

FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE : LA SYMBIOSE ACTINORHIZIENNE CASUARINA-FRANKIA

Reçu le 04/10/2011 – Accepté le 07/03/2012

M. BENABDOUN¹⁻², H. GHERBI², A.DJEKOUN¹, D. BOGUSZ², C. FRANCHE², N. YKHLEF¹

¹ Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté SNV, Département de Biologie et Ecologie, Université Mentouri-Constantine, Route Ain El Bey, Constantine. Algérie

² Rhizogénèse, UMR DIADE, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394, Montpellier, Cedex 5 (France)

Résumé

Casuarina glauca est une espèce tropicale ligneuse à croissance rapide, bien adaptée à la sécheresse et capable de réhabiliter les sols dégradés. Cet arbre a la capacité de développer au niveau racinaire une symbiose avec l'actinobactérie fixatrice d'azote *Frankia*. Le processus symbiotique aboutit à la formation de nodules ou « actinorhizes », au sein desquels *Frankia* transforme l'azote atmosphérique en ammoniac assimilable par la plante hôte. Depuis une quinzaine d'années, les connaissances sur les mécanismes moléculaires qui gouvernent cette symbiose dite « actinorhizienne » ont connu des progrès remarquables. Plusieurs gènes symbiotiques ont été identifiés et caractérisés et des programmes d'étude du génome ont été initiés tant sur *Casuarina* que sur la bactérie *Frankia*. L'objet de cette revue est de faire le point sur cette symbiose originale qui pourrait constituer un modèle intéressant pour définir des stratégies permettant de faire fixer l'azote aux céréales.

Mots clés : Fixation biologique de l'azote, *Casuarina*, *Frankia*, nodule actinorhizien, gène symbiotique

Abstract

Casuarina glauca is a fast-growing woody species, well adapted to drought in tropical areas, and able to rehabilitate degraded soils. This tree has the ability to develop a root symbiotic process with the nitrogen-fixing actinobacteria *Frankia*. The symbiotic process leads to the development of root nodules so-called actinorhizae, in which *Frankia* reduces the atmospheric nitrogen into ammonia used by the host plant. In the past years, knowledge on the molecular mechanisms governing this actinorhizal symbiosis have made remarkable progress. Several symbiotic genes were identified and characterized, and genomic studies were initiated both on the host plant *Casuarina* and its symbiont *Frankia*. The purpose of this article is to review the last advances on this original symbiosis that could be a valuable model to develop strategies for transferring the ability of nitrogen fixation into cereals.

Keywords: Biological nitrogen fixation, *Casuarina*, *Frankia*, actinorhizal nodule, symbiotic gene

ملخص

Casuarina glauca

(actinorhizes)

." " ()

(Actinorhizienne)

Les plantes capables de développer une interaction symbiotique avec l'actinobactérie fixatrice d'azote *Frankia* sont appelées plantes actinorhiziennes. On compte environ 260 espèces de plantes actinorhiziennes, réparties en 25 genres et 8 familles [1]. Ce sont, à l'exception des membres de la famille des *Discariaceae*, des arbres et des arbustes que l'on trouve sur tous les continents et sous tous les climats, l'Antarctique étant exclu [2]. Parmi les espèces actinorhiziennes les plus connues, on peut citer l'aulne (*Alnus glutinosa*), le filao (*Casuarina equisetifolia*), l'olivier de bohème (*Eleagnus angustifolia*) ou encore le céanothe (*Ceanothus dentatus*). Comme chez les légumineuses, le processus symbiotique aboutit au développement, sur le système racinaire, de nodosités plus communément appelées nodules actinorhiziens ou actinorhizes, qui abritent le microorganisme. Au sein de ces structures, la plante hôte fournit des substrats carbonés à *Frankia* qui, en retour, transforme l'azote atmosphérique en ammoniac nécessaire à la croissance du partenaire végétal [3, 4].

Moins étudiée que la symbiose Rhizobium-légumineuses, la symbiose actinorhizienne permet une fixation d'azote comparable et joue un rôle important au niveau écologique. Les plantes actinorhiziennes sont en effet des plantes pionnières, que l'on peut qualifier d'édificatrices en raison de leur rôle dans l'évolution de la roche mère vers un sol véritable [5]. En conditions naturelles, il est également observé une association avec des champignons mycorhiziens qui assurent à la fois une meilleure assimilation du phosphate, protègent les racines de certains pathogènes et contribuent à une meilleure résistance à la sécheresse [6].

L'ensemble de ces caractéristiques permet l'utilisation des arbres actinorhiziens pour la réhabilitation de sols dégradés. Dans les régions tropicales arides et semi-arides, certaines espèces actinorhiziennes de la famille des Casuarinacées jouent un rôle environnemental très important. *C. equisetifolia*, *C. cunninghamiana* et *C. glauca* sont en effet plantés le long des zones littorales pour stabiliser les dunes, protéger les cultures du vent et de l'ensablement, et enrichir les sols en éléments organiques dans des activités d'agroforesterie, associant au sein de parcelles agricoles des rangées de Casuarinas espacées d'une dizaine de mètres [7,8]. En Algérie, *Casuarina* est utilisé comme espèce ornementale dans les villes, comme brise-vent par les paysans ou encore pour réhabiliter d'anciennes carrières.

Si les outils de la biologie moléculaire et de la génomique végétale ont tout d'abord bénéficié à des plantes dites « modèles », comme *Arabidopsis thaliana* ou le riz, les progrès techniques fantastiques obtenus ces dernières années permettent désormais des avancées importantes dans la connaissance de plantes d'intérêt diversifiées. Chez les plantes fixatrices d'azote, *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus* se sont imposées comme des modèles pour décrypter les gènes clés du processus conduisant à la symbiose avec Rhizobium. Pour les plantes

actinorhiziennes, des études moléculaires ont été développées par différents groupes de recherche sur *A. glutinosa*, *C. glauca*, *D. glomerata* et *E. angustifolia* [9].

Le développement de techniques d'analyse fonctionnelle des gènes symbiotiques chez *C. glauca*, basées sur une approche d'interférence par l'ARN et des méthodes de transformation génétique bien maîtrisées, ainsi que l'obtention de données comparatives importantes sur les transcriptomes de nodule et de racine, font cependant de cette plante actinorhizienne un modèle pour l'étude du processus d'infection de la plante hôte par *Frankia* [10, 11, 12, 13]. Un bilan des connaissances de la symbiose *Casuarina-Frankia* est présenté dans cette revue, avec un intérêt particulier dédié aux phases précoces de l'interaction. Les données seront situées dans un cadre comparatif avec la symbiose Rhizobium-légumineuse.

Le microorganisme *Frankia*

Frankia est une bactérie filamenteuse, Gram positif, capable de fixer l'azote à l'état libre. Décrite la première fois à la fin du 19^{ème} siècle, il faudra attendre 1982 [14] pour que la première culture pure de *Frankia* symbiotique de *Casuarina* soit obtenue, et à ce jour, il existe encore des souches de *Frankia* qui ne peuvent être cultivées à l'état libre. En culture pure, l'actinomycète différencie des hyphes qui sont la forme végétative, et dans un milieu sans azote, des vésicules généralement sphériques sont observées en position terminale des hyphes. Ces cellules possèdent une enveloppe lipidique composée de multiples couches d'hopanoïdes qui assurent une protection du complexe nitrogénase contre une inactivation par l'oxygène, permettant ainsi la fixation de l'azote [15]. Au sein des nodules de *Casuarina*, les vésicules ne sont cependant pas observées, d'autres mécanismes de protection contre l'oxygène étant impliqués.

En 2007 est publiée la séquence de la souche de *Frankia* CcI3 isolée de nodules de *C. cunninghamiana* [16]. L'analyse révèle que le génome est circulaire, de petite taille (5,43 Mb), qu'il contient 4 499 séquences codantes et possède un GC% égal à 71%. Cette souche possède une spécificité d'hôte étroite, restreinte à quelques espèces du genre *Casuarina*. La recherche d'homologues des gènes *nodA,B,C* impliqués dans la synthèse du squelette du lipochitoooligosaccharide constitutif des facteurs Nod de Rhizobium, a permis d'identifier 3 candidats pour *nodB*, avec un pourcentage d'identité compris entre 35,2% et 48,1% ; l'identité est comprise entre 23,6% et 25,1% pour *nodC* ; en revanche, il n'y a aucun candidat pour *nodA* dans le génome de CcI3, ce qui suggère que les molécules signal de *Frankia* impliquées dans les phases précoces de l'interaction avec le système racinaire actinorhizien ont une structure un peu différente. Malheureusement, l'absence de systèmes d'analyse génétique chez l'actinomycète ne permet pas la validation fonctionnelle de ces candidats ; il n'existe pas non plus de méthode de mutagenèse par transposon qui permettrait de révéler les gènes clés du processus de nodulation chez le partenaire bactérien [9, 17].

Le développement du nodule actinorhizien

Le processus d'infection de *Casuarina* par *Frankia* est dit « intracellulaire », impliquant l'infection de poils racinaires (voir Figure 1) [18]. Le premier signe du processus symbiotique est une déformation des poils absorbants, induite par des molécules de nature inconnue secrétées par *Frankia* lors du contact avec les racines de la plante hôte. Les hyphes pénètrent ensuite dans la zone de courbure d'un poil racinaire, puis sont encapsulés dans une structure équivalente au cordon d'infection des légumineuses. Suite à des divisions dans le cortex de la racine infectée, une structure appelée pré-nodule est observée [19]. Ce pré-nodule contient de larges cellules corticales infectées par *Frankia*, qui fixent l'azote. Le primordium nodulaire est ensuite initié à partir de divisions observées dans le péricycle de la racine, en face d'un pôle de protoxylème, dans une zone proche du pré-nodule. Les hyphes vont ensuite progresser du pré-nodule vers les cellules corticales du lobe nodulaire en formation. Un nodule mature est constitué de plusieurs lobes nodulaires, chacun possédant une vascularisation centrale, et un cortex organisé en plusieurs zones : zone méristématique, zone d'infection, et zone de fixation d'azote ; dans les nodules âgés, une zone de sénescence est observée. Des couches de cellules non infectées, riches en polyphénols, séparent les files de cellules infectées et induisent une compartimentation du lobe nodulaire chez *C. glauca* [20].

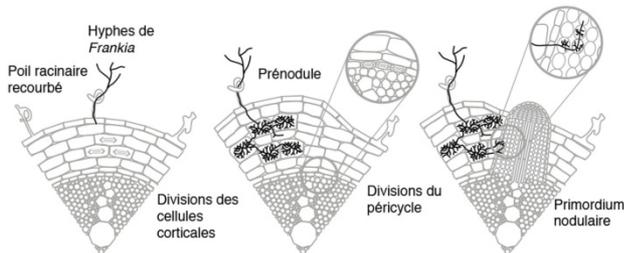


Figure 1 : Processus d'infection intracellulaire du système racinaire de *Casuarina glauca* par *Frankia*.

Approche moléculaire des étapes précoces de la symbiose

Chez les légumineuses, plusieurs gènes impliqués dans la perception et la transduction des facteurs de nodulation (facteurs Nod) de rhizobium ont été isolés sur la base d'approches génétiques. Le criblage de mutants chimiques incapables de former des nodules (Nod-) a permis d'identifier des gènes-clés de la voie de signalisation aux facteurs Nod [21, 22]. Parmi ces gènes, on peut citer par exemple *NFR1&5/LysM/LYK3/NFP*, un récepteur kinase à domaine LysM qui interagirait avec les facteurs Nod ; *DMI1/Castor/Pollux*, une protéine du canal cationique ; *SymRK/DMI2/NoRK*, un récepteur de type LRR ; *DMI3/CCaMK*, une « Calcium & Calmodulin-dépendant kinase » ; *NSP1*, *NSP2* et *NIN*, des régulateurs transcriptionnels. Ces gènes forment ainsi une cascade signalétique indispensable au dialogue entre les deux partenaires et à l'établissement de la symbiose. De plus, certains gènes de cette voie de signalisation sont

indispensables à l'établissement de symbioses endomycorhiziennes à arbuscules (AM).

Chez les plantes actinorhiziennes, la recherche de gènes symbiotiques a été effectuée soit par criblage de banques d'ADNc de nodosités, soit grâce aux homologies de séquences présentes avec des gènes symbiotiques de légumineuses. Récemment, l'homologue du gène *SYMRK* a été isolé. Ce gène symbiotique représente le premier élément commun à l'ensemble des voies de signalisation conduisant à des endosymbioses racinaires. Le gène *CgSYMRK* est exprimé dans les racines et les nodules de *C. glauca*, et son extinction obtenue par une approche d'interférence d'ARN (ARNi) conduit à une diminution significative de la nodulation et de la mycorhization. La complémentation d'un mutant *symrk* de lotier par *CgSymRK* restaure la nodulation et la mycorhization. Ces résultats indiquent que *CgSymRK* est essentiel à la nodulation et à la mycorhization chez *Casuarina*, et qu'il est fonctionnellement équivalent au gène *SymRK* de légumineuse [23].

Par ailleurs, des collections d'ESTs (Étiquettes de Séquences Exprimées) de nodules et de racines de *C. glauca* ont été obtenues [12, 13]. L'analyse du transcriptome de *Casuarina* lors des étapes précoces de la nodulation a permis d'identifier des homologues de la plupart des gènes de la voie de signalisation symbiotique des légumineuses comme les gènes *LysM-RLKS*, *DMI1*, *DMI3/CCaMK*, *NSP* ou *NIN* [13]. Ces résultats suggèrent que les symbioses actinorhiziennes et légumineuse-*rhizobium* partagent une cascade signalétique commune (Figure 2) et l'ensemble des travaux réalisés renforce l'hypothèse d'un mécanisme génétique universel pour les endosymbioses racinaires.

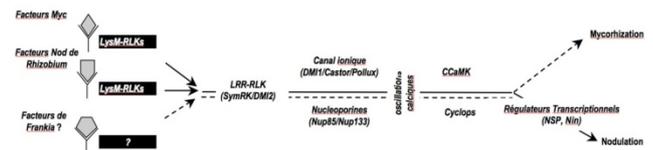


Figure 2 : Éléments génétiques communs partagés par les endosymbioses racinaires.

Représentation simplifiée de la voie de signalisation commune conduisant à la nodulation et à l'endomycorhization. Dans la symbiose *Frankia*-plantes actinorhiziennes, on retrouve la plupart de ces éléments génétiques. Les études fonctionnelles des gènes de *C. glauca* présentant des homologies avec les gènes symbiotiques de légumineuses sont en cours.

Un modèle adapté pour le transfert de la fixation d'azote aux céréales ?

L'un des enjeux de la compréhension du processus symbiotique de fixation d'azote est de pouvoir transférer cette propriété à des plantes incapables de développer des nodules, et en particulier les céréales [24].

La consommation d'engrais à l'échelle mondiale a augmenté de 40% entre 1980 et 2006. La production industrielle d'azote s'effectue grâce au procédé Haber-

bosch destiné à synthétiser de l'ammoniac (NH₃) par hydrogénation du diazote (N₂) gazeux atmosphérique avec le dihydrogène (H₂) gazeux. Ce processus est très coûteux, car le marché du pétrole et du gaz influence le cours des engrais azotés. Par ailleurs, les engrais azotés sont source de risques environnementaux et sanitaires importants. En effet, sous forme chimique (ion NO₃⁻ dit « nitrate »), l'azote est particulièrement soluble dans l'eau, et peut alors être à l'origine d'une eutrophisation du milieu. On sait également que les nitrates et les nitrites ont plusieurs effets sur la santé.

Plusieurs avancées récentes sont encourageantes dans la perspective d'un transfert de fixation symbiotique par exemple chez le riz ou le maïs. D'une part, comme pour la grande majorité des végétaux terrestres, les céréales sont capables de s'associer aux champignons mycorhiziens et les nombreuses données résultant des programmes de séquençage des génomes de céréales ont permis d'identifier des gènes homologues à ceux déjà mis en évidence chez les légumineuses modèles impliqués dans le processus de mycorhization. Comme indiqué dans le paragraphe précédent, certains de ces gènes sont communs au processus de nodulation et donc susceptibles d'être détournés vers un programme génétique permettant l'interaction avec des bactéries fixatrices d'azote.

D'autre part, les données moléculaires et génomiques générées sur les légumineuses ont apporté ces dernières années des connaissances précises sur les phases de reconnaissance nécessaires à la pénétration et à l'accommodation du microorganisme symbiotique dans la plante hôte [21, 25]. La conservation de certains de ces mécanismes chez les plantes actinorhiziennes permet de confirmer le rôle clé de certains gènes [23] et d'apprécier les modifications nécessaires pour reproduire chez les céréales un programme génétique aboutissant à la pénétration d'un microorganisme fixateur d'azote dans le système racinaire. Le lobe nodulaire actinorhizien qui se rapproche de par son origine et sa structure à une racine latérale modifiée, pourrait fournir un modèle particulièrement approprié pour tenter de noduler les céréales. De plus, le microorganisme *Frankia* présente également des caractéristiques intéressantes [9, 26]. Contrairement aux Rhizobia qui induisent des nodules sur des plantes d'une seule famille, celle des légumineuses ou Fabacées, *Frankia* interagit avec 8 familles de plantes différentes. La différenciation de vésicules chez *Frankia* permet également au microorganisme de protéger naturellement la nitrogénase de l'inactivation par l'oxygène.

Pour l'Algérie, ces recherches sont de première importance puisque les céréales sont à la base du système alimentaire, le blé représentant 88% des céréales consommées. Avec les progrès réalisés dans le séquençage des génomes végétaux complexes, les recherches sur le blé devraient progresser dans les prochaines années et conduire à l'introduction et l'expression de caractères d'intérêt agronomiques.

CONCLUSIONS

Avec des valeurs égales à 116 kg d'azote fixé par hectare et par an dans des plantations de Casuarina, les plantes actinorhiziennes constituent, après les légumineuses, le second groupe de plantes importantes capables de fixer l'azote [27]. Elles ont démontré toute leur utilité dans certains pays du Sud, comme par exemple en Egypte pour lutter contre la désertification, ou au Sud de la Chine pour protéger les fermes contre les typhons et les tsunamis.

L'étude comparative du mécanisme d'infection de *Casuarina* par *Frankia*, avec celui des légumineuses modèles *M. truncatula* et *L. japonicus*, permettra de mettre en évidence les mécanismes communs ou spécifiques développés lors de ces endosymbioses fixatrices d'azote [28, 29]. De la comparaison avec les symbioses endomycorhiziennes qui concernent 80% des plantes terrestres, devraient naître des stratégies innovantes pour élargir la fixation biologique de l'azote aux céréales. Si cet objectif a longtemps été considéré comme très complexe à réaliser, les connaissances générées sur la signalisation, la perception des signaux symbiotiques et leur transduction, ouvrent la voie à moyen terme à des applications qui seront de première importance en agronomie pour limiter l'utilisation des engrais azotés.

REFERENCES

- [1]- Wall L.G., « The actinorhizal symbiosis », *J. Plant Growth Reg.*, Vol. 19 (2000), pp. 167-182.
- [2]- Dawson J.O., « Ecology of actinorhizal plants », *Nitrogen fixation research: origins and progress*, vol VI: Nitrogen-fixing Actinorhizal symbioses, Pawlowski K., Newton W.E. (eds), (2008), Springer, pp. 199-234.
- [3]- Pawlowski K., « Induction of actinorhizal nodules by *Frankia* », *Prokaryotic symbionts in plants*, Microbiology Monographs, vol. 8 (2009), Pawlowski K. (ed.), Münster, Germany, pp. 127-154.
- [4]- Persson T., Huss-Danell K., « Physiology of actinorhizal nodules », *Prokaryotic symbionts in plants*, Microbiology Monographs, vol. 8 (2009), Pawlowski K. (ed.), Münster, Germany, pp. 155-178.
- [5]- Moiroud A., « Diversité et écologie des plantes actinorhiziennes », *Acta Bot. Gall.*, Vol. 143 (1996), pp. 651-661.
- [6]- Diem H.G., « Les mycorhizes des plantes actinorhiziennes », *Acta bot. Gallica*, Vol. 143 (1996), pp. 581-592.
- [7]- Diem H.G., Dommergues Y.R., « Current and potential uses and management of *Casuarinaceae* in the tropics and subtropics », *The biology of Frankia and actinorhizal plants*, Schwintzer R., Tjepkema J.D. (eds) (1990), Academic press Inc., San Diego, pp. 317-342.

- [8]- Zhong C., Zhang Y., Chen Y., Jiang Q., Chen Z., Liang J., Pinyopusarek K., Franche C., Bogusz D., « *Casuarina* research and applications in China », Vol. 50 (2010), pp. 107-114.
- [9]- Franche C., Lindström K., Elmerich C., “Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants”, *Plant Soil*, Vol. 321(2009), pp. 35-59.
- [10]- Franche C., Diouf D., Le Q.V., N'Diaye A., Gherbi H., Bogusz D., Gobé C., Duhoux E., “Genetic transformation of the actinorhizal tree *Allocasuarina verticillata* by *Agrobacterium tumefaciens*”, *Plant J.*, Vol. 11 (1997), pp. 897-904
- [11]- Gherbi H., Nambiar-Veetil M., Zhong C., Félix J., Autran D., Girardin R., Vaissayre V., Auguy F., Bogusz D., Franche C., “Post-transcriptional gene silencing in the root system of the actinorhizal tree *Allocasuarina verticillata*”, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, Vol. 21 (2008), pp. 518-524.
- [12]- Hocher V., Auguy F., Argout X., Laplaze L., Franche C., Bogusz D., “Expressed sequence –tag analysis in *Casuarina glauca* actinorhizal nodule and root”, *New Phytol.*, Vol. 169 (2006), pp. 681-688.
- [13]- Hocher V., Alloisio N., Auguy F., Fournier P., Doumas P., Pujic P., Gherbi H., Queiroux C., Da Silva C., Wincker P., Normand P., Bogusz D., “Transcriptomics of actinorhizal symbioses reveals homologs of the whole common symbiotic signaling cascade», *Plant Physiol.*, Vol. 156 (2011), pp. 700-711.
- [14]- Diem H.G., Gauthier D., Dommergues Y., “Extranodular growth of *Frankia* on *Casuarina equisetifolia*”, *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 15 (1982), pp. 181-184.
- [15]- Berry A.M., Harriott O.T., Moreau R.A., Osman S.F., Benson D.R., Jones A.D., “Hopanoid lipids compose the *Frankia* vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 90 (1993), pp. 6091-6094.
- [16]- Normand P., Lapierre P., Tisa L.S., Gogarten J.P., Alloisio N., Bagnarol E., Bassi C.A., Berry A.M., Bickhart D.M., Choisine N., Couloux A., Cournoyer B., Cruveiller S., Daubin V., Demange N., Francino M.P., Goltsman E., Huang Y., Martinez M., Mastronunzio J.E., Mullin B.C., Nieman J., Pujic P., Rawnsley T., Rouy Z., Schenowitz C., Sellstedt A., Tvaers F., Tomkins J.P., Vallenet D., Valverde C., Wall L., Wang Y., Medigue C., Benson D.R., “Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography”, *Genome Res.*, Vol. 17 (2007), pp. 7-15.
- [17]- Lavire C., Cournoyer B., “Progress on the genetics of the N₂-fixing actinorhizal symbiont *Frankia*”, *Plant Soil*, Vol. 254 (2003), pp. 125-137.
- [18]- Duhoux E., Diouf D., Gherbi H., Franche C., Ahée J., Bogusz D., « Le nodule actinorhizien », *Acta bot. Gallica*, Vol. 143(1996), pp. 593-608.
- [19]- Laplaze L., Duhoux E., Franche C., Frutz T., Svistoonoff S., Bisseling T., Bogusz D., Pawlowski K., “*Casuarina glauca* prenodule cells display the same differentiation as the corresponding nodule cells”, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, Vol. 13 (2000), pp. 107-12.
- [20]- Laplaze L., Gherbi H., Frutz T., Pawlowski K., Franche C., Macheix J.-J., Auguy F., Bogusz D., Duhoux E., « Flavan-containing cells delimit *Frankia*-infected compartments in *Casuarina glauca* nodules », *Plant Physiol.*, Vol. 121(1999), pp. 113-122.
- [21]- Oldroyd G.E.D., Downie J.A., “Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes”, *Ann. Rev. Plant Biol.*, Vol. 59 (2008), pp. 519-546.
- [22]- Kouchi H., Imaizumi-Anraku H., Hayashi M., Hakoyama T., Nakagawa T., Umehara Y., Suganuma N., Kawaguchi M., « How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground », *Plant Cell Physiol.*, Vol. 51(2010), pp. 1381-97.
- [23]- Gherbi H., Markmann K., Svistoonoff S., Estevan J., Autran D., Giczey G., Auguy F., Péret B., Laplaze L., Franche C., Parniske M., Bogusz D., “*SymRK* defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with AM fungi, rhizobia and *Frankia* bacteria”, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, Vol. 105 (2008), pp. 4928-4932
- [24]- Charpentier M., Oldroyd G., “How close are we to nitrogen-fixing cereals?”, *Cur. Opin. Plant Biol.*, Vol. 13 (2010), pp. 556-564.
- [25]- Madsen L.H., Tirichine L., Jurkiewicz A., Heckmann A.B., Bek A.S., Ronson C.W., James E.K., Stougaard J., “The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*”, *Nature com.*, Vol. 1 (2010), pp.1-12.
- [26]- Normand P., Fernandez M.P., “Evolution and diversity of *Frankia*”, *Prokaryotic symbionts in plants*, Microbiology Monographs, vol. 8 (2009), Pawlowski K. (ed.), Münster, Germany, pp. 103-125.
- [27]- Dommergues Y., “La fixation d’azote chez les plantes actinorhiziennes et ses applications”, *Acta. Bot. Gallica*, Vol. 143 (1996), pp. 663-680.
- [28]- Vessey J.K., Pawlowski K., Bergman B., “Root-based N₂-fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp and cycads”, *Plant Soil*, Vol. 274 (2005), pp. 51-78.
- [29]- Pawlowski K., Sprent J., “Comparison between actinorhizal and legume symbiosis”, *Nitrogen-fixing actinorhizal symbioses* (2008), Pawlowski K., Newton WE (eds), Dordrecht, Springer Netherlands, pp. 261-288.