMOUTH 1951) n'ont pas hésité à identifier ces deux organes. En 1933, SCHAEDE a insisté encore davantage sur cette ressemblance et, en 1956, c'était au tour de Pommer et de Taubert de la confirmer. Au cours de leurs recherches, ces deux derniers auteurs, ainsi que BOND (1963), ont cependant attiré l'attention sur les détails qui différencient les deux organes en question: absence de coiffe ainsi que de poils absorbants et formation d'une couche liégeuse chez le nodule. En outre, en 1866 déjà, Woronin, dans une étude anatomique rigoureuse, a signalé une autre différence: quoique dans l'ensemble les tissus nodulaires et racinaires ont la même structure et la même ordonnance, le parenchyme situé entre l'épiderme et le cylindre central comporte, dans la racine, quatre à six couches de cellules, tandis que dans le nodule, on en compte quinze à vingt, et même davantage. Les premières études sur la morphogénèse du nodule racinaire de l'aulne glutineux ont été effectuées par POMMER (1956) et TAUBERT (1956). Ces travaux, qui ont paru presque simultanément, ne concordent pas sur certains points importants, tels que, par exemple, l'origine du primorde de nodule et la zone traversée par ce primorde. Ceci nous a obligé à

vérifier leurs assertions par une analyse microscopique comme préalable à nos expériences. Nous nous proposons d'étudier, dans des nodules très jeunes, la succession des différentes étapes du processus de nodulation et d'apporter une réponse satisfaisante à la question de la nature des nodules: sont-ce des racines latérales ordinaires qui, sous l'influence de l'endophyte, se transforment en nodules? En résumé, notre étude portera donc sur le comportement de "l'actinomycète" dans la racine et la réaction de celle-ci à son égard.

L'endophyte en symbiose avec l'aulne se présente sous trois formes différentes (BECKING et al. 1964): de fins filaments ou hyphes (0,5 μm), des gonflements sphériques aux extrémités des ramifications d'hyphes ou vésicules (2 à 4 μm de diamètre) et des cellules polyédriques ou granules (0,5 à 1,0 μm de diamètre).

3.2. Matériel et techniques

L'étude descriptive de la formation des nodules est basée sur l'utilisation de techniques décrites plus haut: méthode de culture (2.2.); procédé d'inoculation (2.3.); microtechnique (2.4.); microscopie électronique (2.5.); éclaircissement (2.6.).

Nous avons pu localiser les endroits de nodulation à un stade assez précoce grâce au phénomène suivant, observé sur matériel vivant. Environ 8 jours après l'inoculation, des petites protubérances apparaissent dans une région de la racine où se manifeste également une déformation des poils absorbants, s'accentuant acropétalement jusqu'à une zone qui peut sembler glabre; au-delà de cette zone, des poils absorbants sont à nouveau visibles et font graduellement place à des poils absorbants longs et non déformés (*fig. 2*). Dans certains cas, les protubérances se confinent à la transition entre la zone glabre et la partie distale de la racine qui porte des poils absorbants (*fig. 3*). C'est dans les domaines portant des protubérances que vont apparaître les nodules.

3.3. Description

3.3.1. Processus d'infection

Dans le processus d'infection, nous pouvons distinguer plusieurs étapes:

a) le contact de l'endophyte avec le système radiculaire de la plante et sa multiplication probable dans le rhizoplan;

b) la déformation des poils absorbants dans une région assez bien délimitée de la racine;

c) la pénétration de l'endophyte, sous forme d'hyphes, à travers un certain nombre de poils absorbants;

d) l'apparition de divisions cellulaires dans une zone de l'écorce située en face des poils absorbants porteurs d'hyphes;

e) la diffusion des hyphes dans l'écorce;

f) la formation de vésicules dans les cellules initialement remplies d'hyphes.

ad a) grâce à l'examen au microscope électronique, nous avons pu observer la présence de concentrations de cellules polyédriques, qui sont probablement des granules, dans le rhizoplan (*figs. 4* et *5*).

ad b) comme le montrent les *figures 2* et *3*, les racines touchées par l'endophyte

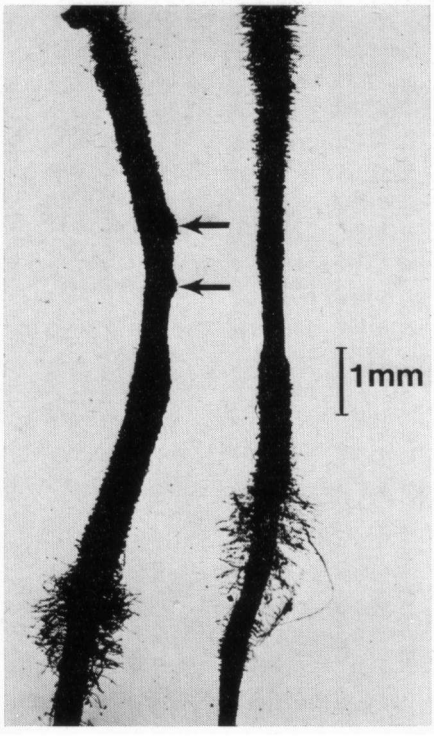

Fig. 2. Déformation et zonation des poils absorbants sur les racines de plantes inoculées. Gonflements sur la région "glabre" (flèche).

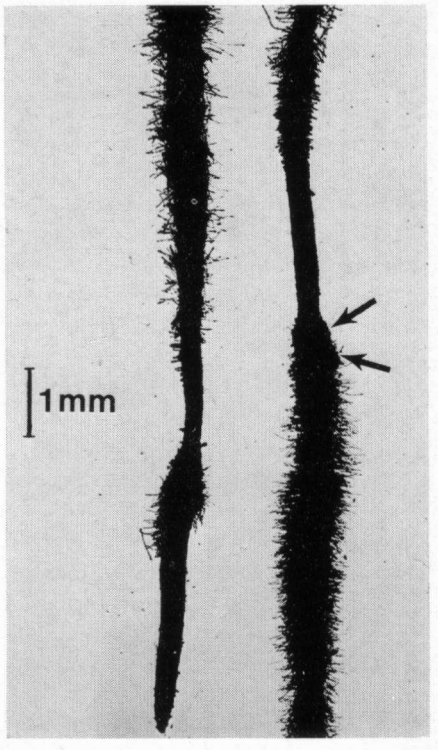

Fig. 3. Déformation et zonation des poils absorbants sur les racines de plantes inoculées. Gonflements sur l'extrémité distale de la zone "glabre" (flèche).

présentent, en des endroits bien déterminés, une déformation évidente de leurs poils absorbants. Cette déformation est totale, c.-à-d. qu'elle concerne tous les poils absorbants de la zone affectée, et graduée, en ce sens que la déformation augmente acropétalement d'une manière progressive jusqu'à un certain maximum d'où un état normal se rétablit peu à peu, soit de façon abrupte. Une description de la déformation des poils absorbants a été faite par POMMER (1956).

ad c) à l'intérieur de certains poils absorbants déformés, on trouve l'endophyte: il s'y présente sous forme d'hyphes qui parcourent les poils longitudinalement jusqu'à leur base. Là les hyphes forment un réseau d'où l'infection se distribuera dans l'écorce; souvent même ils y forment une sorte de pelote et arrivent à produire des vésicules surtout si leur progression ne se poursuit pas vers l'intérieur de la racine (*figs. 6* et *7*).

ad d) sept à huit jours après l'inoculation, on peut observer les premières divisions cellulaires dans des secteurs de l'écorce de racines coupées transversalement alors que, en ce moment, des hyphes ne peuvent encore y être

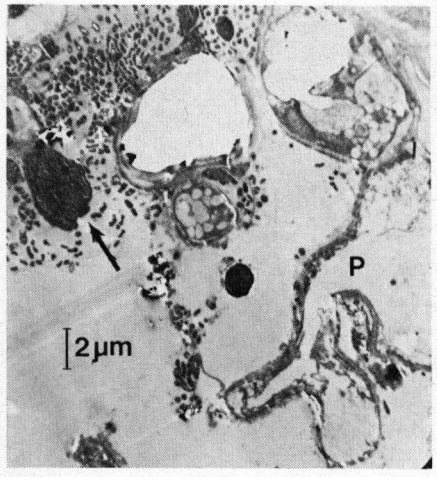

Fig. 4. Concentration de "l'endophyte" (flèche) dans le rhizoplan et poil absorbant déformé (P).

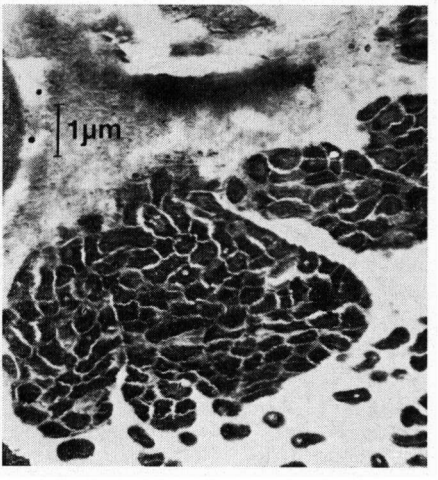

Fig. 5. Détail des concentrations du micro-organisme trouvé dans le rhizoplan.

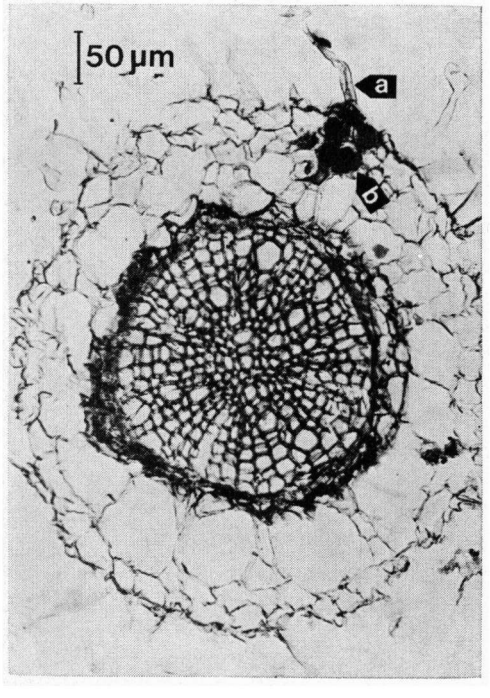

Fig. 6. Coupe transversale d'une racine montrant un poil absorbant infecté (a) et quelques cellules de l'écorce où l'endophyte a formé des vésicules (b), mais pas de nodule primaire.

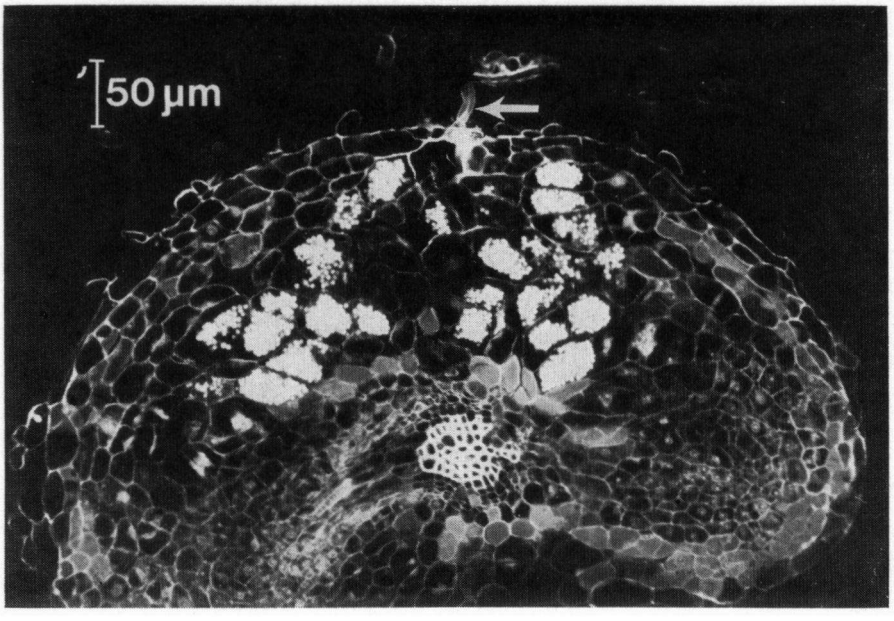

Fig. 7. Coupe transversale d'une racine montrant un poil absorbant infecté (flèche) et la formation du nodule primaire.

décelés. Ces divisions cellulaires, responsables des boursouflures observées en certains endroits de la racine, entraînent la formation d'un nombre plus grand de couches cellulaires sur le côté "infecté" que sur celui qui ne l'est pas (*fig. 8*).

ad e) dans les cellules qui se sont divisées, on trouve peu après de grandes concentrations d'hyphes. Tandis que l'on peut suivre le passage d'une cellule à une autre par quelques filaments, à l'intérieur des cellules, les hyphes sont tellement nombreux et serrés qu'ils forment une pelote autour du noyau qui s'est hypertrophié entretemps. Aussi bien le noyau que le nucléole des cellules ainsi infectées sont sensiblement plus grands que ceux des cellules non infectées. L'invasion des cellules par les hyphes se fait d'une façon centrifuge à partir d'un centre d'infection autour duquel les cellules de l'écorce se divisent. Ce phénomène s'accompagne d'une assez grande production d'amidon (*fig.9*).

ad f) dans les cellules contenant des hyphes, on assiste quelques jours plus tard à la formation de petites sphères de $\pm$ 2 µm de diamètre, les vésicules, qui restent toujours reliées à des hyphes. Ces vésicules et les grandes concentrations d'hyphes ne se trouvent fort souvent qu'à partir de la troisième couche externe de l'écorce; d'autre part, l'infection s'arrête toujours au contact de l'endoderme. La zone infectée est entourée par une sorte de barrière composée de cellules se colorant intensément, probablement par suite de la présence de tannins en grande quantité.

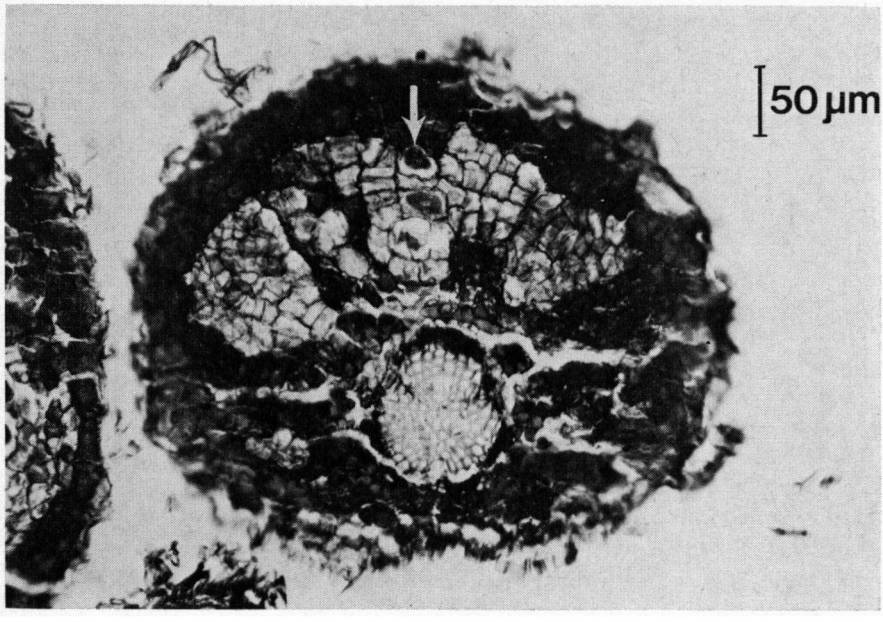

Fig. 8. Stade précoce de la formation du nodule primaire: les divisions cellulaires ont eu lieu, l'écorce s'est épaissie du côté infecté et la barrière de tannin encercle le domaine où se manifeste l'action de l'endophyte. Celui-ci est présent sous la forme d'hyphes dans les cellules indiquées par la flèche. Coupe transversale.

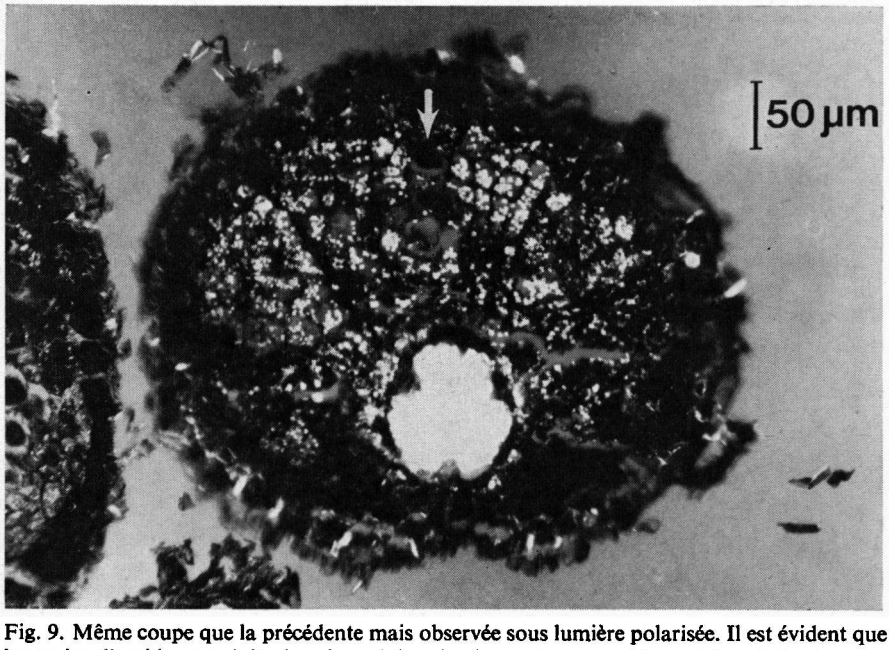

Fig. 9. Même coupe que la précédente mais observée sous lumière polarisée. Il est évident que les grains d'amidon produits dans le nodule primaire sont disparus des cellules où l'endophyte est visible (flèche).

3.3.2. Formation du nodule

Définitions: dans la description de la formation du nodule, nous sommes amenés à utiliser quelques termes que nous essayerons tout d'abord de définir avec le plus de précision possible:

a) organe: sous ce terme nous englobons racines latérales, primordes et nodules;
b) primorde: tous les stades initiaux bien organisés des racines et des nodules, qui n'ont pas encorce percé l'épiderme de la racine porteuse;
c) infection primaire: la pénétration et l'installation de l'endophyte dans les poils absorbants;
d) nodule primaire: l'ensemble formé par les divisions cellulaires, l'hypertrophie des noyaux et la production de vésicules, induit par la première diffusion de l'endophyte dans l'écorce de l'hôte; (*fig. 10*);
e) nodule proprement dit: formation qui est en fait un nouvel organe possédant un cylindre central relié à celui de la racine porteuse; dans cet organe, on distingue un méristème apical et une écorce avec plusieurs zones (*fig. 11*);
f) organes de premier ordre: racines latérales, primordes et nodules qui se développent sur la racine principale;
g) organes de deuxième ordre: racines latérales, primordes et nodules qui se développent sur les racines latérales de premier ordre.

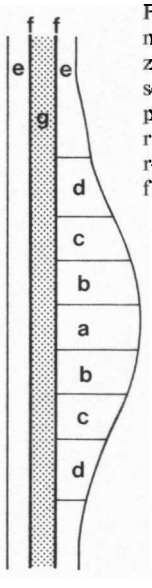

Fig. 10. Nodule primaire en coupe longitudinale. On distingue les parties suivantes: a) zone à hyphes et vésicules; b) zone à hyphes seulement (phase d'installation); c) zone de pénétration des hyphes dans les cellules auparavant divisées; d) zone à divisions cellulaires; e) écorce non touchée par l'infection; f') endoderme, et g) cylindre central.

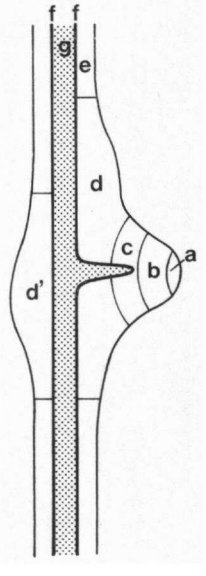

Fig. 11. Nodule proprement dit en coupe longitudinale. On distingue les parties suivantes: a) méristème apical du nodule; b) zone de différenciation des cellules et première invasion par les hyphes au voisinage de la zone c; c) zone où l'endophyte se présente exclusivement sous la forme d'hyphes; d) zone contenant l'endophyte sous forme d'hyphes et de vésicules; d') nodule primaire correspondant à la formation représentée dans la *fig. 10*; e) écorce non touchée par l'infection; f) endoderme, et g) cylindre central.

Après la diffusion de l'endophyte dans l'écorce de la racine hôte (formation du nodule primaire), l'on assiste à l'apparition de nouveaux organes, les nodules proprement dits, qui ont leur origine dans le péricycle et se développent à travers l'écorce de la racine porteuse. Ces organes sont, d'après leur ontogénie et leur morphologie, comparables à des racines latérales avec toutefois les caractéristiques suivantes: les nodules se développent en bordure de la zone infectée (nodule primaire) et croissent en traversant des secteurs de racine qui ne sont pas encore infectés par l'endophyte (*fig. 12*); plus encore, on assiste à un recourbement du primorde du nodule dans la direction opposée à la zone déjà envahie par l'endophyte. Une fois que le nodule proprement dit a une écorce suffisamment développée, l'on peut constater une invasion acropétale de celle-ci par des hyphes issus du nodule primaire. Ces hyphes arrêtent leur progression à une certaine distance du méristème apical du nouvel organe. Après avoir percé l'épiderme de la racine porteuse, le nodule proprement dit s'allonge et augmente progressivement de calibre; à sa base commence la formation de vésicules et on assistera à la distribution en zones représentée dans la *fig. 11*. Un peu plus tard, le méristème apical commencera à se diviser d'une façon dichotomique et, après des divisions répétées, le nodule peut présenter l'aspect d'un conglomérat sphérique qui, dans la littérature, a reçu le nom de "rhizotammium".

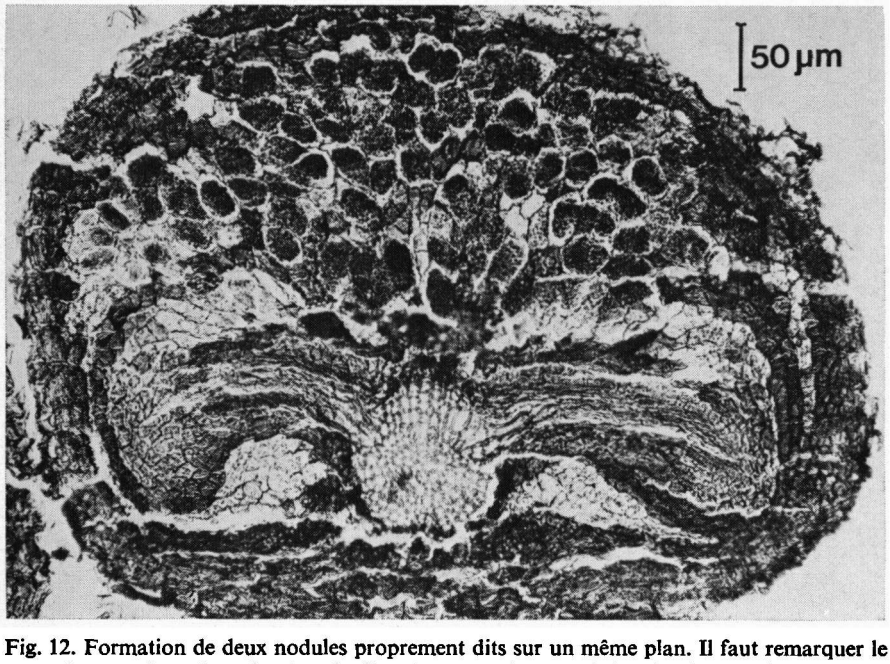

Fig. 12. Formation de deux nodules proprement dits sur un même plan. Il faut remarquer le recourbement des primordes dans la direction opposée au nodule primaire (partie supérieure de la coupe).

3.3.3. Relation endophyte-nodules

Afin de pouvoir comprendre avec précision les relations de la propagation de l'endophyte dans l'écorce avec les nodules formés et aussi avec les racines latérales éventuellement présentes à proximité des centres d'infection, nous avons procédé à des coupes transversales sériées sur des portions de racines de ± 1 cm de long comportant toute la série de nodules que nous avons pu trouver. Le matériel étudié a été fixé 3 semaines après l'inoculation. Dans des cas comme celui présenté dans la *fig. 13*, on constate une continuité dans la présence de l'endophyte: l'infection s'étend de manière continue de 675 µm au-dessus du nodule proximal jusqu'à 165 µm au-dessous du nodule distal. Mais dans d'autres cas la distribution de l'endophyte est plus compliquée comme le montrent les données suivantes (*figs. 14* et *15*). Les distances entre les divers organes ont été mesurées en tenant compte de l'intersection de leur cylindre central avec celui de la racine porteuse. La racine représentée dans la *figure 14* comporte 2 racines latérales portant l'une et l'autre quelques nodules. L'endophyte s'y distribue, acropétalement, comme suit:

a) dans la racine latérale supérieure, qui porte en sa partie proximale un groupe de cinq nodules, on a noté:

endophyte – nodule – endophyte – nodule – endophyte –
520 µm 80 µm 180 µm
nodule – endophyte – nodule – endophyte – nodule – endophyte –
440 µm 80 µm 520 µm
sans endophyte – endophyte – racine latérale – endophyte –
2380 µm 120 µm 180 µm

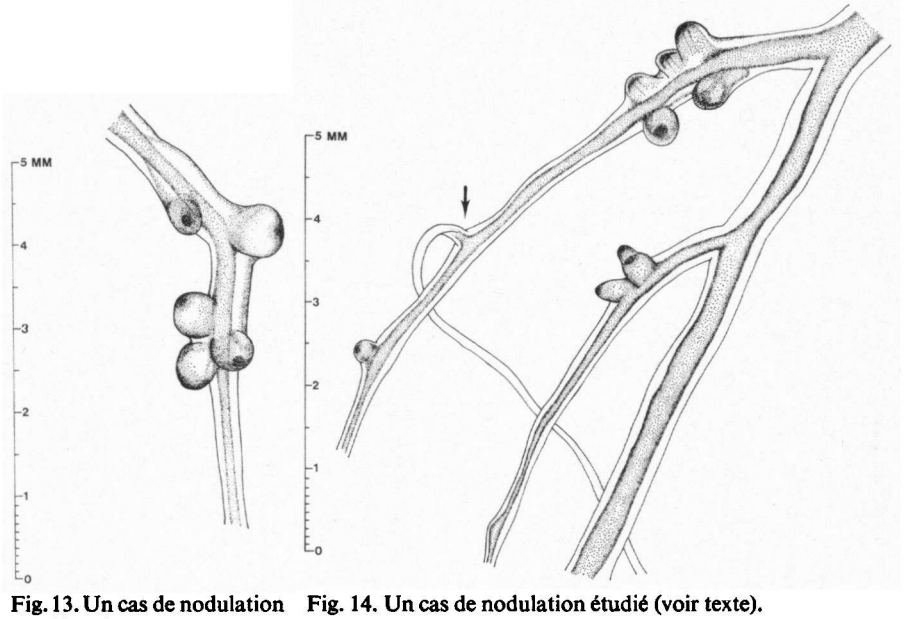

Fig. 13. Un cas de nodulation étudié (voir texte).

Fig. 14. Un cas de nodulation étudié (voir texte).

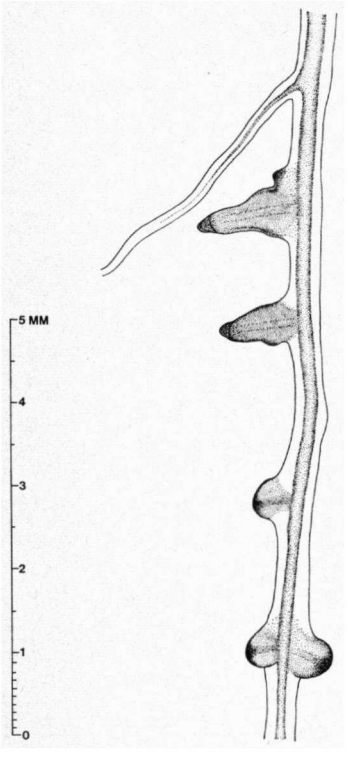

Fig. 15. Un cas de nodulation étudié (voir texte).

sans endophyte – endophyte – nodule – endophyte
900 µm 260 µm 200 µm

b) dans la racine latérale inférieur on a trouvé:

endophyte – nodule – endophyte – nodule – endophyte
100 µm 380 µm 180 µm

La distribution du cas illustré dans la *figure 15* est décrite à partir de la zone immédiatement sus-jacente au nodule proximal:

endophyte – nodule – endophyte – sans endophyte – endophyte –
220 µm 400 µm 100 µm 140 µm
sans endophyte – endophyte – sans endophyte – endophyte –
100 µm 140 µm 40 µm 400 µm
nodule – endophyte – sans endophyte – endophyte –
240 µm 380 µm 100 µm
sans endophyte – endophyte – sans endophyte – endophyte –
100 µm 340 µm 80 µm 60 µm
sans endophyte – endophyte – nodule – endophyte –
40 µm 700 µm 180 µm
sans endophyte – endophyte – sans endophyte – endophyte –
80 µm 760 µm 140 µm 180 µm

nodule – endophyte – nodule – endophyte – sans endophyte –
80 μm 1000 μm 40 μm
endophyte – sans endophyte – endophyte – sans endophyte
780 μm 60 μm 80 μm ...

Conclusion

Deux questions exigeaient une réponse dans ce chapitre: a) les nodules sont-ils des racines latérales transformées ou non? b) toute infection qui a produit un nodule primaire, conduit-elle aussi à la formation d'un nodule proprement dit?

A la première question, nous pouvous répondre que l'ontogénie et l'anatomie des nodules sont en effet fort semblables à celles des racines latérales présentes sur des plantes non inoculées par l'endophyte et que, par conséquent, les nodules sont très probablement des racines latérales transformées. Mais du fait que nous trouvons des groupes de 3 et plus de nodules qui se succèdent immédiatement sur une distance de ± 1 mm (*figs. 13* et *14*), nous sommes en présence d'un mode de distribution différent de celui des racines latérales sur des plantes non inoculées. Ceci nous amène à poser comme hypothèse que des racines latérales induites par l'endophyte seraient transformées en nodules à un stade précoce de leur développement. Les problèmes du surnombre éventuel des nodules, de leur mode de distribution différent de celui des racines latérales et de l'induction de racines adventives qui se transforment par après en nodules seront traités dans les chapitres suivants.

A la deuxième question, concernant la possibilité de tout nodule primaire de donner lieu à la formation d'un nodule proprement dit, nous pouvons répondre par la négative en nous basant sur les données fournies par les cas illustrés dans les *figures 14* et *15* et bon nombre d'observations analogues, où nous rencontrons des interruptions de l'infection dans l'écorce. Dans la racine représentée sur la *figure 15*, des régions de ± 340 et ± 760 μm de longueur qui portent l'endophyte aussi bien au stade d'hyphes que de vésicules et qui sont des nodules primaires, n'ont pas produit de nodules proprement dits.

La racine latérale se trouvant entre le groupe de cinq nodules de la partie proximale et le nodule de la partie distale (*fig. 14*, flèche) est encadrée à sa base par de l'endophyte (± 120 et ± 180 μm) qui a même formé un nodule primaire. Ceci revêt un intérêt tout particulier, car ce fait montre bien que les racines latérales ordinaires, sous l'action de l'endophyte, ne sont pas forcément transformées en nodules.

4. RACINES LATÉRALES, LEURS RAPPORTS AVEC LES NODULES ET SITES DE NODULATION

4.1. Introduction

Afin de vérifier l'hypothèse posée dans le chapitre précédent, concernant la nature des nodules (racines latérales adventives induites par l'endophyte et par après transformées en nodules), nous abordons ici le problème de telle manière

qu'une comparaison entre le matériel inoculé et le matériel non inoculé nous permette de tirer des conclusions quant au nombre et à la distribution des racines latérales et des nodules. Il faut remarquer que, dans ce chapitre et les suivants, quand il sera question de nodules, il s'agira toujours de nodules proprement dits. Les questions qui devront trouver une réponse dans ce chapitre, sont: a) le nombre total de racines latérales et primordes de latérales dans le matériel inoculé est-il égal à ou différent de celui dans le matériel non inoculé? b) le nombre total de racines latérales et primordes dans des plantes non inoculées est-il égal à ou différent de celui des racines latérales plus nodules et primordes dans des plantes inoculées? et c) par rapport au moment de l'inoculation, quels sont les sites de la racine propices à la formation de nodules?

En outre, si les nodules sont des racines latérales transformées, nous devons nous attendre à ce que le mode de distribution des racines et des primordes de racines reste identique dans le matériel inoculé et celui qui ne l'a pas été, et que cela reste ainsi même si l'on tient compte des nodules formés par l'inoculum.

4.2. Matériel et techniques

Nous avons utilisé la méthode de culture déjà décrite (2.2.3.b) en veillant à ce que les plantes aient une moyenne de 5 racines latérales avant de les transférer de la brique concassée sur la solution nutritive. Lors de nos premières expériences, il nous avait en effet été impossible d'obtenir des nodules chez des plantes inoculées à un stade très jeune, comportant une racine de $\pm$ 1,5 cm de long et parfois 1 ou 2 ébauches de racines latérales.

4.3. Méthodes statistiques

Pour les études statistiques, nous avons employé un test d'analyse multivariée (test de Bartlett) d'après Rao (1968): "Test for differences in mean values between several populations." L'analyse des données a été faite à l'aide d'un ordinateur IBM 360/65 et H. W. de Nie (Instituut voor Theoretische Biologie, Leyde) a écrit le programme Algol.

Pour chaque plante, on a traité simultanément 4 données: nombre de racines latérales de premier ordre, nombre de primordes de racines latérales de premier ordre, nombre de racines latérales de deuxième ordre, nombre de primordes de racines latérales de deuxième ordre. Les valeurs obtenues dans le test de Bartlett suivent une distribution de chi carré avec p(s-1) degrés de liberté, où p = nombre de variables indépendantes et s = nombre de séries qui sont testées entre elles.

Dans les expériences avec les différentes concentrations de nitrate, on a employé le test F d'après Rao (1968) comme contrôle des résultats obtenus avec le test de Bartlett et pour la vérification de l'hypothèse alternative.

4.4. Résultats

4.4.1. Nitrate et racines latérales

Etant donné que nous voulons savoir si les nodules sont des racines latérales ordinaires ou adventives, et que certaines concentrations d'azote inhibent la

nodulation (BOND et al. 1954, QUISPEL 1958), nous avons essayé tout d'abord de déterminer si la teneur en nitrate de la solution nutritive que nous employons, a quelque effet sur la formation des racines latérales. Pour ce faire, nous avons utilisé des plantes cultivées dans de la solution de Crone contenant diverses concentrations de nitrate. Seize jours après la mise à germer, on a placé les plantes dans la solution de Crone diluée de moitié; deux semaines plus tard débutait l'expérience proprement dite dans de la solution de Crone contenant les concentrations suivantes de KNO_3 et de KCl: 500 mg/l KNO_3; 250 mg/l KNO_3 et 375 mg/l KCl; 50 mg/l KNO_3 et 675 mg/l KCl; soit respectivement 4,945, 2,472 et 0,494 milliéquivalents/litre de nitrate.

Le jour du début de l'expérience, on a fixé 10 plantes; après une semaine et deux semaines, on a fixé chaque fois 10 plantes de chaque groupe. On a coloré, éclairci et fait les comptages. La *figure 16* représente les moyennes des nombres de racines et de primordes, aussi bien de premier que de deuxième ordre; la déviation standard de la moyenne est donnée dans le *tableau 1.*

Notre hypothèse de départ était la suivante: les moyennes obtenues à chaque date de récolte sous les trois traitements différents ne montrent pas de différence entre elles. Si cette hypothèse est à rejeter, nous devrions faire une comparaison multiple afin d'étudier les différences existantes. A cette fin, nous poserions alors l'hypothèse alternative suivante: deux moyennes sont égales à une moyenne fictive; on vérifie si la troisième est égale à la moyenne fictive.

Après une semaine, on a obtenu une valeur de 13,96 qui, dans la distribution de chi carré avec 8 degrés de liberté, correspond à $p = 0{,}084$, c.-à-d. qu'il n'y a pas de différence significative entre les groupes.

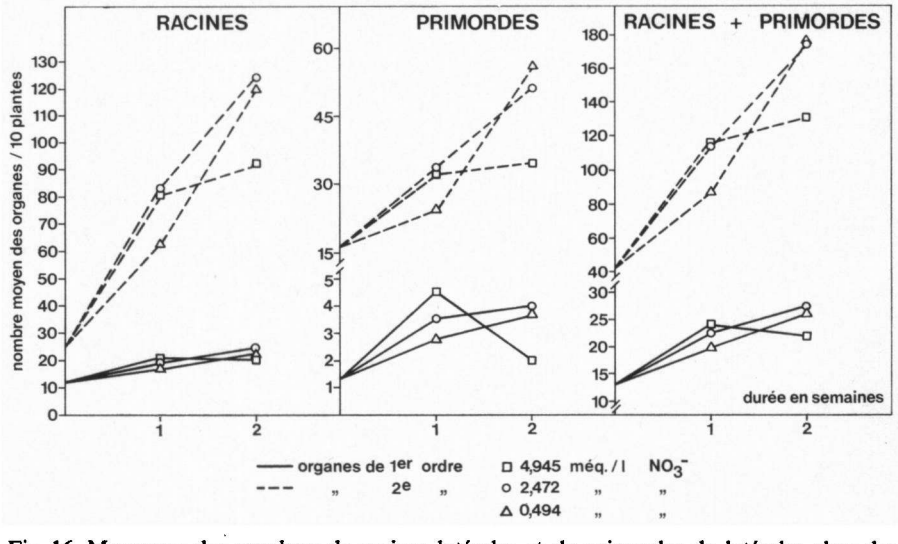

Fig. 16. Moyennes des nombres de racines latérales et de primordes de latérales chez des plantes traitées avec trois concentrations différentes de nitrate (10 plantes par groupe étudié).

Tableau 1. Déviation standard des moyennes représentées dans la *fig. 16.*

		départ	après 1 semaine			après 2 semaines		
NO_3^- méq/l		2,472	0,494	2,472	4,945	0,494	2,472	4,945
1er Ordre	racines	2,539	3,755	3,348	3,206	5,082	3,498	3,645
	primordes	1,059	1,619	1,179	2,014	1,636	2,160	1,333
	rac. + prim.	2,669	4,483	2,591	2,667	4,398	4,270	3,393
2e Ordre	racines	10,475	15,840	19,680	18,403	36,241	43,447	27,629
	primordes	9,510	9,891	9,134	10,207	19,988	19,050	12,213
	rac. + prim.	15,106	21,219	22,381	23,385	52,968	61,058	37,345

Après deux semaines, on a obtenu une valeur de 15,29 qui, dans la distribution de chi carré avec 8 degrés de liberté, correspond à $p = 0{,}054$, valeur proche de la limite de différence significative. Dans l'hypothèse alternative, nous considérons les moyennes correspondant aux traitements par 0,494 et 2,472 méq/l NO_3^- comme égales entre elles et à une moyenne fictive; par le test F d'après RAO (1968), nous vérifions si cette moyenne fictive est égale ou non à la moyenne du traitement par 4,945 méq/l. On a obtenu une valeur $F = 3{,}44$ qui, pour 8 et 48 degrés de liberté, correspond à $p<0{,}01$, c.-à-d. une différence significative; nous devons dès lors rejeter l'hypothèse alternative. Le nombre de racines latérales et de primordes dans les plantes cultivées avec une concentration de 4,945 méq/l NO_3^- diffère de façon significative de celui des plantes cultivées avec deux fois et dix fois moins de NO_3^-. Entre la première et la deuxième semaine, il y a une sorte de freinage dans l'apparition des racines latérales et primordes.

Conclusion

En nous basant sur les résultats obtenus, nous pouvons utiliser pour nos expériences ultérieures soit la concentration de 0,494 méq/l, soit la concentration de 2,474 méq/l, qui produisent à peu près les mêmes effets et sont toutes deux inférieures à la concentration inhibitrice de la nodulation (QUISPEL 1958). Notre choix s'est porté sur la concentration de 0,494 méq/l NO_3^- parce qu'une faible teneur en azote de la solution nutritive favorise la nodulation (QUISPEL 1958). En outre, nous avons ainsi la garantie que ne se produisent des perturbations suite à une augmentation de l'azote disponible chez les plantes nodulées, car la marge de sécurité s'étend au moins jusqu'à la concentration de 2,472 méq/l.

4.4.2. Comparaison entre matériel non inoculé (racines latérales et primordes) et matériel inoculé (racines latérales, primordes et nodules)

Dans cette expérience, notre hypothèse de travail était la suivante: si les nodules sont des racines latérales ordinaires (non adventives) transformées, le nombre des racines latérales dans le matériel non inoculé doit être à peu près égal à celui des racines latérales et nodules dans le matériel inoculé.

Pour l'inoculation des plantes, nous avons procédé ainsi: le broyat obtenu

(2.3.) est divisé en deux parties égales; l'une est conservée telle quelle, l'autre est soumise pendant une heure à une température de 70 °C afin de rendre inactif l'endophyte (QUISPEL 1954a). Deux groupes de plantes sont alors inoculés avec l'une ou l'autre de ces préparations. Quarante-huit heures après, on rince les systèmes radiculaires et on renouvelle les solutions nutritives, lesquelles sont par après remplacées tous les huit jours par des solutions fraîches. Le jour de l'inoculation, on fixe 10 plantes et une, deux et trois semaines après l'inoculation, on fixe chaque fois 10 plantes de chaque groupe. Après coloration et éclaircissement, on procède aux comptages.

Dans la *figure 17* sont représentés les nombres moyens des racines latérales, des primordes de racines latérales et des nodules, aussi bien de premier que de deuxième ordre. Le matériel "sans infection" ne porte pas de nodules puisqu'il a été inoculé avec de l'endophyte rendu inactif. Le matériel "avec infection", inoculé avec l'endophyte actif, porte des nodules. Le *tableau 2* comporte les

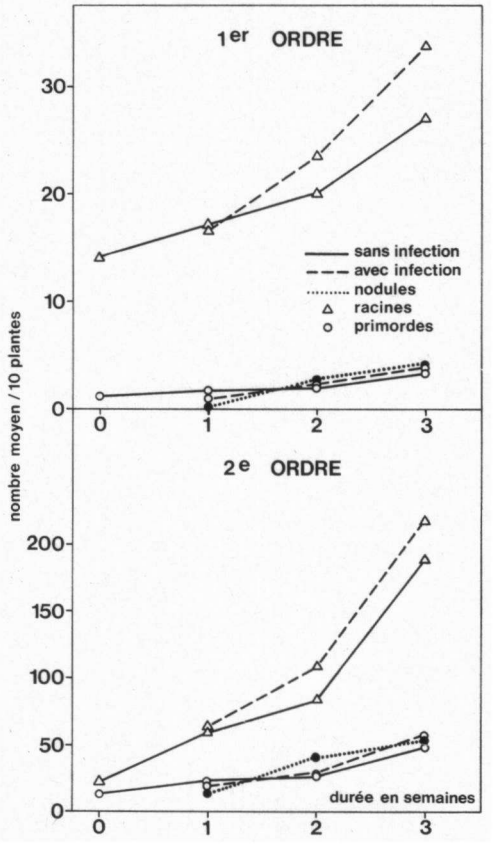

Fig. 17. Moyennes des nombres de racines latérales, de primordes de latérales et de nodules chez des plantes nodulées et non nodulées (10 plantes par groupe étudié): sans infection = inoculées avec l'endophyte rendu inactif. avec infection = inoculées avec l'endophyte actif.

Tableau 2. Déviation standard des moyennes représentées dans la *fig. 17.*

		départ	après 1 semaine		après 2 semaines		après 3 semaines	
			non nodulé	nodulé	non nodulé	nodulé	non nodulé	nodulé
1er Ordre	racines	3,736	2,470	4,001	3,327	3,765	7,040	6,490
	primordes	1,101	0,699	0,738	1,449	0,823	1,640	1,790
	nodules			0,422		2,440		2,000
2e Ordre	racines	9,120	23,162	16,141	17,056	22,559	52,370	39,590
	primordes	6,420	7,103	7,495	4,807	10,287	17,910	13,050
	nodules			6,125		12,880		24,090

valeurs de la déviation standard des données représentées dans la *figure 17.*

L'analyse multivariée destinée à comparer les nombres des racines latérales ordinaires et primordes de latérales dans le matériel non nodulé et le matériel nodulé a donné les valeurs suivantes de chi carré:
après une semaine: 4,68,
après deux semaines: 6,43,
après trois semaines: 6,90,
valeurs qui, pour quatre degrés de liberté, correspondent à $p>0{,}136$; les différences entre les deux groupes ne sont donc pas significatives. Quand, sur la base de la théorie suivant laquelle les nodules sont des racines latérales ordinaires transformées, nous ajoutons le nombre total des nodules à celui des racines latérales du matériel inoculé avec l'endophyte actif, la comparaison avec le matériel inoculé avec l'endophyte rendu inactif a fourni les valeurs de chi carré suivantes (pour quatre degrés de liberté):
après une semaine: 7,53,
après deux semaines: 22,41,
après trois semaines: 17,91.
Après une semaine, la valeur de chi carré trouvée correspond à une différence non significative, mais après deux et trois semaines, les valeurs de chi carré correspondent à $p<0{,}005$ et nous sommes donc en présence de différences hautement significatives.

Conclusion

Les résultats de ces comparaisons numériques entre les groupes infectés et non infectés nous permettent de conclure que les nodules apparaissent en surplus des racines latérales et que, comme corollaire, les nodules ne sont pas (ou du moins ne sont pas tous) des racines latérales ordinaires transformées. Ainsi reste seule valable l'hypothèse selon laquelle les nodules apparaissent adventivement, c.-à-d. entre les racines latérales ordinaires, qui se développeraient normalement malgré la formation des nodules. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons entrepris les études suivantes.

4.4.3. Mode de distribution des racines latérales et des nodules

Nous comparerons le mode de distribution des organes sur les racines du matériel nodulé avec celui des organes sur les racines des plantes non nodulées. Notre analyse porte sur deux échantillons, l'un de 10 plantes examinées trois semaines après l'inoculation, l'autre de 10 plantes inoculées avec l'endophyte rendu inactif, servant comme groupe témoin.

Nous tenons compte des deux variables qui déterminent la relation entre deux organes successifs sur une même racine, c.-à-d. la distance qui les sépare et l'angle qu'ils forment entre eux. La distance est mesurée entre les points d'intersection du cylindre central de deux organes successifs avec le cylindre central de la racine porteuse. L'angle évalué est celui formé par deux plans passant d'une part, l'un et l'autre par l'axe de la racine porteuse et d'autre part, par l'axe de l'un ou de l'autre des deux organes considérés.

Dans les plantes nodulées (*fig. 18*), nous appelons:

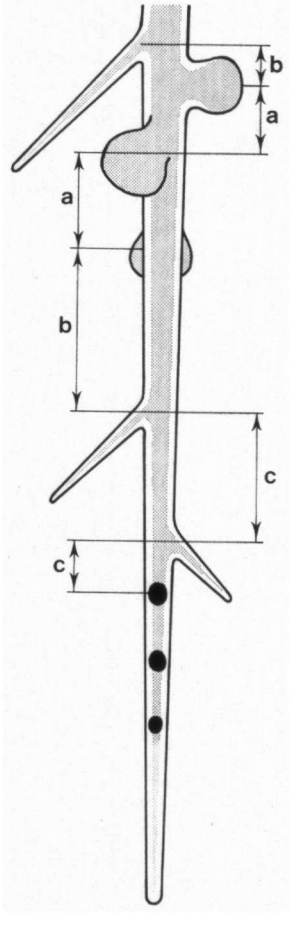

Fig. 18. Classification des espaces entre organes successifs sur une racine de matériel nodulé (voir texte).

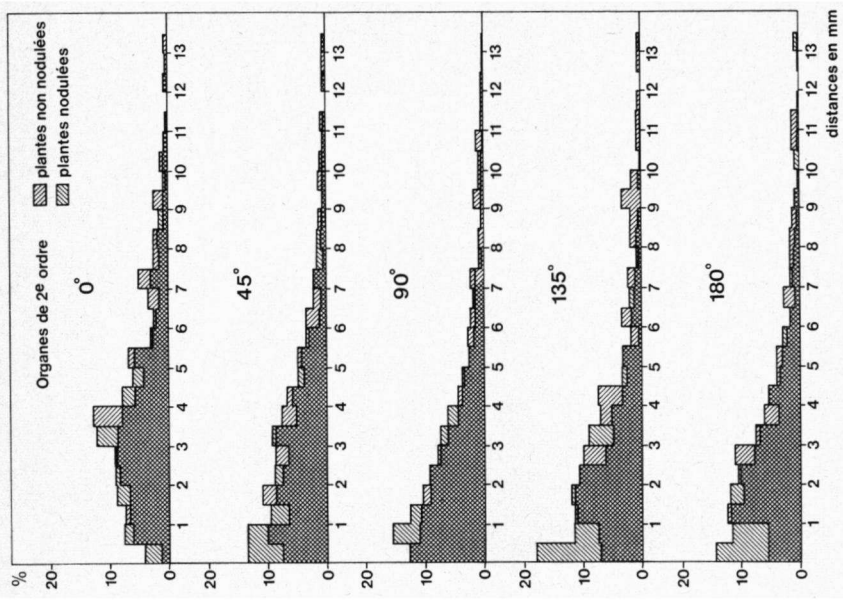

Fig. 20. Distribution des organes de deuxième ordre.

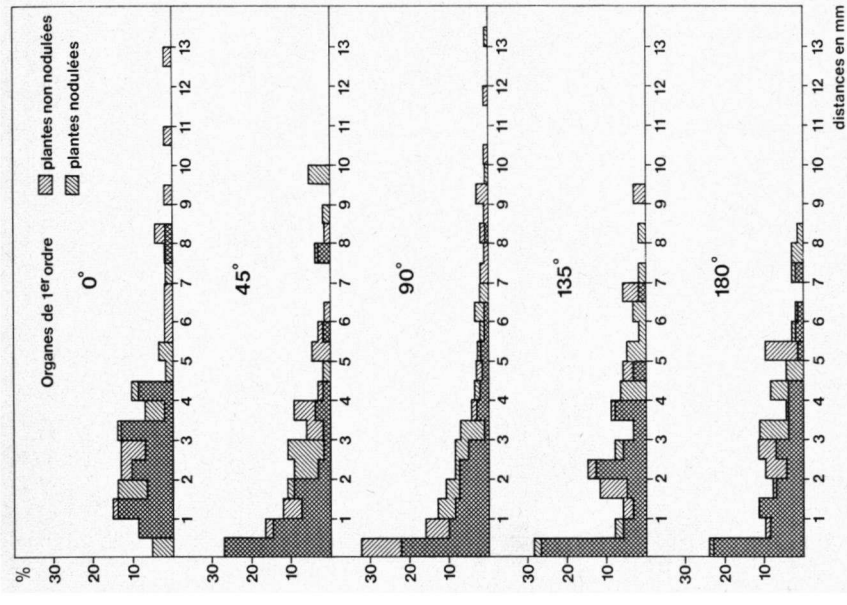

Fig. 19. Distribution des organes de premeir ordre.

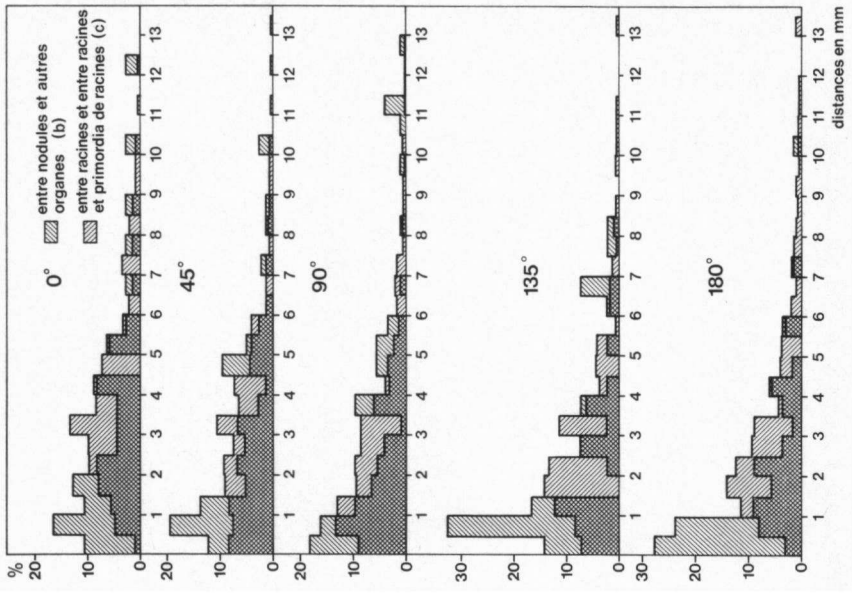

Fig. 22. Distribution des espaces *b* et *c* (matériel nodulé).

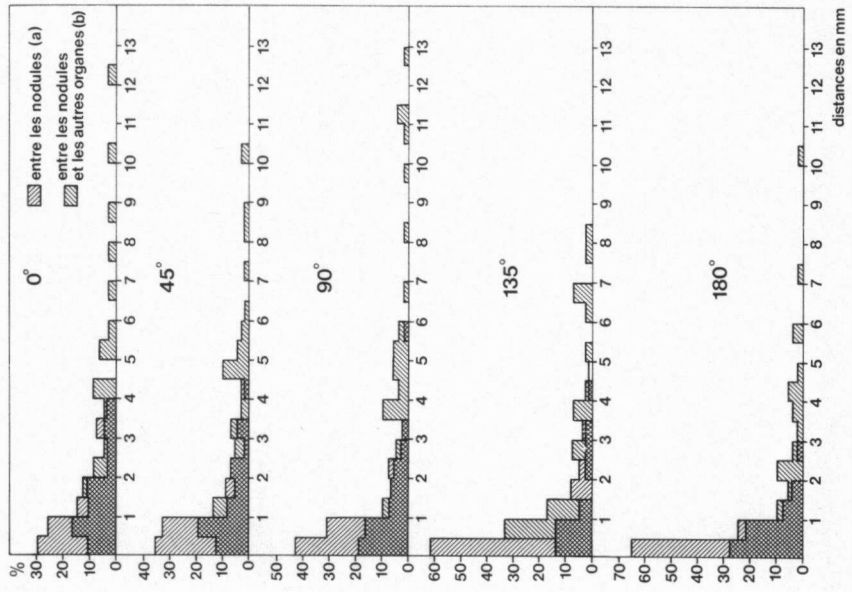

Fig. 21. Distribution des espaces *a* et *b* (matériel nodulé).

a, les espaces entre deux nodules successifs;
b, les espaces entre nodule et racine qui se succèdent;
c, les espaces entre deux racines ou entre racine et primorde qui se suivent.
Dans le matériel inoculé avec l'endophyte rendu inactif, nous ne trouverons évidemment que des espaces *c*. Les données obtenues sont représentées dans des histogrammes.

En premier lieu, nous ferons une analyse comparative de la distribution des organes de premier ordre et de deuxième ordre dans les deux groupes (*figs. 19* et *20*). Ces histogrammes montrent une différence entre les deux groupes, différence qui est plus accentuée pour les organes de deuxième ordre (voir en particulier les distances 0–1,5 mm). Pour essayer de trouver la cause de cette différence, nous analyserons la distribution des organes de deuxième ordre; ceux-ci, étant de loin plus nombreux que les organes de premier ordre, nous offrent une marge de sécurité plus grande pour le calcul des fréquences. La *figure 21* montre la distribution des espaces *a* et *b* et fait ressortir que les espaces *a* sont plus fréquents dans les valeurs de 0 à 1,0 mm pour tous les

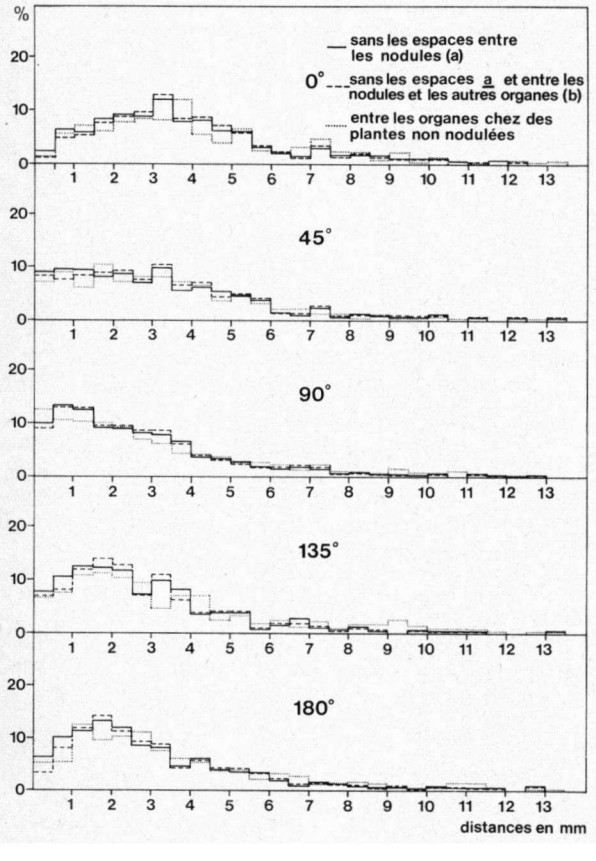

Fig. 23. Distribution des espaces *c* dans le matériel non nodulé et des espaces dans le matériel nodulé, soit sans tenir compte des espaces *a*, soit sans tenir compte des espaces *a* et *b*.

angles considérés; en comparaison avec les espaces *b*, la fréquence des espaces *a* est environ le double. La comparaison entre les espaces *b* et *c* (*fig. 22*) fait apparaître une différence moins accentuée et un peu plus étalée. Les espaces *b* sont plus fréquents que les espaces *c* dans les petites distances. Si, pour les angles de 90° et de 180°, cette différence est surtout remarquable dans les distances de 0 à 1,0 mm, pour les autres angles considérés, elle s'étend aux distances de 0 à 1,5 mm et même jusqu'à 2,0 mm dans le cas de 0°. Etant donné ces résultats, un dernier pas dans cette étude des fréquences simples s'impose: on compare la distribution des organes dans le matériel nodulé et non nodulé, d'une part, en ne tenant pas compte des espaces *a*, d'autre part, en ne tenant compte ni des espaces *a*, ni des espaces *b*.

La *figure 23* montre un certain parallélisme de la distribution des organes dans les deux groupes. Entre 0 et 5,0 mm persistent quelques différences que

Tableau 3. Fréquences cumulatives des espaces *a*, *b*, *b* + *c* et *c*.
Les valeurs immédiatement supérieures à 50 % sont représentées en caractères gras. En certains cas, afin de faciliter la comparaison, la valeur la plus proche de 50 % est imprimée en italique.

	distances / angles	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0 mm
a	0°	29,63	**55,56**	70,37	81,48	85,18	88,88	96,29	99,99
	45°	35,21	**67,60**	76,05	84,50	91,54	92,95	97,18	97,18	100,00
	90°	42,86	**73,63**	81,32	87,91	95,60	97,80	98,90	98,90	98,90
	135°	**61,36**	75,00	79,55	87,50	92,05	94,32	97,73	97,73	98,87
	180°	**64,79**	85,92	92,96	97,19	97,19	98,60	98,60	98,60	98,60
b	0°	10,42	27,09	37,51	**50,01**	58,34	62,51	66,68	70,85	79,18
	45°	12,25	31,69	45,58	**51,14**	58,08	63,64	70,58	73,36	74,75
	90°	18,48	34,78	44,56	**51,08**	56,51	60,86	61,95	71,73	74,99
	135°	13,95	46,51	**62,79**	62,79	65,12	72,10	74,43	81,41	83,74
	180°	27,78	**51,85**	61,11	66,67	75,93	79,63	81,48	85,18	90,74
b + *c*	0°	2,26	8,53	14,55	23,07	32,34	41,36	**53,64**	61,66	69,93
	45°	9,33	19,17	28,76	37,31	46,38	**53,63**	63,73	69,69	75,91
	90°	10,03	23,71	35,55	45,83	**55,11**	63,45	71,42	78,07	82,01
	135°	7,81	18,75	31,25	43,75	**55,73**	62,76	72,92	79,17	82,82
	180°	6,21	16,19	27,50	40,58	**52,55**	61,20	69,18	73,39	79,38
c nodulées	0°	1,14	5,98	11,39	19,37	28,77	38,46	**51,85**	60,40	69,23
	45°	8,60	16,24	24,84	34,08	43,63	**51,27**	62,10	68,79	76,11
	90°	9,23	22,77	35,90	45,44	**55,08**	63,80	72,42	78,78	82,78
	135°	7,04	15,25	27,27	41,35	**54,37**	61,41	72,55	78,71	82,52
	180°	3,27	11,33	22,92	37,03	*49,37*	**58,69**	67,51	71,79	77,84
c non nodulées	0°	1,29	7,20	14,40	20,83	29,06	38,06	*46,54*	**59,14**	64,80
	45°	7,33	17,22	23,45	34,07	41,40	*49,82*	**58,24**	65,57	72,16
	90°	12,69	23,62	34,28	44,67	**53,71**	61,13	67,34	71,79	76,11
	135°	6,91	14,18	25,09	36,36	*46,91*	**56,73**	61,46	68,37	75,64
	180°	5,37	10,74	22,98	32,53	42,68	**53,72**	61,18	67,15	72,52

nous essayerons de cerner de plus près par une étude des fréquences cumulatives.

Dans le *tableau 3* sont représentées les fréquences cumulatives des espaces *a*, *b*, *b* + *c* et *c*. On remarque que les espaces *a* dépassent les 50% de leur fréquence cumulative entre 0 et 1,0 mm de distance, et que les espaces *b* atteignent les 50% avant 2,0 mm. En ne tenant pas compte des espaces *a*, on observe que les espaces *c* et *b* + *c* dans le matériel nodulé atteignent les 50% entre 2,0 et 4,0 mm. Entre 0 et 3,0 mm, on constate, de façon presque constante (une seule exception), une fréquence plus élevée des espaces *b*+*c* que des espaces correspondants *c* (aussi bien dans le matériel nodulé que dans le matériel non nodulé), et que, pour les distances plus grandes, le parallélisme est constant. Le fait que les espaces *b* sont plus fréquents dans les petites distances n'est pas dû à un grand nombre de nodules par groupe (ce qui raccourcirait les distances entre les nodules extérieurs d'un groupe et les racines qui l'encadrent). Ceci ressort du *tableau 4* qui représente le nombre de nodules par groupe, le nombre de groupes et leurs fréquences. On observe que plus de 50% de la fréquence cumulative sont formés par des groupes de 1 et 2 nodules seulement.

Tableau 4. Nombre de nodules de deuxième ordre et leurs fréquences.

nombre de nodules par groupe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
nombre de groupes	56	35	24	32	12	7	3	4	2	2	1
fréquence simple	31,46	19,66	13,48	17,98	6,74	3,93	1,69	2,25	1,12	1,12	0,56
fréquence cumulative	31,46	51,12	64,60	82,58	89,32	93,25	94,94	97,19	98,31	99,43	100,00

Conclusion

De cette étude comparative entre matériel nodulé et non nodulé découle clairement que le mode de distribution des racines latérales, dans le matériel nodulé, n'est pas altéré par la nodulation. Le fait que le mode de distribution des nodules est complètement différent de celui des racines latérales confirme l'hypothèse de départ, c.-à-d. que les nodules sont des organes adventifs. Cette conclusion, ainsi que l'étude des espaces *b*, nous permet de réfuter la théorie des "foci" (NUTMAN 1948, 1949). Quoique cette théorie, identifiant les "foci" et les sites d'initiation des racines latérales, ait été élaborée pour des légumineuses, il était tentant de l'adapter aux non-légumineuses (QUISPEL 1954b, 1958). Selon Nutman, la distribution des espaces *b* devrait être à peu près égale à celle des espaces *c*, ce qui n'est pas le cas.

4.4.4. Sites d'apparition des nodules

4.4.4.1. *Introduction*

Afin de déterminer avec précision où se forment exactement les nodules et quels sont les endroits de la racine les plus favorables à la nodulation, nous avons suivi la croissance des racines et leur production de nodules.

4.4.4.2. *Techniques*

Outre la méthode de culture décrite (2.2.), le procédé suivant a été utilisé: 26 jours après la mise à germer, on transporte les plantules sur de la solution de Crone diluée de moitié, contenant du nitrate. Une semaine plus tard, on renouvelle la solution nutritive (dès ce moment, on cultive les plantes sur de la solution de Crone non diluée contenant 0,500 mg/l KNO_3 et 675 mg/l KCl, que l'on renouvelle une fois par semaine) et on inocule la moitié du matériel (2.3.), le reste servant de témoin. Deux jours plus tard, on rince avec de l'eau le système radiculaire des plantes inoculées. En s'inspirant de la technique utilisée par YORKE & SAGAR (1970), on place le système radiculaire des plantes sur du papier filtre entre deux plaques de verre, maintenues inclinées à 60° dans un support (*fig. 24*). Au préalable on a divisé chaque groupe, inoculé et non inoculé, en deux séries: dans l'une, on a conservé les systèmes radiculaires intacts, tandis que dans l'autre, on a dépouillé les plantes d'une grande partie ou de la totalité de leurs racines latérales de premier ordre. On photographie le système radiculaire de chaque plante trois fois: une première fois, le jour où l'on place les plantes entre plaques de verre, ensuite, deux et trois semaines plus tard. Pour chaque plante, on reproduit la photo de départ sur du papier transparent;

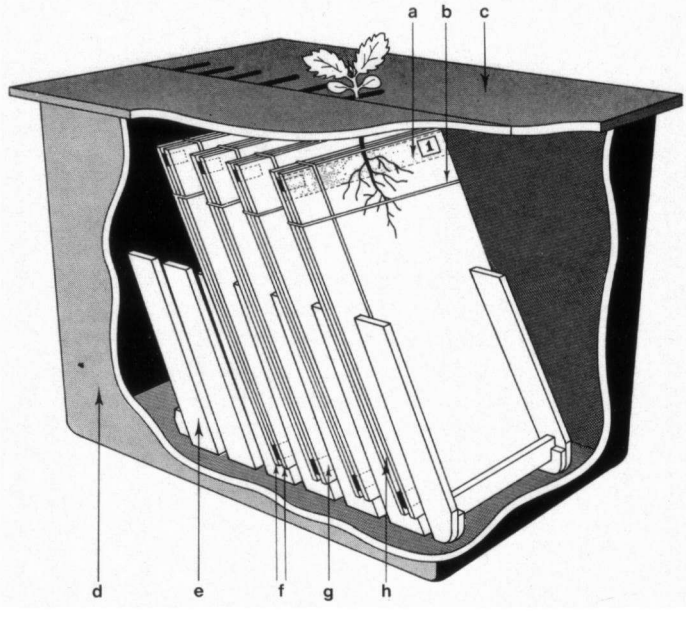

Fig. 24. Culture des systèmes radiculaires dans un plan: a) bande de plastique mince de ± 0,8 cm de large; b) élastique; c) couvercle; d) aquarium en matière plastique de 24,0 × 14,0 × 16,5 cm, recouvert de plastique autocollant noir; e) support en ICI Perspex (plaques acryliques de 0,5 cm d'épaisseur); f) plaques de verre de 14,8 × 12,2 × 0,2 cm, maintenues dans le support avec une inclinaison de 60°; g) carrés de verre de 0,9 mm d'épaisseur; h) papier filtre.

on complète ensuite ces calques au moyen des photos suivantes de façon à suivre la croissance des racines et les sites de nodulation.

4.4.4.3. *Résultats*

Dans chacune des deux séries, la comparaison entre matériel inoculé et non inoculé ne montre pas de différence nette dans la croissance des systèmes radiculaires. Dans le matériel inoculé, on peut observer que, sans aucune exception, les nodules se forment sur des portions de racines (*fig. 25* d, e, f et *fig. 26* d, f) ou à la base de racines latérales (*fig. 25* b, c, e, f et *fig. 26* b, c, d, e, f), tous sites encore invisibles sur la première photo.

Conclusion

Des résultats obtenus on peut conclure que les nodules se forment:

a) sur des racines présentes au moment de l'inoculation, en des endroits qui correspondraient à la zone d'allongement lors de l'inoculation;

b) sur des racines latérales pas encore visibles deux jours après l'inoculation, à leur base ou dans le voisinage immédiat de celle-ci; dans ces cas, il se pourrait que le primorde de latérale était déjà formé et qu'en se développant, il a rendu possible la croissance de l'endophyte et la formation du nodule.

Ces observations sont à mettre en rapport avec les difficultés que nous avons rencontrées dans nos tentatives de produire des infections localisées, en inoculant des racines à des endroits bien précis, de préférence entre deux racines latérales déjà bien développées. Malgré des essais répétés, nous n'avons jamais obtenu de formation de nodules.

5. EFFETS DES AUXINES ET DE LA KINÉTINE SUR LA FORMATION DES RACINES LATÉRALES ET SUR LA NODULATION

5.1. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons dû rejeter l'opinion que les nodules sont des racines latérales ordinaires tranformées. Afin de cerner de plus près le phénomène de la nodulation, nous tenterons de reproduire les réactions déclenchées par l'endophyte dans l'écorce en nous servant de substances stimulantes, dont nous pourrons déterminer le dosage et distinguer les effets.

Compte tenu des travaux sur l'induction de primordes adventifs à l'aide d'auxines (ZIMMERMAN & HITCHCOCK 1935, LEVAN 1939, WILDE 1951, GOLDACRE 1959), des expériences sur l'induction de primordes adventifs et leur développement en racines (BAUSÁ ALCALDE 1961), des recherches sur la nodulation de l'aulne en présence d'AIA (PIZELLE 1970) et de la constatation d'une teneur en auxine plus élevée dans les nodules que dans les racines (DULLAART 1970), nous sommes amenés à nous poser les questions suivantes. Quelles phytohormones peuvent produire des primordes adventifs dont l'ontogénie serait comparable à celle des nodules? De quelle manière l'administration de phytohormones peut-elle influencer la nodulation? Quelles phytohormones produisent, dans l'écorce de la racine, les divisions cellulaires qui précèdent

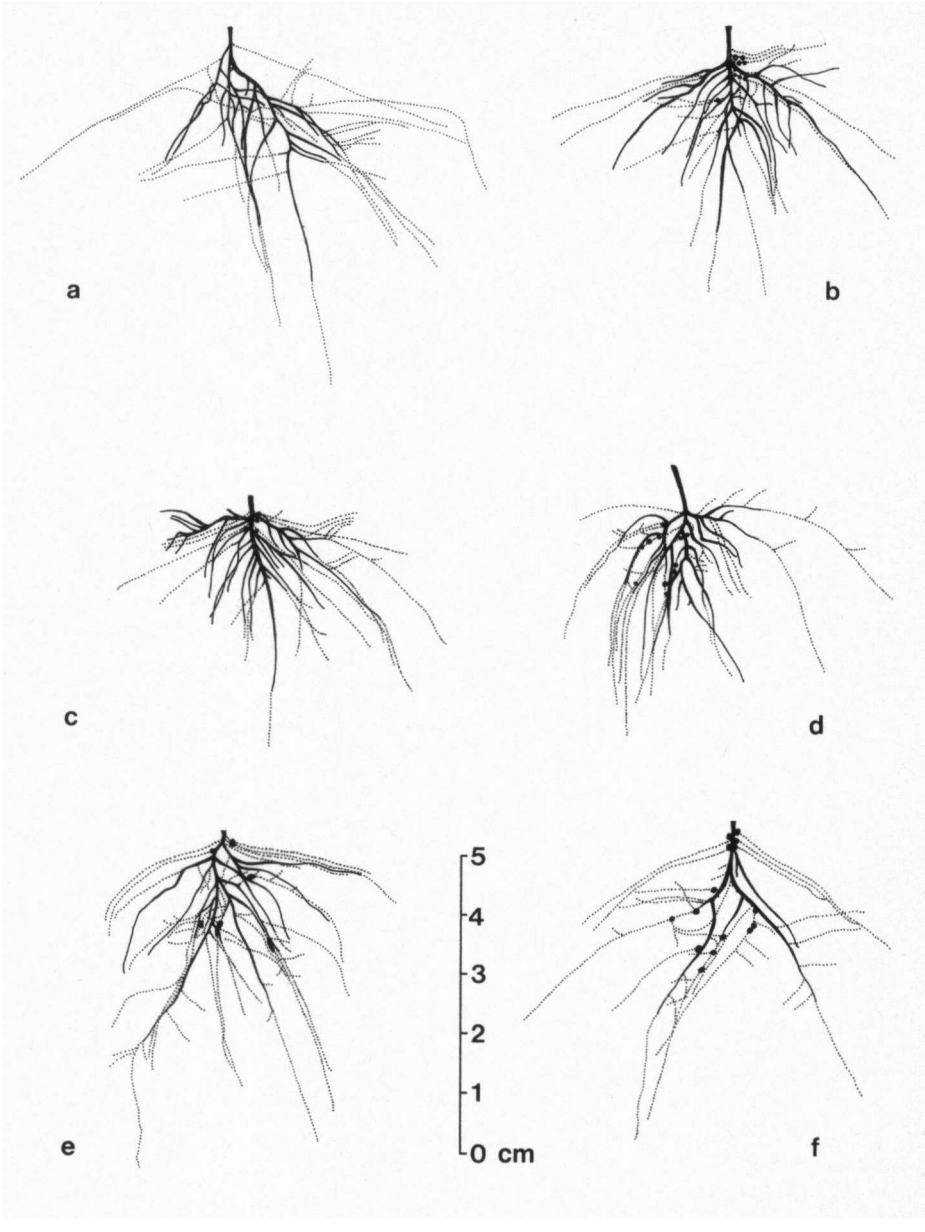

Fig. 25. Sites de nodulation dans des plantes à système radiculaire intact: a: témoin non inoculé; b, c, d, e, f: plantes inoculées. Trait plein: racines le jour de la première photo; pointillé: croissance des racines observée jusque 3 semaines après l'inoculation. Les nodules sont représentés par un gros point noir.

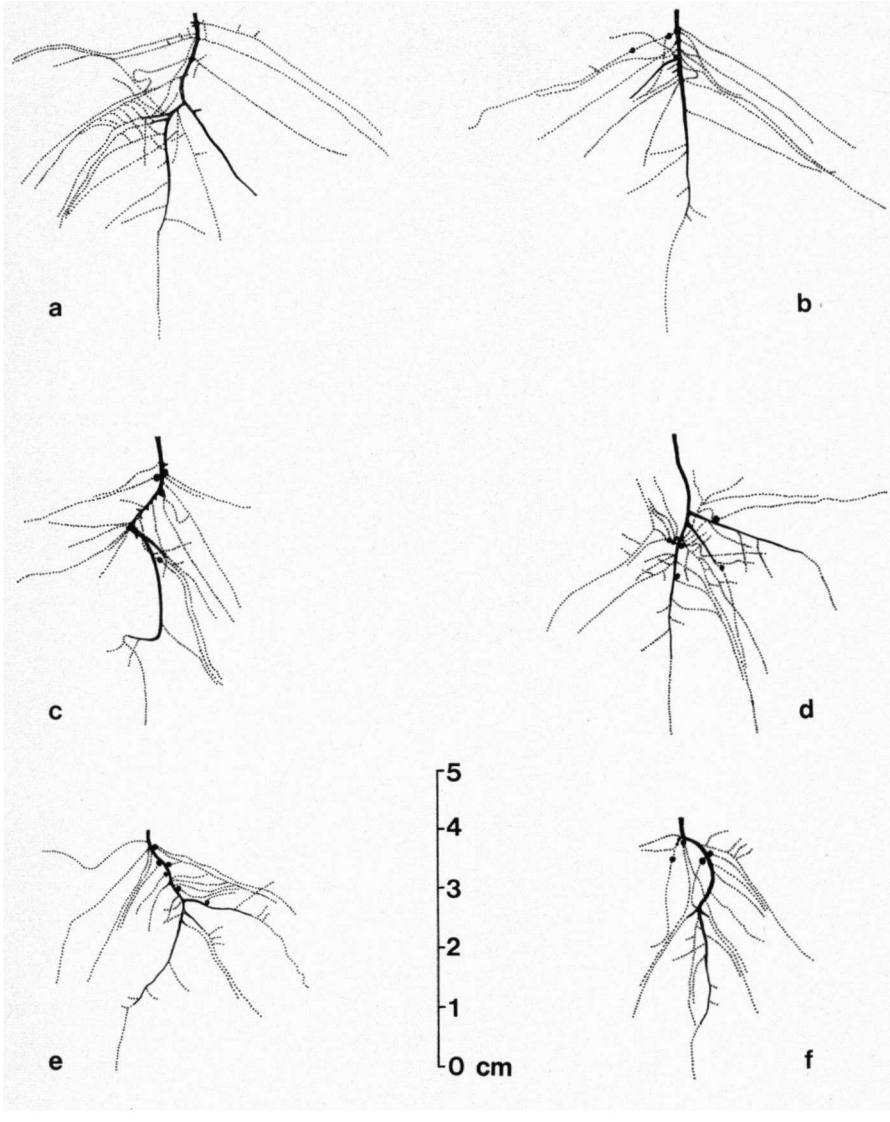

Fig. 26. Sites de nodulation dans des plantes à système radiculaire mutilé: a: témoin non inoculé; b, c, d, e, f: plantes inoculées. Trait plein: racines le jour de la première photo; pointillé: croissance des racines observée jusque 3 semaines après l'inoculation. Les nodules sont représentés par un gros point noir.

l'installation de l'endophyte? Quelles phytohormones peuvent provoquer, dans le péricycle, la réaction de la plante qui précède la formation du nodule?

Afin d'éviter des problèmes avec une dégradation trop rapide de l'acide indolylacétique (AIA), nous avons utilisé d'abord une auxine synthétique fort active et très stable, l'acide 2,4-dichlorophénoxy-acétique (2,4-D). En outre, nous avons utilisé comme auxines, l'acide indolyl-butyrique (AIB) et l'acide naphtalène-acétique (ANA) et, comme cytokinine, la kinétine.

5.2. Matériel et techniques

Dans les expériences avec des plantes intactes, nous avons employé les techniques suivantes: méthode de culture (2.2.3.b), administration pe phytohormones comme indiquée dans chaque paragraphe, méthode de fixation (2.4.1.), coloration avec le réactif de Schiff (2.4.3.) et éclaircissement (2.6.).

Dans les expériences avec des explantats, nous avons procédé comme suit: méthode de culure (2.2.3.a.), solution nutritive pour explantats (TORREY 1961, LIBBENGA et al. 1973), mais sans agar, et en l'utilisant soit pure, soit additionnée d'AIA 10^{-6} M ou AIB 10^{-6} M ou kinétine 10^{-6} M ou AIB 5.10^{-7} M additionné de kinétine 5.10^{-7} M. On récolte des échantillons 3, 7 et 14 jours après la date de mise en culture.

Au niveau des 2 mm apicaux des racines, on prélève des explantats d'une longueur de 1 mm. Pour l'ensemencement, on se sert de boîtes de Pétri de 40 × 11 mm, contenant un demi-cercle de papier filtre, stérilisées à l'étuve à 120°C pendant ± 14 heures. Après y avoir mis 0,5 ml de la solution nutritive, on dépose l'explantat sur le papier à proximité de son diamètre. Ou garde les boîtes, inclinées à 10°, à l'obscurité dans une enceinte dont la température est réglée à 25°C.

A chaque récolte, on observe le matériel au stéréomicroscope et, après fixation (2.4.1.), inclusion et coupe (2.5.2.; coupes de 3 μm), au microscope photonique. Pour la comparaison entre les divers traitements, on a fait une analyse de variance (LISON 1958).

5.3. Résultats

5.3.1. Effects de 2,4-D, de kinétine et de 2,4-D + kinétine sur le systéme radiculaire intact

En premier lieu, afin de répondre aux questions posées plus haut, nous essayerons d'étudier l'effet des agents inducteurs de primordes sur les racines.

Pour ce faire, nous avons utilisé des plantules de cinq semaines, que nous avons réparties en 4 groupes pour les soumettre aux traitements suivants:

groupe 1, témoin, solution de Crone;

groupe 2, solution de Crone et 2,4-D 10^{-6} M;

groupe 3, solution de Crone et kinétine 10^{-6} M;

groupe 4, solution de Crone, kinétine 5.10^{-7} M et 2,4-D 5.10^{-7} M.

Huit jours après le début du traitement, les plantes ont été fixées, colorées et éclaircies. On a fait les comptages sur 10 plantes de chaque groupe.

Les moyennes et les déviations standard des nombres totaux de racines laté-

rales et primordes trouvés par groupe de 10 plantes sont représentées dans le *tableau 5*.

Tableau 5. Nombre moyen et déviation standard des racines latérales et des primordes par 10 plantes.

		témoins	2,4-D	kinétine	kin. + 2,4-D
1er Ordre	$\bar{x}$	19,5	41,9	21,6	22,1
	s	2,42	15,09	3,77	4,63
2e Ordre	$\bar{x}$	75,9	232,2	90,4	100,3
	s	13,88	93,17	21,96	38,49

Notre hypothèse nulle étant que les quatre groupes ne diffèrent pas entre eux, c.-à-d. qu'ils font partie d'une même population, nous avons fait une analyse de variance avec les résultats suivants, pour 3 et 36 degrés de liberté,
a) pour les organes de premier ordre, $F = 16{,}31$,
b) pour les organes de deuxième ordre, $F = 19{,}33$,
valeurs qui correspondent l'une et l'autre à des différences hautement significatives.

Afin de déceler où se trouve la source de ces différences, nous posons comme hypothèse alternative, que 3 groupes possèdent une moyenne hypothétique identique que l'on compare avec celle du quatrième groupe. On examine d'abord les groupes 1 (témoin), 3 (kinétine) et 4 (kinétine + 2,4-D). On obtient:
a) pour les organes de premier ordre, $F = 1{,}38$,
b) pour les organes de deuxième ordre, $F = 2{,}10$,
valeurs, qui, pour 2 et 27 degrés de liberté, correspondent à des différences non significatives, et de ce fait, nous pouvons considérer les groupes 1, 3 et 4 comme appartenant à une même population.

La comparaison de ces trois groupes avec celui traité à l'auxine synthétique 2,4-D nous livre les valeurs suivantes de F:
a) pour les organes de premier ordre, $F = 50{,}27$,
b) pour les organes de deuxième ordre, $F = 58{,}23$,
valeurs qui, pour 1 et 38 degrés de liberté, correspondent toutes deux à des différences hautement significatives.

Conclusion

De ces résultats on peut conclure que les plantes traitées pendant huit jours soit avec la kinétine, soit avec la kinétine et le 2,4-D, ne diffèrent pas significativement des plantes témoins, cultivées dans la même solution nutritive en l'absence de phytohormones.

Par contre, les plantes traitées avec le 2,4-D montrent une différence hautement significative par rapport aux autres groupes, différence consistant en une augmentation nette du nombre de racines latérales et surtout de primordes;

en effet, lors d'une analyse ultérieure portant séparément sur les nombres de racines latérales et de primordes, il est apparu que le nombre de primordes prédomine de loin et qu'il est surtout responsable de cette différence.

5.3.2. Effets combinés des phytohormones 2,4-D et kinétine, et de l'inoculum
Pour étudier l'effet de l'administration simultanée des phytohormones 2,4-D et kinétine, et de l'endophyte, nous avons pris en considération huit groupes de plantes. Toutes les plantes ont été cultivées dans de la solution de Crone. Quatre groupes ont été inoculés, l'un servant de témoin, le deuxième recevant 2,4-D (10^{-6} M), le troisième kinétine (10^{-6} M) et le quatrième un mélange de 2,4-D et kinétine (5.10^{-7} M de chaque phytohormone). Les quatre autres groupes, qui n'ont pas été inoculés, ont servi comme contrôle de chacun des groupes précédents. Après huit jours de traitement, on a cultivé, pendant deux semaines, les plantes dans de la solution de Crone que l'on a renouvelée le quinzième jour après le début de l'expérience.

Trois semaines après de début de l'expérience, les effets des divers traitements étaient visibles à l'oeil nu (Cfr. paragraphe suivant).

Nous avons jugé inutile de procéder aux comptages et aux analyses statistiques étant donné que sur le matériel traité avec les phytohormones et inoculé ne se sont pas formés de nodules, alors qu'ils étaient facilement reconnaissables sur les témoins inoculés. Nous avons pu déceler quelques cellules contenant des vésicules dans les plantes traitées par le 2,4-D, mais aucune dans celles traitées par la kinétine.

5.3.3. Effets qualitatifs de l'administration de 2,4-D et de kinétine
Le matériel non inoculé obtenu à la fin de l'expérience précédente nous a permis de faire des observations, résumées dans la *figure 27*, concernant les effets qualitatifs des différentes hormones utilisées. La constatation, peut-être la plus importante, a été le rabougrissement des racines dans les plantes traitées par le 2,4-D. Après coloration avec le réactif de Schiff et éclaircissement, nous avons pu observer que, dans les gonflements des racines soumises à l'effet de la kinétine, il n'y a pas de divisions cellulaires, tandis que celles-ci étaient nettement visibles dans le matériel traité par le 2,4-D. Il est intéressant de comparer les effets du mélange 2,4-D et kinétine avec certains nodules de la *fig. 15* car la forme est fort semblable dans les deux cas. Il faut aussi remarquer que RODRIGUEZ-BARRUECO & BERMUDEZ DE CASTRO (1973) ont obtenu des pseudonodules à l'aide de kinétine mais les concentrations employées par eux étaient 2,8 et 5,6 fois plus élevées que celles utilisées par nous.

5.3.4. Comparaison de l'effet de différentes auxines sur le système radiculaire
Les résultats obtenus avec l'utilisation de 2,4-D nous ont obligé à essayer d'autres auxines que l'auxine synthétique qui, tout en étant très active à la concentration utilisée pour les comparaisons, entraîne un freinage de la croissance des racines et inhibe la nodulation. Nous avons procédé comme suit: nous avons réparti des plantules de six semaines en six groupes: tous ont été cultivés dans

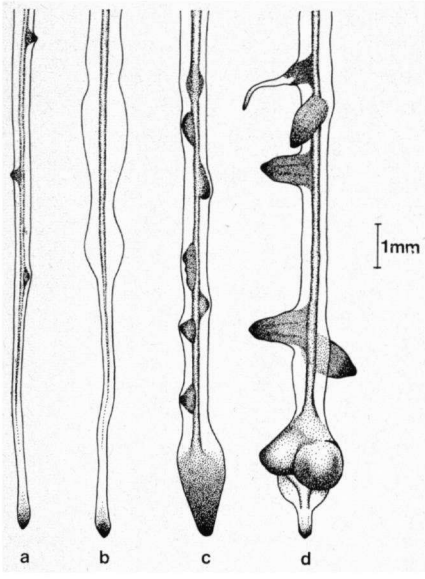

Fig. 27. Effets qualitatifs de 2,4-D et de kinétine: a: matériel témoin, non traité aux hormones; b: matériel traité par la kinétine; c: matériel traité par le 2,4-D; d: matériel traité par le 2,4-D et la kinétine.

de la solution de Crone, et, à l'exception du groupe témoin, ils ont reçu un traitement hormonal:

a) AIB 10^{-6} M pendant trois jours;
b) ANA 10^{-6} M pendant trois jours;
c) 2,4-D 10^{-6} M pendant trois jours;
d) kinétine 10^{-6} M pendant trois jours;
e) AIB 10^{-6} M pendant trois jours, ensuite kinétine 10^{-6} M pendant trois jours.

Après le traitement par les phytohormones, tous les groupes ont été cultivés dans de la solution de Crone exclusivement, que l'on a renouvelée tous les huit jours jusqu'à la fin de l'expérience. Dix-huit jours après le début de l'expérience, le matériel a été fixé, coloré et éclairci, après quoi on a procédé aux comptages et aux analyses. Le *tableau 6* donne le nombre moyen et la déviation standard des racines latérales et des primordes de deuxième ordre par 5 plantes.

Tableau 6. Nombre moyen et déviation standard des racines latérales et des primordes de deuxième ordre par 5 plantes.

	témoins	2,4-D	ANA	AIB	AIB + kinétine	kinétine
$\bar{x}$	207,6	226,0	297,2	487,2	336,0	183,8
s	56,82	90,63	103,70	177,53	60,58	46,01

La vérification de l'hypothèse nulle (les échantillons appartiennent à une même population) nous a fourni une valeur F = 6,37 qui, pour 5 et 25 degrés

de liberté, correspond à une différence significative. Avant de passer à la vérification de l'hypothèse alternative (la moyenne d'un ou de plusieurs échantillons diffère significativement des moyennes des autres échantillons), nous avons comparé chaque échantillon avec l'échantillon témoin, ce qui nous a donné les résultats suivants (avec, dans chaque cas, 1 et 8 degrés de liberté):
témoins et plantes traitées avec 2,4-D, $F = 0{,}15$;
témoins et plantes traitées avec ANA, $F = 2{,}87$;
témoins et plantes traitées avec kinétine, $F = 0{,}53$;
témoins et plantes traitées avec AIB, $F = 11{,}25$;
témoins et plantes traitées avec AIB et kinétine, $F = 11{,}95$.
Les trois premières valeurs de F correspondent à des différences non significatives, les deux dernières à des différences hautement significatives.

Ensuite, l'analyse de variance a livré pour les comparaisons:
a) entre les échantillons témoin, + 2,4-D, + ANA et + kinétine, une valeur $F = 1{,}96$ qui, pour 3 et 16 degrés de liberté, correspond à une différence non significative;
b) entre les échantillons + AIB, et + AIB et kinétine, une valeur $F = 3{,}25$ qui, pour 1 et 8 degrés de liberté, correspond, elle aussi, à une différence non significative.

Après avoir décelé ainsi les sources des différences entre les échantillons, nous vérifierons l'hypothèse alternative en comparant d'une part, les échantillons témoin et ceux traités avec 2,4-D, ANA et kinétine avec, d'autre part, les échantillons traités avec AIB et le mélange AIB et kinétine. L'analyse de variance entre les deux blocs d'échantillons ainsi formés a fourni une valeur $F = 18{,}87$ qui, pour 1 et 28 degrés de liberté, correspond à une différence hautement significative.

Conclusion

L'action d'AIB est fort différente de celle des autres phytohormones administrées quant au nombre de racines latérales et de primordes induits, et n'est pas accompagnée des effets secondaires observés dans les traitements avec 2,4-D.

Les effets de 2,4-D, dans les cultures de plus de 8 jours, peuvent s'expliquer par le fait que cette auxine se dégrade lentement et continue à exercer ses effets après l'épuisement de la plante dû à l'induction massive de primordes, avec comme conséquence un freinage brusque du développement et un rabougrissement des racines. Par contre, les auxines indoliques se dégradent assez rapidement et, après avoir subi leur influence, les plantes peuvent récupérer et reprendre leur développement normal (KLÄMBT 1961; VAN OVERBEEK 1964).

5.3.5. Administration de AIB et nodulation

Comme l'AIB favorise l'apparition et le développement des racines latérales, nous nous proposons de vérifier si l'administration combinée de l'inoculum et de l'auxine accroît de manière considérable le nombre de nodules.

Nous avons réparti des plantes âgées de six semaines en trois groupes, tous cultivés dans de la solution de Crone et inoculés le même jour avec une quantité

égale de broyat de nodules. L'inoculation a été faite ainsi:
a) les plantes reçoivent le broyat de nodules seulement;
b) les plantes reçoivent simultanément l'inoculum et AIB 10^{-6} M;
c) les plantes ont eu leur solution nutritive additionnée d'AIB jusqu'à une concentration de 10^{-6} M pendant 48 heures, après quoi on a renouvelé la solution nutritive à laquelle on a ajouté l'inoculum.

Deux jours après l'inoculation, on a rincé le système radiculaire de toutes les plantes et on a renouvelé la solution nutritive, laquelle a été, par la suite, renouvelée 8 et 15 jours après l'inoculation.

Trois semaines après le jour de l'inoculation, les systèmes radiculaires ont été fixés, colorés et éclaircis; ensuite on a procédé aux comptages et aux analyses statistiques des nodules trouvés dans des échantillons de 10 plantes par chaque groupe. Les résultats des comptages des nodules de deuxième ordre sont représentés dans *le tableau 7* (moyennes et déviation standard).

Tableau 7. Nombre moyen et déviation standard des nodules de deuxième ordre par 10 plantes.
AIB + inoculum: les plantes ont reçu en même temps AIB et l'inoculum;
AIB → inoculum: les plantes ont reçu AIB pendant deux jours avant d'être inoculées.

	inoculum seul	AIB + inoculum	AIB → inoculum
$\bar{x}$	17,2	19,7	26,9
s	4,85	11,09	14,86

L'analyse de variance de ces 3 groupes nous a fourni une valeur $F = 2{,}07$ qui, pour 2 et 27 degrés de liberté, correspond à une différence non significative.

La comparaison entre l'échantillon qui a reçu l'inoculum exclusivement, et celui qui l'a reçu après traitement préalable pendant 48 heures avec l'AIB, a fourni une valeur $F = 3{,}85$ qui, pour 1 et 18 degrés de liberté, correspond également à une différence non significative.

Conclusion

Les résultats obtenus suggèrent que la légère augmentation du nombre de nodules dans les deux cas traités par l'auxine est due à une sorte de préparation par l'AIB d'un plus grand nombre de sites favorables à la nodulation. La différence avec le groupe témoin (non traité par l'AIB) n'est cependant pas significative; peut-être les échantillons étudiés étaient-ils trop petits. D'autre part, l'infection provoquée dans l'écorce produirait suffisamment de phytohormones pour induire des nodules. Lors de l'administration simultanée de l'inoculum et de 2,4-D, on assisterait à un trouble important du gradient hormonal dans la plante avec, comme conséquence, l'inhibition de la nodulation.

5.3.6. Effets des différentes phytohormones sur les explantats

En nous basant sur les résultats obtenus plus haut (4.3.4.3.) et en tenant compte des effets produits par les phytohormones sur le système radiculaire intact, nous

avons entrepris des expériences avec des explantats afin d'imiter, dans les zones de la racine propices à la nodulation, l'induction des divisions cellulaires dans l'écorce (qui précèdent immédiatement l'invasion par l'endophyte) et la formation des nodules dans le péricycle.

Si, dans les coupes du matériel traité avec la kinétine, l'on a pu déceler dans l'écorce des cellules hypertrophiées, responsables des gonflements observés au microscope stéréoscopique, par contre, dans le matériel traité avec des auxines, nous n'avons pas pu observer les divisions cellulaires attendues. Il faut aussi signaler que, dans aucun explantat, on n'a observé de croissance en longueur.

Conclusion

Sur la base des résultats négatifs obtenus, nous pouvons conclure soit que la concentration utilisée de phytohormones n'est pas favorable à la culture d'explantats de racines d'aulne, soit que le milieu nutritif employé ne répond pas aux exigences des explantats, soit que la longueur des explantats (1 mm) n'est pas propice aux expériences (PECKET 1957), soit que les tannins présents dans les explantats ont bloqué l'action des auxines (WETMORE & MOREL 1949). Dans des recherches ultérieures, nous essayerons de tester les éventualités citées.

6. RÉDUCTION DU TÉTRAZOLIUM PAR LES NODULES JEUNES

6.1. Introduction

De nombreux auteurs, depuis DINGER (1895) jusqu'à AKKERMANS (1971), ont établi que les nodules symbiotiques qui se forment sur les racines de l'aulne, sont responsables de la fixation de l'azote atmosphérique. A l'aide de la réduction du tétrazolium, Akkermans a démontré que les vésicules sont les principaux centres réducteurs dans le nodule; ayant constaté par après que le tétrazolium est un puissant inhibiteur de la réduction d'acétylène tandis que du formazan est formé sur les vésicules, il a suggéré que la fixation d'azote est localisée, elle aussi, dans les vésicules. Dès lors, il nous a semblé intéressant de déterminer si, dans les stades initiaux de l'infection, au moment où les premières vésicules se forment, une réduction d'azote est possible.

6.2. Matériel et techniques

Dans une première série d'expériences, on a récolté des nodules tous les jours, à partir du onzième jour jusqu'à la quatrième semaine après l'inoculation. Le matériel ainsi récolté a été coupé à main levée et les coupes ont été plongées, pendant 45 minutes, soit dans une solution aqueuse à 1 mg/ml de chlorure de néo-tétrazolium (NT Michrome n° 817 Ed. Gurr. London), soit dans une solution aqueuse à 1 mg/ml de tétranitro-tétrazolium (TNBT n° T-4000 Sigma Chemicals Co., St. Louis, Miss.).

Dans une seconde série d'expériences, on a procédé ainsi: on a récolté des nodules 17 jours, 5 semaines et 13 semaines après l'inoculation. On les a plongés dans une solution aqueuse de TNBT à 0,25 mg/ml, dans laquelle on a fait barboter au préalable de l'hydrogène pendant quelques minutes; les nodules,

une fois immergés, ont été scindés à l'aide d'un scalpel; après une immersion de 45 minutes, le matériel a été fixé, inclus et coupé au microtome (2.4.).

6.3. Résultats

Dans le matériel coupé à main levée, on a observé des cristaux de formazan pour la première fois 4 semaines après l'inoculation, sur les vésicules dans un secteur de la coupe correspondant à l'écorce du nodule primaire, à un moment où l'on assistait déjà à la formation du nodule proprement dit dans le voisinage. Dans le matériel scindé sous immersion dans la solution "anaérobe" de tétrazolium, on a observé que:

a) les nodules de 17 jours contiennent (dans le domaine du nodule primaire) beaucoup d'hyphes pelotonnés et relativement peu de vésicules; on a pu déceler des cristaux de formazan sur les vésicules présentes dans les 3 premières couches cellulaires à partir de la surface de scission (*fig. 28*);

b) les nodules de 5 semaines contiennent, par rapport aux précédents, beaucoup plus de vésicules; on y a trouvé aussi beaucoup plus de cristaux de formazan, et ce, presque exclusivement sur les vésicules;

c) dans les nodules de 13 semaines, la réduction de tétrazolium sur les vésicules est encore plus importante, mais on a pu voir également des cristaux dans des hyphes un peu épaissis ainsi que dans quelques cellules contenant des granules (*figs. 29* et *30*).

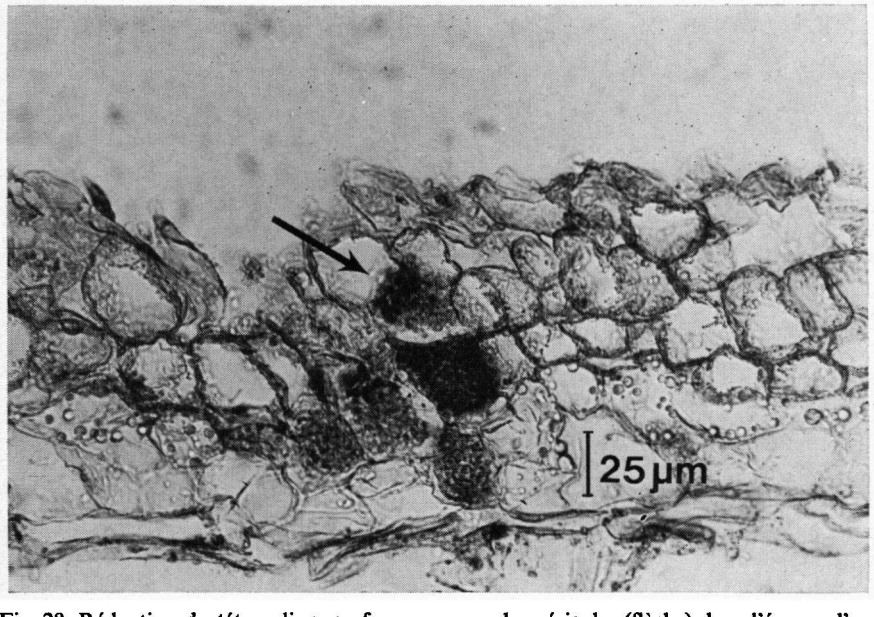

Fig. 28. Réduction du tétrazolium en formazan sur des vésicules (flèche) dans l'écorce d'une racine 17 jours après l'inoculation.

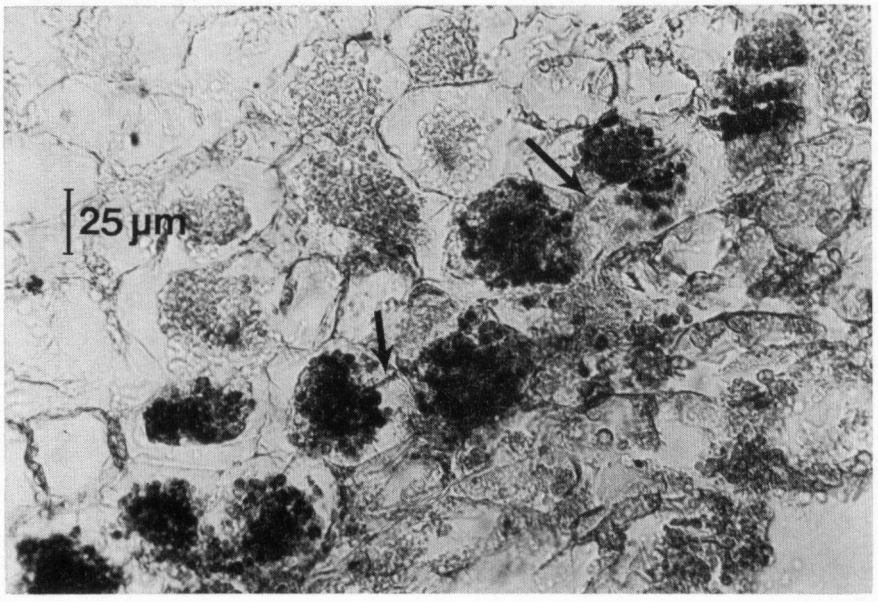

Fig. 29. Réduction du tétrazolium sur des hyphes (flèches) dans un nodule 13 semaines après l'inoculation.

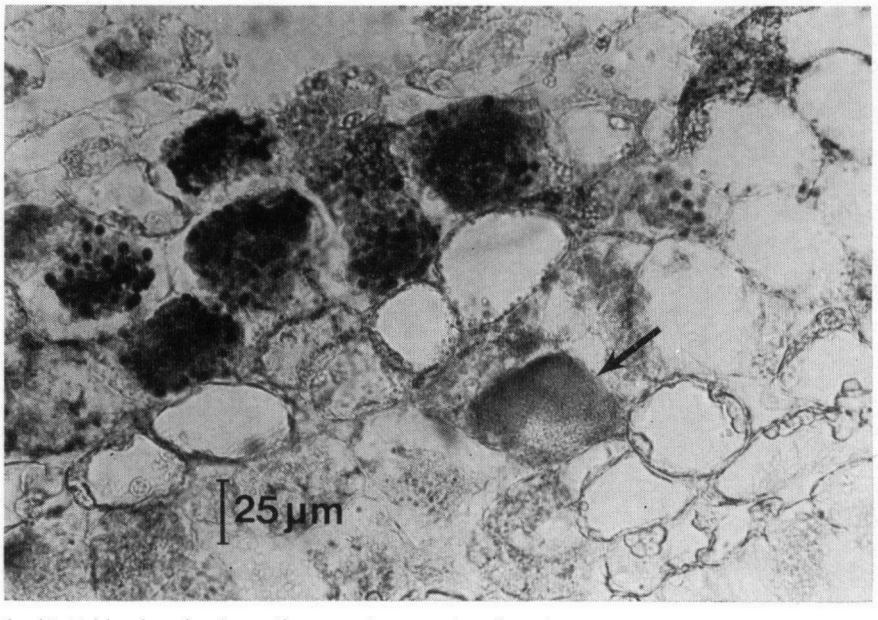

Fig. 30. Réduction du tétrazolium sur des granules (flèche) dans un nodule 13 semaines après l'inoculation.

Conclusion

Comme on pouvait s'y attendre, le pouvoir réducteur des tissus nodulaires augmente avec l'âge. Cependant, dans des nodules jeunes, qui ne comportent que de l'endophyte en phase d'invasion et d'installation (c.-à-d. principalement des hyphes très fins et quelques vésicules, probablement de formation récente), on a observé une réduction de tétrazolium. Ceci suggère que des stades jeunes de l'infection, ne comportant que quelques vésicules, sont déjà à même de réduire l'azote atmosphérique. Si nos expériences confirment celles d'AKKERMANS (1971), à savoir que les vésicules sont les principaux porteurs d'enzymes réductrices, il faut cependant remarquer que la capacité de réduire le tétrazolium présente un caractère relatif. Dans des conditions de forte anaérobie, tous les stades de l'endophyte présentent des propriétés réductrices, tandis que dans des conditions de faible anaérobie, seules les vésicules les manifestent. Le gradient des réductases, maximal dans les vésicules, diminuerait progressivement dans les hyphes et serait minimal dans les granules.

7. DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Des études sur la morphogénèse du nodule fixateur d'azote chez *Alnus glutinosa*, il ressort que ce processus se déroule en deux phases successives bien distinctes: la première comporte la pénétration et l'installation de l'endophyte dans l'écorce de la racine, c.-à-d. le développement du nodule primaire; la seconde consiste en l'induction d'un primorde et la formation du nodule proprement dit, c.-à-d. d'une organe morphologiquement analogue à une racine latérale, mais avec une écorce zonée quant à la distribution des différentes formes de l'endophyte. Il faut remarquer que la première phase de ce processus n'est pas nécessairement suivie de la seconde.

Certaines de nos observations sont conformes à celles de POMMER (1956): nous avons en effet observé également des cellules en mitose dans l'écorce avant même qu'elles n'aient été en contact direct avec l'endophyte, ainsi que la production d'amidon dans la région infectée. D'autres aspects sont en contradiction avec la description de cet auteur. Le "périderme" de Pommer entourant la région de l'écorce envahie par l'endophyte et considéré par lui comme se trouvant en continuité avec la partie du péricycle située du côté opposé à la zone d'infection, consiste, d'après nous, en une barrière de tannin qui circonscrit toute la zone infectée et est reliée à l'endoderme de la racine.

Contrairement à TAUBERT (1956), nous n'avons pas constaté une tendance de l'endophyte à s'installer à proximité de l'endoderme, aussi près que possible des pointes xylémiennes, tendance basée, d'après cet auteur, sur un tropisme chimique. En revanche, nous souscrivons entièrement à son assertion selon laquelle le nodule, en tant qu'unité anatomo-physiologique, se forme exclusivement à partir de son propre primorde. Ceci est en contradiction avec l'explication avancée par Pommer qui fait intervenir l'écorce infectée de la racine porteuse (nodule primaire) dans la formation du nodule (nodule proprement dit). Ces deux auteurs sont aussi en désaccord entre eux sur le rôle joué par le "périder-

me" (Pommer) ou "barrière de tannin" (Taubert). D'après nous, l'interprétation du premier est tout à fait valable lorsqu'il s'agit du nodule primaire, car alors ce "périderme" sépare nettement les zones infectée et non infectée de l'écorce. Les difficultés surgissent lorsque Pommer inclut dans le domaine délimité par le "périderme", le primorde du nodule proprement dit. Taubert, au contraire, signale qu'à ce stade, la barrière de tannin sépare le "tissu primaire" (écorce infectée de la racine porteuse) du "tissu secondaire" (primorde du nodule proprement dit).

Nous avons observé que le primorde de nodule se développe sur les bords des régions de l'écorce envahies par l'endophyte (nodule primaire). Il est difficile de distinguer s'il pousse à l'intérieur ou à l'extérieur de la barrière de tannin. Cette complication est due au fait que, à notre avis, sous la poussée du primorde dont l'origine se trouve dans le péricycle, l'endoderme "s'étire" et le recouvre d'une sorte de capuchon aussi longtemps qu'il est inclus entièrement dans l'écorce. Il s'ensuit forcément que d'un côté du primorde vont se confondre la "barrière de tannin" ("périderme") et le capuchon d'origine endodermique. Lorsque le primorde a presque atteint les couches externes de l'écorce de la racine porteuse, la zone où se confondent "barrière de tannin" et capuchon perd de sa coloration, de sorte que l'on pourrait croire qu'elle n'existe pas (ou qu'elle n'a pas existé).

Si cette question de l'origine du primorde à l'intérieur ou à l'extérieur de la barrière de tannin reste ouverte, il est évident, par contre, que le primorde qui deviendra un nodule après sa colonisation par l'endophyte, montre une tendance nette à éviter la zone infectée (nodule primaire) en se recourbant même vers les régions saines de l'écorce (*fig. 12*). Taubert décrit que l'écorce infectée réagit en repoussant le primorde vers la périphérie de la zone contenant l'endophyte. En aucun cas, nous n'avons vu des primordes "comprimer" la zone infectée contrairement à ce qu'a décrit Pommer.

Une source des divergences entre ces deux auteurs réside probablement dans leur manière d'aborder le problème. Les observations de Taubert s'étalent du troisième au vingt-septième jour après l'inoculation, tandis que Pommer a basé son étude sur du matériel récolté trois à quatre semaines après l'inoculation, lorsque les premières ébauches de nodules sont visibles à l'oeil nu, ce qui, d'après nos expériences, est un stade déjà fort avancé de la nodulation.

Pommer et Taubert ont suggéré, mais pas prouvé, la possibilité d'une induction par l'endophyte de primordes qui deviendraient des nodules. Cette hypothèse, nous avons pu la vérifier. Grâce à l'étude du mode de distribution des racines latérales dans le matériel nodulé et non nodulé, et à la comparaison avec le mode de distribution des nodules, nous sommes arrivés à la conclusion que les nodules sont des organes adventifs, c.-à-d. qu'ils apparaissent entre les emplacements des racines latérales ou, en d'autres termes, que la nodulation n'altère pas le mode de distribution des racines latérales.

Nos recherches sur les sites de nodulation ont démontré que les nodules se forment en des endroits bien précis, contrairement à ce qu'a affirmé Taubert.

Avant nous, plusieurs chercheurs s'étaient également penchés sur la question et

avaient tenté d'y apporter une réponse. BECKING (1970) a essayé de fournir une explication en s'inspirant de la théorie de WIPF & COOPER (1938, 1940) et WIPF (1939). Selon celle-ci, la tétraploïdie de certaines cellules de l'écorce des légumineuses serait une condition nécessaire à la formation du nodule, lequel apparaîtrait suite à une rencontre fortuite entre une de ces cellules et l'endophyte. Peu après que Becking se soit vu dans l'impossibilité d'appliquer cette théorie aux nodules d'*Alnus glutinosa*, KODAMA (1970) a montré que, chez trois autres espèces d'*Alnus* (*A. pendula* Matsum., *A. hirsuta* Turcz., *A. sieboldiana* Matsum.), les cellules des nodules montrent le même caryotype, comportant un nombre diploïde de chromosomes, que les cellules du méristème apical des racines. Ceci nous fait penser que, chez *Alnus glutinosa*, il pourrait en être de même. Le point de départ de la tentative de Becking a été l'observation (BECKING 1966) de la présence de noyaux fort enflés dans les cellules de l'écorce infectée (nodule primaire); ce phénomène reste sans explication jusqu'à présent. Entretemps la théorie de Wipf et Cooper, appliquée aux légumineuses, a été réfutée par LIBBENGA & TORREY (1973) et LIBBENGA & BOGERS (1974).

Une autre tentative d'explication a été faite par QUISPEL (1954b, 1958) qui a appliqué à l'aulne la théorie des "foci" développée par NUTMAN (1948, 1949) chez une légumineuse, *Trifolium pratense* L. D'après Quispel, qui, contrairement à Nutman, rejette l'identification entre foyers préformés et initiales de racines latérales, la nodulation se produirait à la suite d'un contact occasionnel de l'endophyte avec un nombre limité de foyers préformés.

Nos expériences montrent, en accord avec celles de PIZELLE (1972b), que les nodules se forment en des sites très jeunes de la racine. Nous avons observé de plus l'apparition de nodules à la base de racines latérales pas encore visibles au moment de l'inoculation. Tout ceci suggère que l'endophyte s'installe derrière le méristème apical des racines. Dans la zone d'allongement encore indifférenciée, il trouverait des sites favorables où il induirait les primordes qui, à un certain stade de leur croissance, seront envahis à leur base par l'endophyte se propageant par la suite acropétalement. Si la zone d'allongement fournit les endroits favorables à la formation du nodule proprement dit, en d'autres zones déjà différenciées, l'endophyte trouve des sites propices seulement à la formation de nodules primaires; de plus, toutes les parties de la racine portant des poils absorbants assez jeunes fournissent des sites favorables à la pénétration de l'endophyte. Ceci peut expliquer le rôle joué par l'hôte, rôle qui ressort du fait que la pénétration de l'endophyte ne s'accompagne pas toujours de la formation d'un nodule primaire (*fig. 6*) et que tout nodule primaire ne produit pas de nodule proprement dit (*fig. 15*).

La possibilité d'induire des primordes a été traitée indirectement par PIZELLE (1970) dans une étude comparative des effets d'AIA et de l'azote nitrique sur la nodulation de l'aulne glutineux. D'après ces expériences, l'AIA exerce une action favorable sur la nodulation et, en même temps, atténue l'effet inhibiteur des concentrations élevées de nitrate. Nos expériences avec l'auxine synthétique 2,4-D, aussi utilisée comme herbicide, ont livré des résultats comparables à ceux rapportés par MISHUSTIN & SHIL'NIKOVA (1971) chez les légumineuses, où

l'auxine et le Rhizobium entreraient en compétition avec, comme conséquence, la formation de racines latérales (induites par le 2,4-D) et de peu ou pas de nodules. Dans les expériences avec AIB, une autre auxine synthétique, nous avons constaté une légère augmentation du nombre des nodules, mais le fait que la différence avec les plantes non traitées par l'auxine n'est pas significative contribue à formuler les conclusions suivantes. Dans la symbiose, la plante joue à l'égard de son partenaire un rôle limitant, d'une part parce que les ressources mises par elle à la disposition de la formation de nodules ne sont pas inépuisables, et d'autre part parce que l'étendue des sites favorables à la formation de nodules proprement dits est fonction de l'état de développement de certaines parties de la racine lors de l'inoculation. Tout ceci nous aide à interpréter les résultats obtenus par QUISPEL (1954b) au sujet de l'influence de la densité de l'inoculum utilisée sur le nombre de nodules produits: pour les faibles concentrations d'inoculum, on obtient une augmentation relative du nombre de nodules produits, mais ce nombre atteint un palier avec les fortes concentration d'inoculum. L'enseignement, probablement le plus important, à tirer de ces expériences avec des phytohormones consiste en ce que les racines, sous l'influence d'un agent excitant, ont la potentialité de former davantage de primordes. Les observations résumées dans la *fig. 27* montrent que la kinétine joue vraisemblablement un rôle non négligeable dans la croissance des primordes induits par l'auxine.

Il nous a semblé intéressant de vérifier si les conditions requises par la réduction de l'azote atmosphérique sont réunies à des stades très précoces de la symbiose. Par une méthode indirecte, la réduction du tétrazolium, déjà utilisée chez *Alnus glutinosa* par AKKERMANS (1971), nous avons pu démontrer que les vésicules du nodule primaire (dix-sept jours après l'inoculation) possèdent un bagage enzymatique suffisant pour réduire le tétrazolium en formazan.

A la fin de cette étude, il n'est pas inutile de rappeler les principales différences morphologiques entre les nodules fixateurs d'azote chez l'aulne (non-légumineuse) et ceux des légumineuses. Chez les légumineuses, on assiste à un déclenchement de mitoses dans l'écorce dès la pénétration du *Rhizobium*. Ces divisions cellulaires conduisent à la formation du nodule, lequel reçoit un système vasculaire qui, partant du cylindre central de la racine porteuse, l'entoure complètement: l'origine du nodule est corticale. Par contre, chez *Alnus*, il faut faire une distinction nette entre les divisions cellulaires dans l'écorce, qui conduisent à la formation du nodule primaire, et le nodule proprement dit qui est induit dans le péricycle. Les nodules de l'aulne se développent de façon dichotomique, ce qui leur donne un aspect coralloïde; ceci n'est pas le cas habituel chez les légumineuses.

REMERCIEMENTS

A tous ceux qui, dans le laboratoire de Botanique de Leyde ou en dehors de lui, ont contribué à la réalisation de ces recherches, je tiens à dire ici ma profonde reconnaissance. En particulier, je remercie Monsieur le Professeur A. Quispel pour l'intérêt avec lequel il a suivi ces travaux, pour la confiance qu'il m'a accordée et pour ses critiques durant la recherche et la rédaction du manuscrit. A Messieurs les Professeurs W. K. H. Karstens et K. R.Libbenga j'adresse mes vifs remerciements pour le soin apporté à lire le manuscrit et les discussions intéressantes qui s'ensuivirent. Monsieur T. Tak, par son assistance technique, a apporté une aide inestimable. Monsieur H. Verkijk a collaboré à la réalisation du matériel photographique. Monsieur G. P. G. Hock a exécuté les dessins et les graphiques. Les membres du personel technique ont construit certains instruments. Madame M. S. Laurent de Angulo a corrigé le texte. Ces recherches ont été subsidiées en partie par le Ministère de l'Education (Ministerie van Onderwijs en Wetenschappen) des Pays-Bas, dans le cadre des relations internationales.

BIBLIOGRAPHIE

AKKERMANS, A. D. L. (1971): *Nitrogen fixation and nodulation of Alnus and Hippophaë under natural conditions.* Thèse. Université de Leyde.

ALLEN, M. B. & D. I. ARNON (1955): Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by Anabaena cylindrica Lemm. *Plant Physiol.* **30**: 366–372.

ARCULARIUS, J. (1928): Zytologische Untersuchungen an einigen endotrophen Mykorrhizen. *Zbl. Bakter.* II, **74**: 191–207.

BAUSÁ ALCALDE, M. (1961): Sobre el cultivo "in vitro" de raíces aisladas de Androcymbium gramineum (Cav.) McBride. *Farmacognosia* **29**: 71–96.

BECKING, J. H. (1966): Interactions nutritionelles plantes-actinomycètes. Rapport général. *Ann. Inst. Pasteur.* Suppl. III: 211–246.

— (1970): Plant-endophyte symbiosis in non-leguminous plants. *Plant and soil* **32**: 611–654.

—, W. E. DE BOER & A. L. HOUWINK (1964): Electron microscopy of the endophyte of Alnus glutinosa. *Ant. van Leeuwenhoek* **30**: 343–376.

BOND, G. (1951): The fixation of nitrogen associated with the root nodules of Myrica gale L. with special reference to its pH relation and ecological significance. *Ann. Bot. Lond.* N.S. **15**: 447–459.

— (1956): Evidence for fixation of nitrogen by root nodules of alder (Alnus) under field conditions. *New Phytol.* **55**: 147–153.

— (1963): The root nodules of non-leguminous Angiosperms. *Symposia of the Society for General Microbiology no.* **13**, *Symbiotic associations*: 72–91.

—, W. W. FLETCHER & T. P. FERGUSON (1954): The development and function of the root nodules of Alnus, Myrica and Hippophaë. *Plant and Soil* **5**: 309–323.

BOND, L. (1948): Origin and developmental morphology of root nodules of Pisum sativum. *Bot. Gaz.* **109**: 411–434.

BRUNCHORST, J. (1886): Ueber einige Wurzelanschwellungen, besonders diejenigen von Alnus und den Elaeagnaceen. *Unters. Bot. Inst. Tübingen* **2**: 151–176.

BURLET, E. (1940): Ueber die pflanzliche Organkultur und ihre Anwendung bei physiologischen Untersuchungen. *Ber. Schw. bot. Ges.* **50**: 519–544.

DINGER, R. (1895): De els een stikstofverzamelaar. *Landbouwkundig Tijdschrift* **III**: 167–192.

DULLAART, J. (1970): The auxin content of root nodules and roots of Alnus glutinosa (L.) Vill. *J. Exp. Bot.* **21**: 975–984.

FEDER, N. & T. P. O'BRIEN (1968): Plant microtechnique: some principles and new methods. *Amer. J. Bot.* **55**: 123–142.

GERLACH, D. (1969): *Botanische Mikrotechnik*. G. Thieme Verlag, Stuttgart.
GOLDACRE, P. L. (1959): Potentiation of lateral root induction by root initials in isolated flax roots. *Austr. J. Biol. Sc.* **12**: 388–394.
HAWKER, L. E. & J. FRAYMOUTH (1951): A re-investigation of the root-nodules of species of Elaeagnus, Hippophaë, Alnus and Myrica with special reference to the morphology and life histories of the causative organisms. *J. Gen. Microbiol.* **5**: 369–386.
JOHANSEN, D. A. (1940): *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
KLÄMBT, H. D. (1961): Wachstuminduktion und Wuchsstoffmetabolismus im Weizenkoleoptilzylinder. *Planta* **57**: 339–353.
KODAMA, A. (1970): Cytological and morphological studies on the plant tumors. II. Root nodules of three species of Alnus. *J. Sc. Hiroshima Univ.* Ser. B, Div. 2. **3**: 261–264.
KREBBER, O. (1932): Untersuchungen über die Wurzelknöllchen der Erle. *Arch. Mikrobiol.* **3**: 588–608.
LEVAN, A. (1939): Cytological phenomena connected with the root swelling caused by growth substances. *Hereditas* **25**: 87–96.
LIBBENGA, K. R. & R. J. BOGERS (1974): Root-nodule morphogenesis. In: A. QUISPEL (Editor). *Biology of nitrogen fixation*. North-Holland, Amsterdam. 430–471.
— & P. A. A. HARKES (1973): Initial proliferation of cortical cells in the formation of root nodules in Pisum sativum L. *Planta* **114**: 17–28.
—, F. VAN IREN, R. J. BOGERS & M. F. SCHRAAG-LAMERS (1973): The role of hormones and gradients in the initiation of cortex proliferation and nodule formation in Pisum sativum L. *Planta* **114**: 29–39.
— & J. G. TORREY (1973): Hormone-induced endoreduplication prior to mitosis in cultured pea root cortex cells. *Amer. J. Bot.* **60**: 293–299.
LISON, L. (1958): *Statistique appliquée à la biologie expérimentale*. Gauthier-Villars, Paris. 346 p.
MAÁCZ, G. J. & E. VÁGÁS (1961): A new method for staining of cellulose and lignified cell-walls. *Mikroskopie* **16**: 40–43.
MISHUSTIN, E. N. & V. K. SHIL'NIKOVA (1971): *Biological fixation of atmospheric nitrogen*. MacMillan, London.
NOEL, A. R. A. (1964): A staining and mounting combination for sections of plant tissues. *Stain Tech.* **39**: 324–325.
NUTMAN, P. S. (1948): Physiological studies on nodule formation. I. The relation between nodulation and lateral root formation in red clover. *Ann. Bot.* N.S. **12**: 81–96.
— (1949): Physiological studies on nodule formation. II. The influence of delayed inoculation on the rate of nodulation in red clover. *Ann. Bot.* N.S. **13**: 261–283.
OVERBEEK, J. VAN (1964): Survey of mechanisms of herbicide action. In: L. J. AUDUS (Ed.) *The physiology and biochemistry of herbicides*. Academic Press, New York. 387–400.
PECKET, R. C. (1957): The initiation and development of lateral meristems in the pea root. I. The effect of young and of mature tissue. *J. Exp. Bot.* **8**: 172–180.
PIZELLE, G. (1970): Effets comparés de l'acide β-indolyl-acétique et de l'azote nitrique sur la nodulation de l'Aune glutineux (Alnus glutinosa). *Bull. Acad. et Soc. Lorraines des Sc.* **9**: 174–178.
— (1972a): Les angiospermes non-légumineuses fixatrices symbiotiques d'azote présentes dans la flore française. *Bull. E.N.S.A.I.A. Nancy* **14**: 177–191.
— (1972b): Observations sur les racines de plantules d'Aune glutineux (Alnus glutinosa Gaertn.) en voie de nodulation. *Bull. Soc. Bot. Fr.* **119**: 571–580.
PLOTHO, O., VON (1942): Die Synthese der Knöllchen an den Wurzeln der Erle. *Arch. Mikrobiol.* **12**: 1–18.
POMMER, E. H. (1956): Beiträge zur Anatomie und Biologie der Wurzelknöllchen von Alnus glutinosa Gaertn. *Flora* **143**: 603–634.
— (1959): Über die Isolierung des Endophyten aus den Wurzelknöllchen Alnus glutinosa Gaertn. und über erfolgreiche Re-Infektionsversuche. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **72**: 138–150.
QUISPEL, A. (1954a): Symbiotic nitrogen fixation in non-leguminous plants. I. Preliminary experiments on the root-nodule symbiosis of Alnus glutinosa. *Acta Bot. Neerl.* **3**: 495–511.

QUISPEL, A. (1954b): Symbiotic nitrogen fixation in non-leguminous plants. II. The influence of the inoculation density and external factors on the nodulation of Alnus glutinosa and its importance to our understanding of the mechanism of the infection. *Acta Bot. Neerl.* **3**: 512–532.

— (1955): Symbiotic nitrogen fixation in non-leguminous plants. III. Experiments on the growth in vitro of the endophyte of Alnus glutinosa. *Acta Bot. Neerl.* **4**: 671–689.

— (1958): Symbiotic nitrogen fixation in non-leguminous plants. IV. The influence of some environmental conditions on different phases of the nodulation process in Alnus glutinosa. *Acta Bot. Neerl.* **7**: 191–204.

RAO, C. R. (1968): *Linear statistical inference and its applications.* John Wiley and Sons publish., New York. 522 p. (test de Bartlett: p. 483).

REYNOLDS, E. S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain for electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **17**: 208–212.

RODRIGUEZ-BARRUECO, C. & F. BERMUDEZ DE CASTRO (1973): Cytokinin-induced pseudonodules on Alnus glutinosa. *Physiol. Plant.* **29**: 277–280.

SCHACHT, H. (1853): Beitrag zur Entwicklungs-Geschichte der Wurzel. *Flora* (Regensburg) **36**: 257–266.

SCHAEDE, R. (1933): Über die Symbionten in den Knöllchen der Erle und des Sanddornes und die cytologischen Verhältnisse in ihnen. *Planta* **19**: 388–416.

SPRATT, E. R. (1912): The morphology of the root tubercles of Alnus and Elaeagnus and the polymorphism of the organism causing their formation. *Ann. Bot.* **26**: 119–128.

STOWELL, R. E. (1945): Feulgen reaction for thymonucleic acid. *Stain Tech.* **20**: 45–58.

TAUBERT, H. (1956): Über den Infektionsvorgang und die Entwicklung der Knöllchen bei Alnus glutinosa Gaertn. *Planta* **48**: 135–156.

TORREY, J. G. (1961): Kinetine as trigger for mitosis in mature endomitotic plant cells. *Expl. Cell Res.* **23**: 281–299.

WETMORE, R. H. & G. MOREL (1949): Polyphenol oxidase as a problem in organ culture and auxine diffusion studies of horsetails and ferns. *Amer. J. Bot.* **36**: 830 (Abstr.).

WHITE, P. R. (1943): *A handbook of plant tissue culture.* Ronald Press Co. New York.

WILDE, M. H. (1951): Anatomical modifications of bean roots following treatment with 2,4-D. *Amer. J. Bot.* **38**: 79–91.

WIPF, L. (1939): Chromosome numbers in root nodules and root tips of certain Leguminosae. *Bot. Gaz.* **101**: 51–67.

WIPF, L. & D. C. COOPER (1938): Chromosome numbers in nodules and roots of red clover, common vetch and garden pea. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U.S.). **24**: 87–91.

— (1940): Somatic doubling of chromosomes and nodular infection in certain Leguminosae. *Amer. J. Bot.* **27**: 821–824.

WORONIN, M. (1866): Über die bei der Schwarzerle (Alnus glutinosa) und der gewöhnlichen Garten-Lupine (Lupinus mutabilis) auftretenden Wurzelanschwellungen. *Mém. Acad. Imp. Sci. St. Pétersbourg.* Série 7: T. 10. No. 6: 1–13.

YORKE, J. S. & G. R. SAGAR (1970): Distribution of secondary root growth potential in the root system of Pisum sativum. *Can. J. Bot.* **48**: 699–704.

ZIMMERMAN, P. W. & A. E. HITCHCOCK (1935): The response of root to "root-forming" substances. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **7**: 439–445.