



HAL
open science

Etude écologique en immunofluorescence de *Rhizobium japonicum* dans le sol et la rhizosphère

Jean Claude Cleyet-Marel, Yves Crozat

► **To cite this version:**

Jean Claude Cleyet-Marel, Yves Crozat. Etude écologique en immunofluorescence de *Rhizobium japonicum* dans le sol et la rhizosphère. *Agronomie*, 1982, 2 (3), pp.243-248. hal-02725291

HAL Id: hal-02725291

<https://hal.inrae.fr/hal-02725291>

Submitted on 2 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Etude écologique en immunofluorescence de *Rhizobium japonicum* dans le sol et la rhizosphère

Jean-Claude CLEYET-MAREL & Yves CROZAT (*)

I.N.R.A., Laboratoire de Recherches sur les Symbiotes des Racines, 9, Place Viala, F 34060 Montpellier-Cedex.

(*) E.S.A., 24, rue Auguste-Fontenau, F 49044 Angers.

RÉSUMÉ

Ecologie,
Rhizobium japonicum,
Immunofluorescence,
Sol,
Rhizosphère,
Rhizoplan.

La technique des anticorps marqués (immunofluorescence) a été utilisée pour l'étude de la persistance et de la compétition dans le sol de *Rhizobium japonicum*. La même technique a permis d'apprécier la multiplication de *Rhizobium* dans le sol rhizosphérique et dans le rhizoplan.

Les populations de *R. japonicum*, souches G₂ et G₃ se maintiennent à un haut niveau (10⁴ bactéries/g de sol) pendant tout le temps de l'expérimentation.

Lorsque 2 souches sont introduites simultanément, on n'observe pas de compétition saprophytique entre celles-ci dans le sol. L'étude de *R. japonicum* dans la rhizosphère montre que seule la plante hôte de soja, var. « Chippewa nodulante », possède dans le sol proche de ses racines une population de *Rhizobium* plus importante que dans le sol normal.

Dans une expérimentation portant sur le rhizoplan, 4 cultivars de soja sont testés. Les résultats montrent que *R. japonicum* est 100 à 1 000 fois plus abondant dans le rhizoplan que dans le sol ne portant pas de végétation. Nous suggérons qu'au cours de la multiplication de *Rhizobium* dans le rhizoplan, l'équilibre entre 2 souches peut être modifié et une souche stimulée préférentiellement à l'autre.

SUMMARY

Ecology,
Rhizobium japonicum,
Immunofluorescence,
Soil,
Rhizosphere,
Rhizoplane.

Ecological study of Rhizobium japonicum in the soil and the rhizosphere by the immunofluorescence method

The fluorescent-antibody technique was used to study persistence and competition of *Rhizobium japonicum* strains in soils at different temperatures and to examine the effect of plants on this bacterium in the rhizosphere and rhizoplane. The soil population of *R. japonicum* strains G₂ and G₃ remained the same (10⁴ bacteria/g of soil) throughout the experiment, without any significant competition between the two strains. In the rhizosphere experiment, only the host legume (*Glycine max*, cv. « Chippewa ») supported high populations of strain G₃. In another experiment with four cultivars of soybeans, the populations of *R. japonicum* 10², 10³ more numerous in the rhizoplane soil than in normal soil. We suggest that the multiplication of *Rhizobium* in the rhizoplane of the host plant is an important phenomenon, able to modify the equilibrium between two specific strains and thus to favour better nodulation by one strain rather than another.

I. INTRODUCTION

La réussite d'une culture de légumineuse nécessite la mise en place d'une association efficiente entre la plante hôte et la bactérie du genre *Rhizobium*.

Lorsque le *Rhizobium* est absent du sol, l'inoculation des semences peut dans certains cas multiplier le rendement par deux ou trois. C'est le cas de la luzerne (*Medicago sativa* L.) en sol acide (OBATON, 1971) ou du soja (*Glycine max* L. Merrill) dans tous les sols français (LAGACHERIE & OBATON, 1973).

Par contre, pour une légumineuse donnée, si le sol contient déjà des *Rhizobium* appartenant à son groupe d'inoculation, il peut être difficile de faire former les nodosités par une souche nouvelle apportée par inoculation. (JOHNSON *et al.*, 1965 ; AMARGER, 1974). La proportion de

nodules formés par les souches réintroduites est généralement faible (WEAVER & FREDERICK, 1974).

Pour mieux maîtriser le mécanisme global de compétition pour la nodulation, il est indispensable de mieux connaître la survie dans le sol des bactéries incluses dans les inoculums, leur multiplication dans la rhizosphère de la plante hôte et le pouvoir infectif des différentes souches en présence.

La survie et les phénomènes de compétition entre souches de *Rhizobium japonicum* sont étudiés principalement à l'aide de méthodes indirectes fondées sur l'aptitude de ces bactéries à former des nodosités (VINCENT, 1974).

Les techniques quantitatives en immunofluorescence (SCHMIDT, 1974) offrent l'avantage d'être directes et de donner une estimation immédiate du nombre d'individus d'une population particulière. Notre objectif est ici, à l'aide

de la technique des anticorps marqués (immunofluorescence) :

- d'étudier l'évolution de différentes populations de *R. japonicum* dans 2 sols,
- d'aborder les problèmes posés par l'étude de la multiplication de *R. japonicum* dans la rhizosphère de plusieurs plantes dont le soja et de montrer les perspectives offertes par la technique utilisée.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Préparation des anticorps fluorescents

Les souches de *R. japonicum* G₂ (311 B 135 USDA Beltsville) et G₃ (311 B 138 USDA Beltsville) sont cultivées sur milieu solide à base d'extrait de levure et de mannitol (VINCENT, 1970). Après 4-5 jours de culture à 28°, les bactéries sont lavées 3 fois en eau physiologique. Puis la suspension est ajustée à 10⁹ bactéries/ml.

L'inactivation des antigènes flagellaires (BUSHNELL & SARLES, 1939) est assurée en chauffant les suspensions pendant 1 h à 100 °C (bain-marie bouillant).

Les anticorps sont marqués à l'I.T.C.F. selon la méthode décrite antérieurement (JOSSEMAND & CLEYET-MAREL, 1979).

Les antisérums sont préparés sur des lapins de 3-4 mois de race néo-zélandaise, selon un protocole comprenant 2 séries d'intra-veineuses terminées par une injection sous-cutanée (1^{er} jour : 0,5 ml I.V. ; 2^e j : 1 ml I.V. ; 3^e j : 1,5 ml I.V. ; 4 à 6^e j : repos ; 7^e j : 1,5 ml I.V. ; 8^e j : 2 ml I.V. ; 9^e j : 2 ml I.V. + 2 ml S.C.). La détermination du titre est effectuée 16 j après la 1^{re} injection par réaction d'immunofluorescence indirecte et une 1^{re} ponction cardiaque est réalisée le 18^e jour si le titre est égal ou supérieur à 1/1 200.

B. Etude de la survie de *R. japonicum* dans le sol

1. Persistence des cellules vivantes

Deux sols sont utilisés pour ce type d'expérimentation : Sol M ou sol de la Station de la Valette à Montpellier et sol L ou sol de grande culture de la région lyonnaise (tabl. 1).

Des échantillons de 500 g de sol tamisés à 4 mm sont ensemencés avec la ou les souches G₂ et G₃ et sont ensuite transférés pour incubation dans des assemblages spéciaux ou assemblages de « Léonard » couverts (VINCENT, 1970).

Dans une 1^{re} série d'expériences, 3 échantillons de sol M, uniquement, sont inoculés par vaporisation de la souche G₃ à raison de 20 ml de suspension bactérienne pour 500 g de sol.

Un 1^{er} échantillon, ayant reçu 10⁸ *Rhizobium*, est placé à 4 °C tandis que le 2^e et le 3^e, ayant reçu 5.10⁷ *Rhizobium*, sont placés à 18 °C et 28 °C. Pour tous les échantillons l'humidité du sol reste constante au cours de l'incubation et voisine de 18 p. 100.

Dans une 2^e série d'expériences, les 2 sols L et M sont inoculés simultanément et de façon identique à celle décrite précédemment par les 2 souches de *R. japonicum*, G₂ et G₃, puis mis à incuber dans des assemblages de « Léonard » à 28 °C. Les comptages des 2 souches sont réalisés sur les mêmes prélèvements.

L'évolution des populations bactériennes introduites (G₃) est suivie dans le temps en les dénombrant par immunofluorescence sur membrane de filtration, selon la technique décrite par SCHMIDT (1974). Pour chaque échantillon mis à incuber, 3 prélèvements sont effectués, chaque prélèvement donnant lieu à un dénombrement.

Le mode de répartition des bactéries sur les membranes de filtration ainsi que la précision de l'estimation de leur nombre ont été décrits par ailleurs (CLEYET-MAREL & CHESSEL, 1978).

2. Persistence des cellules mortes

Les *Rhizobium* (souche G₃) sont tués par passage des suspensions bactériennes dans un bain-marie à 80 °C pendant 3 mn. A partir de la suspension rapidement refroidie, 2 prélèvements sont effectués : le 1^{er} est destiné à la vérification de la viabilité des cellules bactériennes par étalement en boîte de Petri, le 2^e est utilisé pour des frottis bactériens sur lesquels sera testé le sérum fluorescent anti G₃. Les 2 sols L et M sont inoculés avec une suspension de ces cellules, l'évolution de leur nombre est suivi par immunofluorescence.

TABLEAU 1

Propriétés physico-chimiques du sol de Montpellier et du sol de Lyon.
Physical and chemical properties of the soils of Montpellier and Lyon.

| Propriétés | Sol de Montpellier (Sol M) | Sol de la Région Lyonnaise (Sol L) |
|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| pH eau | 8,2 | 6,6 |
| pH KCl N | 7,5 | 6,1 |
| Carbone organique ‰ (méthode Anne) | 8,0 | 26,4 |
| Azote Kjeldahl ‰ | 0,89 | 3,48 |
| C/N | 8,99 | 7,58 |
| Calcaire total | 614 | 0 |
| Calcium échangeable M.E.Q. ‰ | 32,1 | 18,9 |
| Granulométrie ‰ : | | |
| Sables grossiers : 0,2 & 2,0 mm | 150 | 167 |
| Sables fins : 0,050 et 0,2 mm | 177 | 155 |
| Limons grossiers : 0,020 et 0,050 mm | 204 | 113 |
| Limons fins : 0,002 et 0,020 mm | 307 | 251 |
| Argiles : 0 et 0,002 | 162 | 314 |
| Capacité au champ ‰ | 19,7 | 37,2 |

C. Etude de l'influence de la plante sur les populations du sol rhizosphérique

1. La rhizosphère sensu stricto

Des échantillons de 1 kg de sol M, inoculés avec la souche G_3 , sont introduits dans des pots et ensemencés avec les graines de plusieurs plantes à raison de 3 graines par pot dans le cas du soja (cv. « Chippewa nodulante » et « non nodulante »), 10 graines dans le cas du blé (*Triticum vulgare* L., cv. « Talent » et « Maris Huntsmann ») et 30 graines dans le cas du dactyle (*Dactylis glomerata* L.).

Après 2 mois de culture en serres, les plantes sont prélevées et la fine couche de sol qui adhère fermement aux racines est prélevée par un lavage et une agitation modérée dans l'eau (15 mn sur un agitateur rotatif à axe horizontal). Nous obtenons ainsi la fraction de sol correspondant à la rhizosphère proprement dite telle que l'ont définie DOMMERMUES & MANGENOT (1970).

A partir de la fraction obtenue, 2 prélèvements sont effectués. Le 1^{er} est destiné à un dénombrement de *R. japonicum* par immunofluorescence sur membranes de filtration et le 2^e à un dénombrement de la microflore totale en boîtes de Petri sur un milieu à la gélose nutritive (Bio Mérieux). Dans le cas du sol non rhizosphérique, les échantillons sont aussi répartis en 2 lots : dénombrement par immunofluorescence et dénombrements sur boîtes de Petri.

2. Le rhizoplan

Des échantillons de sol M (1 kg) sont tamisés à 4 mm et inoculés avec la souche G_2 . On utilise 4 génotypes de soja : « Hodgson », « Giessen 454-69 », « Fiskeby », « Chin Chuan ».

Avant le semis, les graines sont stérilisées par trempage pendant 60 mn dans une solution d'hypochlorite de calcium (10 g dans 150 cm³ d'eau distillée) puis rincées 5 à 6 fois dans de l'eau stérile. Chacun des pots contient 4 plantes ; 3 pots témoins sans couvert végétal sont placés dans les mêmes conditions. Il y a 3 répétitions par essai.

Au stade 4-5 feuilles (début du remplissage des gousses), on prélève les plantes entières. Le système racinaire est préalablement lavé et agité modérément dans l'eau comme pour l'étude de la rhizosphère. Le matériel végétal issu de cette 1^{re} opération est placé dans des bouteilles contenant 150 ml d'eau distillée, puis soumis à une agitation vigoureuse (30 mn sur un agitateur rotatif à axe vertical). Cette opération a pour but d'extraire la microflore présente à la surface des racines et de travailler uniquement avec le rhizoplan tel que celui-ci a été défini par DOMMERMUES & MANGENOT (1970). Le dénombrement des *Rhizobium* s'effectue en immunofluorescence sur membrane de filtration après élimination des particules de sol.

III. RÉSULTATS

A basse température, 4°C (fig. 1a), le nombre de *Rhizobium* ne cesse de décroître en raison sans doute de l'absence de multiplication, de la mortalité naturelle et de la prédation par des organismes unicellulaires. A 18°C et 28°C (fig. 1b et 1c), on observe au cours des 10 premiers jours une augmentation sensible du nombre de bactéries introduites. Il est à noter que l'augmentation du nombre de *Rhizobium* est d'autant plus importante que la température d'incubation est plus élevée.

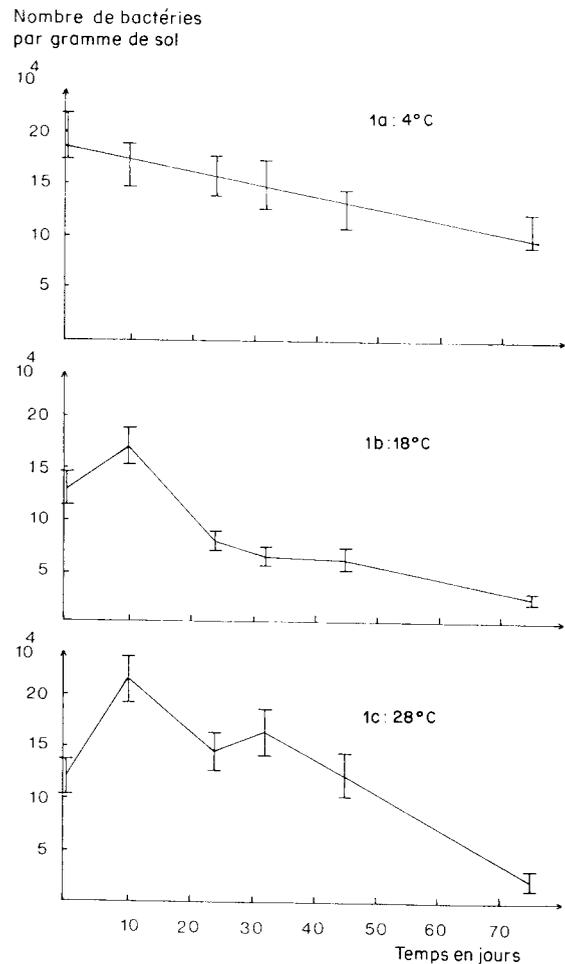


Figure 1

Persistence de *Rhizobium japonicum* (G_3) introduit dans le sol M à différentes températures dans un assemblage de « Léonard ».

Persistence of *Rhizobium japonicum* in soil M at different temperatures.

Lorsque 2 souches sont introduites simultanément dans un sol (fig. 2a et 2b), leurs populations évoluent de façon identique. Cette évolution n'est pas la même dans les sols L et M. Contrairement à ce qui se passe dans le sol M, on n'observe pas, dans le sol L, d'augmentation du nombre de *Rhizobium* au cours des 10 premiers jours d'incubation.

Les résultats du tableau 2 montrent que les corps bactériens tués se maintiennent à un niveau élevé pendant 6 à 9 jours. Ce n'est qu'après le 6^e jour que l'on peut noter une diminution brutale du nombre d'individus. La détection des bactéries introduites devient alors très délicate, leur nombre se situant en dessous du seuil de sensibilité de la technique d'observation (10³ bactéries/g de sol).

A. La rhizosphère

Pour caractériser l'influence des plantes sur la microflore totale et sur *Rhizobium* dans leur sol rhizosphérique, nous avons calculé pour chaque plante le rapport R/S entre le nombre de microorganismes dans le sol rhizosphérique (R) et dans le sol témoin (S).

Ces rapports R/S sont présentés dans la figure 3 ; ils indiquent que :

— 4 des 5 plantes étudiées ont à l'égard de la microflore totale et de *R. japonicum* G_3 un effet stimulant.

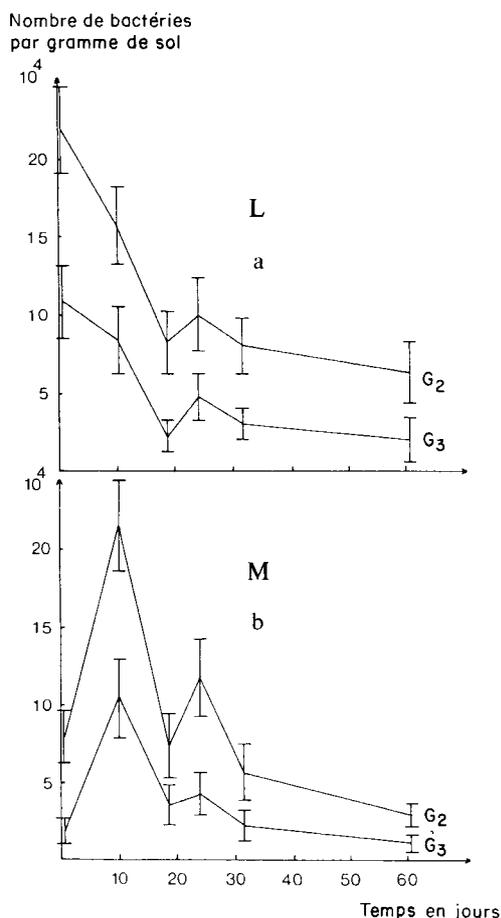


Figure 2
Evolution de 2 souches de *Rhizobium japonicum* (G_2 et G_3) introduites dans 2 sols L et M à 28°C dans un assemblage de « Leonard ».
Survival of two strains of *Rhizobium japonicum* in two different soils at 28°C.

TABEAU 2

Persistence de cellules mortes de *Rhizobium japonicum* (souche G_3) dans les sols de Lyon et Montpellier, d'après leur détection par immunofluorescence.

Persistence of killed cells of *R. japonicum* (strain G_3) in Lyon and Montpellier soils.

| Temps en jours | Nombre de cellules par g. de sol | |
|----------------|----------------------------------|-----------------------|
| | Sol M | Sol L |
| 0 | 41,20.10 ⁴ | 16,70.10 ⁴ |
| 6 | 34,30.10 ⁴ | 7,55.10 ⁴ |
| 9 | 1,06.10 ⁴ | 5,32.10 ⁴ |
| 13 | 0,37.10 ⁴ | 0,62.10 ⁴ |
| 15 | 0,12.10 ⁴ | 0,23.10 ⁴ |

— *R. japonicum* est 12 à 21 fois plus abondant dans le sol rhizosphérique du soja var. « Chippewa nodulante » que dans le sol normal.

Il est toutefois délicat de comparer les systèmes racinaires des différentes plantes, les rapports terre sèche/racines sèches (R_1) n'étant pas identiques (fig. 3).

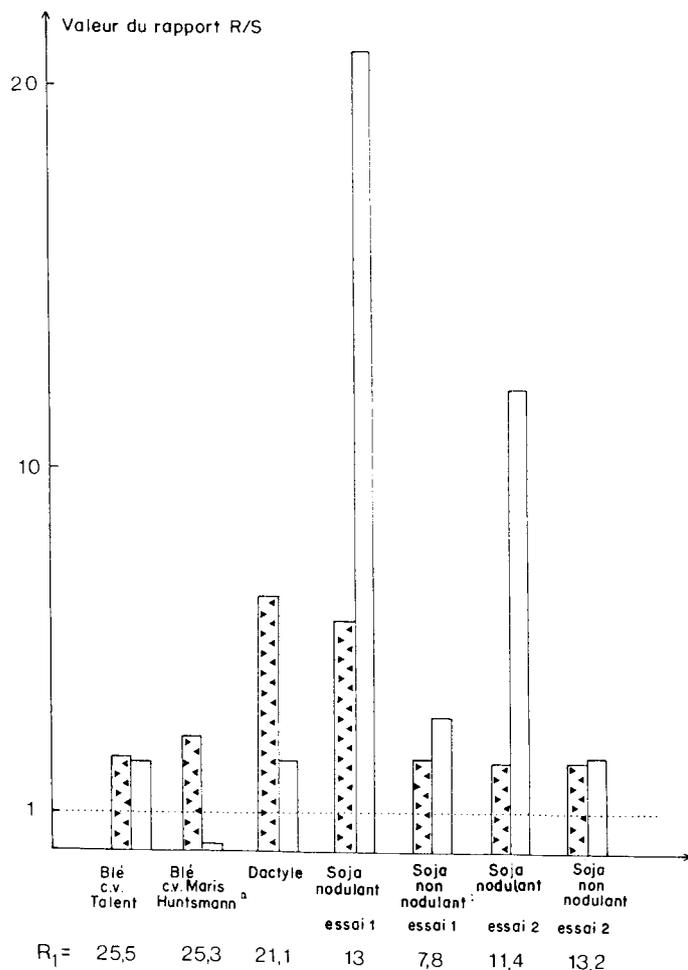


Figure 3
Influence du végétal sur la microflore totale et sur *Rhizobium japonicum* G_3 présents dans la rhizosphère de plusieurs types de plantes.
 R/S : Rapport entre le nombre de microorganismes dans le sol de la rhizosphère (R) et dans le sol témoin (S).
 R_1 : Rapport entre le poids de terre sèche utilisée pour le dénombrement des microorganismes du sol de la rhizosphère et le poids de racines sèches sur lesquelles a été prélevé le sol.
Effect of the plant on the soil microflora and on *Rhizobium japonicum* in the rhizosphere.
 R/S : Ratio between the number of microorganisms in the rhizosphere soil (R) and the normal soil (S).
 R_1 : Ratio between the weight of dry soil and dry roots.

Microflore totale  *Rhizobium japonicum* 

B. Le rhizoplan

L'intensité de colonisation du rhizoplan est théoriquement exprimé par la densité de microorganismes par gramme de racines (DOMMERS, 1970) soit R_0 (tabl. 3). La mise en suspension de nouvelles particules de sol lors du lavage intensif des racines nous a conduits à exprimer les résultats sous une 2^e forme (Rapports R_n/S). Les quantités relatives de terre prises en compte dans le rhizoplan sont exprimées par les rapports R_1 (poids de terre sèche mise en suspension/poids sec de racines). La définition de R_1 est uniquement opérationnelle et se trouve entachée d'une certaine imprécision puisque l'on ne connaît jamais réellement la quantité de sol restant adhérente aux racines. Les

TABLEAU 3

Valeurs des rapports R_0 (densité de *Rhizobium*/g de racines) ; Rn/S (nombre de *Rhizobium* dans le sol rhizosphérique par rapport au sol témoin) et R_1 (rapport entre le poids de terre sèche et de racines sèches) pour 4 variétés de soja.

Rhizosphere effect of four cultivars of soybean on the population of *Rhizobium japonicum*.

R_0 = *Rhizobium* density per gram of roots.

Rn/S = Rhizosphere effect.

R_1 = Ratio between the weight of dry soil and dry roots.

| Cultivars soja | R_0 : ($\times 10^6$) | Rn/S | R_1 |
|----------------|---------------------------|---------|-------|
| Hodgson | 0,64 | 162 | 0,88 |
| Giessen | 0,53 | 132,6 | 1,67 |
| Chin-Chuan | 5,11 | 1 265,3 | 1,01 |
| Fiskeby | 10,35 | 2 608,8 | 0,87 |

rapports R_1 étant cependant relativement voisins (proche de l'unité) pour toutes les variétés, il est possible de comparer les différents résultats obtenus pour celles-ci. Quel que soit le mode de représentation des résultats R_0 ou Rn/S , on observe les mêmes tendances de stimulation.

Nous pouvons retenir deux groupes de cultivars pour le soja :

— « Fiskeby » et « Chin-Chuan » avec R_0 de l'ordre de 10^6 (moyennes : 5,11.10⁶ et 10,4.10⁶ respectivement pour les 2 variétés), Rn/S de l'ordre de 10^3 (1 265 et 2 609 en moyenne dans les 2 cas).

— « Hodgson » et « Giessen », présentant une stimulation plus faible ; R_0 de l'ordre de 10^5 (6,4.10⁵ et 5,3.10⁵ respectivement) et Rn/S de l'ordre de 10^2 (162 et 132,6).

IV. DISCUSSION

L'inoculation des semences de légumineuses est couramment réalisée mais, généralement, seules l'infectivité et l'efficacité des souches sont retenues comme critère de sélection (LAGACHERIE *et al.*, 1977).

Les résultats donnés dans cet article concernent plus spécialement la compétence saprophytique et montrent que les 2 souches G_2 et G_3 se maintiennent à un niveau voisin de celui de l'introduction dans les sols L et M incubés dans les conditions décrites et ce pendant 2 mois. Ces 2 mêmes souches sont d'ailleurs capables de survivre pendant plusieurs années dans des sols agricoles en place, qu'elles aient été apportées par inoculation directe des sols (OBATON & GIRAUD, 1977) ou par inoculation des graines de soja (LAGACHERIE, 1978). Il est même possible que pour une souche et un sol donnés, la population introduite se stabilise à un seuil d'équilibre selon un modèle mathématique du type logistique (CROZAT, 1980).

L'immunofluorescence ne permet pas de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes. D'une manière générale, les bactéries sont décelées aussi longtemps que les structures antigéniques sont intactes. La durée de conservation de ces structures est, dans nos conditions expérimentales, d'environ 15 jours. Après cette période, seules les cellules vivantes seront dénombrées. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par BOHLOOL & SCHMIDT (1973).

L'étude de la rhizosphère *s. str.* met en évidence une plus grande abondance de *R. japonicum* dans le sol adhérent aux racines que dans le sol témoin. Parmi l'ensemble des plantes testées, c'est la variété de soja « Chippewa nodulante » qui exerce la stimulation la plus importante. Nous pouvons formuler plusieurs hypothèses quant à l'origine de celle-ci : d'une part, après 2 mois de culture, les plantes de soja portent un grand nombre de nodules bien développés. Etant donné la relative pauvreté du sol en azote minéral, cette abondante nodulation assure au soja une nutrition azotée supérieure à celle des autres plantes, avantage pouvant entraîner en retour une exsudation plus importante de métabolites azotés entre autres.

On sait, d'autre part, qu'une proportion importante de cordons d'infection avortent et ne provoquent pas l'apparition de nodosités fonctionnelles (DART, 1974). Il y a pourtant eu au sein du végétal un début de multiplication intense et spécifique de la bactérie infective. Si on envisage la desquamation des poils absorbants au cours de la croissance de la plante et compte tenu des possibilités de survie de *R. japonicum* dans le sol, il est logique d'observer un grand nombre de ces bactéries dans la rhizosphère de la plante hôte. Ces 2 hypothèses ont déjà été discutées par NUTMAN (1965).

Par ailleurs la possibilité pour des plantes non légumineuses de supporter dans leur rhizosphère des populations importantes de *Rhizobium* est un facteur pouvant expliquer la dispersion et la survie de *Rhizobium* en l'absence de la plante hôte (PARKER *et al.*, 1977).

Nous avons noté au cours de notre expérimentation au sujet du rhizoplan que l'intensité de la stimulation varie pour un stade végétatif donné selon le génotype de la plante hôte. Cette stimulation est généralement forte ; nous avons même constaté qu'il existait une compétition intraspécifique pour l'utilisation des substrats libérés par la plante (CROZAT, 1980).

La multiplication différentielle de 2 souches dans la rhizosphère, bien que constituant une des phases de la compétence saprophytique définie par CHATEL *et al.* (1968), est une étape très importante précédant immédiatement la phase de compétition pour l'infection telle qu'elle a été définie par AMARGER (1974). Une meilleure connaissance de son mécanisme et de son importance dans le phénomène global de la compétition pour la nodulation nous semble indispensable si on veut réintroduire avec succès dans le sol, de nouvelles souches de *Rhizobium* plus efficaces.

Reçu le 10 avril 1981.

Accepté le 5 novembre 1981.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amarger N.**, 1974. Compétition pour la formation des nodosités sur la féverole entre souches de *Rhizobium leguminosarum* apportées par inoculation et souches indigènes. *C.R. Acad. Sci., Sér. D*, Paris, **279**, 527-530.
- Bohlool B. B., Schmidt E. L.**, 1973. Persistence and competition aspects of *Rhizobium japonicum* observed in soil by immunofluorescence microscopy. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **37**, 561-564.
- Bushnell O. A., Sarles W. B.**, 1939. Investigation upon the antigenic relationships among the root-nodule bacteria of the soybean, cowpea, and lupine cross-inoculation groups. *J. Bacteriol.*, **38**, 401-410.
- Chatel D. L., Greenwood R. M., Parker C. A.**, 1968. Saprophytic competence as an important character in the selection of *Rhizobium* for inoculation. *9th Intern. Congr. Soil Sci. Adelaide Trans.*, **2**, 65-73.
- Cleyet-Marel J. C., Chessel D.**, 1978. Méthode de dénombrement de *Rhizobium japonicum* par immunofluorescence. Analyse statistique des comptages. *Ann. Phytopathol.*, 1978, **10** (2), 219-231.
- Crozat Y.**, 1980. *Application de l'immunofluorescence à l'étude de l'écologie de Rhizobium japonicum*. D.E.A. Université Claude Bernard, Lyon I.
- Dart P. J.**, 1974. The infection process. In *The Biology of Nitrogen Fixation*. (A. Quispel, Ed.), pp. 381-429. *North Holland Research Monographs, Frontiers of Biology*.
- Dommergues Y., Mangenot F.**, 1970. *Ecologie microbienne du sol*. MASSON, Paris, 783 p.
- Johnson H. W., Means U. M., Weber C. R.**, 1965. Competition for nodule sites between strains of *Rhizobium japonicum* applied as inoculum and strains in the soil. *Agron. J.*, **57**, 179-185.
- Josserand A., Cleyet-Marel J. C.**, 1979. Isolation from soils of *Nitrobacter* and evidence for novel serotypes using immunofluorescence. *Microbiol. Ecol.*, **5**, 197-205.
- Lagacherie B., Obaton M.**, 1973. L'inoculation du soja : résultats d'essais et orientation future du travail. *C.R. Acad. Agric. Fr.*, 67-77.
- Lagacherie B., Hugot R., Amarger N.**, 1977. Sélection de souches de *Rhizobium japonicum* d'après leur compétitivité pour l'infection. *Ann. agron.*, **28**, 379-389.
- Lagacherie B.**, 1978. Survie dans le sol des *Rhizobium* apportés par inoculation des graines de soja. *Inf. Tech. CETIOM*, **62**, 11-15.
- Nutman P. S.**, 1965. The relation between nodule bacteria and the legume host in the rhizosphere and in the process of infection, in *Ecology of Soil Borne Plant Pathogens*. K. F. Baker and W. C. Snyder, London, 231-251.
- Obaton M.**, 1971. Influence de la composition chimique du sol sur l'utilité de l'inoculation des graines de luzerne avec *Rhizobium meliloti*. *Plant Soil, Special Volume*, 273-285.
- Obaton M., Giraud J. J.**, 1977. Etude de la survie des *Rhizobium japonicum* dans le sol. *Inf. Tech. CETIOM*, **57**, 3-9.
- Parker C. A., Trinick M. J., Chatel D. L.**, 1977. *Rhizobia* as soil and rhizosphere inhabitants, in *A treatise on dinitrogen fixation*, Section IV, *Agronomy and Ecology*, R.W.F., Hardy and A. M. Gibson, London, 311-352.
- Schmidt E. L.**, 1974. Quantitative autecological study of microorganisms in soil by immunofluorescence. *Soil Sci.*, **118**, 141-149.
- Vincent J. M.**, 1970. *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. Oxford, Edinburgh : Blackwell Sci. Publ., 164 p.
- Vincent J. M.**, 1974. Root nodule symbiosis with *Rhizobium*. In *The Biology of Nitrogen Fixation*. (A. Quispel, Ed), p. 265-341. *North-Holland Research Monographs, Frontiers of Biology*.
- Weaver R. W., Frederick L. R.**, 1974. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max*. II Field studies. *Agron. J.*, **66**, 233-236.