

INTERACTION DU MANGANESE ET DU STRESS HYDRIQUE SUR LA FIXATION SYMBIOTIQUE DE L'AZOTE CHEZ LE POIS CHICHE (*Cicer arietinum*)

OUNANE S.M.⁽¹⁾, OUNANE G.⁽¹⁾, GHALMI N.⁽¹⁾,
DJEBARA M.⁽²⁾, ALKAMA N.⁽³⁾, BEKKI A.⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Institut National Agronomique. Hassan Badi, El Harrach Alger,

⁽²⁾ Université Houari Boumediene, Alger

⁽³⁾ Université de Tizi Ouzou

⁽⁴⁾ Université d'Es-Senia, Oran

E-mail : ounane_1999@yahoo.com et s.ounane@ina.dz

Tel : 021521987 Fax : 021822729

RESUME

Les plants de pois chiche (variété ILC3279) sont cultivés sous serre dans des pots remplis de sable de rivière et inoculés avec la souche IC2018. Le stress hydrique est provoqué par arrêt de l'arrosage pendant 8 jours au stade floraison. Cette contrainte se traduit par une baisse importante de l'activité réductrice d'acétylène (ARA).

Des corrélations entre le stress hydrique, les uréides, le manganèse et l'ARA sont mise en évidence chez le pois chiche. Le stress hydrique provoque une accumulation des uréides dans les feuilles qui serait due à un ralentissement de l'activité amidohydrolase. Cette accumulation provoque leur retour dans les nodules (feedback) où leur concentration serait responsable de l'inhibition de l'activité nitrogénase. Le manganèse est le cofacteur de l'amidohydrolase, enzyme responsable de la dégradation des uréides.

Des apports croissants en cet élément stimulent l'activité de cette enzyme, accélèrent la dégradation des uréides dans les feuilles et par conséquent améliorent la fixation N₂ sous contrainte hydrique. Ils permettent aussi une augmentation de la masse du nodule individuel à partir de 4 mM qui s'accompagne d'un accroissement de l'ARA jusqu'à 8 mM de Mn.

Le but de cette étude est de montrer l'effet du manganèse sur la dégradation des uréides foliaires et son impact sur la fixation de l'azote (ARA) chez le pois chiche cultivé sous contrainte hydrique.

Mots clés : pois chiche, stress hydrique, uréides, manganèse, fixation azote.

ABSTRACT

Chick-pea plants (*Cicer arietinum* L.) cv. ILC3279 were cultivated under greenhouse conditions in pots filled with river sand and were inoculated with *Mesorhizobium ciceri* strain IC2018. Water stress was imposed by stopping watering during 8 days at the flowering stage. This water deficit resulted in a significant reduction of the acetylene reducing activity (ARA).

In the present work, correlations between water stress, ureides, manganese and ARA are highlighted. Water stress causes ureide accumulation in leaves which is the consequence of the inhibition of the amidohydrolase activity; this accumulation induces their return to the nodules. This feedback mechanism involving ureide level would be responsible for the inhibition of nitrogenase activity.

Manganese is the co-factor of the amidohydrolase, the enzyme responsible for ureide degradation. Mn Applications stimulate the activity of this enzyme, accelerate ureide degradation in leaves and consequently improve N₂ fixation under water deficit conditions. It allows also an increase in the individual nodule mass starting from 4 mM which is accompanied by an increase in acetylene-reducing activity up to 8 mM of Mn.

This study was conducted to evaluate the effect of manganese on leaf ureide degradation and its impact on nitrogen fixation of chick-pea cultivated under water deficiency.

ملخص

نباتات الحمص صنف ILC3279 تمت زراعتها داخل بيت بلاستيكي على مستوى بيت أصيصات ملأت برمال الواد و طعمت ببكتيريا الريزيبيوم صنف IC 2018. هاته النباتات عرضت لإجهاد مائي خلال فترة الإزهار لمدة 8 أيام. تأثير الإجهاد المائي تبين من خلال انخفاض مهم لنشاط تحويل الأستيلين. عدة ارتباطات لوحظت بين الإجهاد المائي، الإيرويدات، المنغيز، و نشاط تحويل الأستيلين عند نبات الحمص.

الإجهاد المائي سبب في تجميع الإيرويدات في الأوراق التي كانت سبب في تباطؤ نشاط الأنزيم المسؤول على تحليل النشاء. هذا التجميع سبب إرجاعها بالمقابل إلى العقد البكتيرية حيث أن تركيزها أدى إلى انخفاض عمل الأنزيم المسؤول على تثبيت الأزوت الجوي.

يعتبر المنغيز مضاعف محدد للأنزيم المسؤول على تحليل الإيرويدات. إن إضافة كميات متصاعدة من المنغيز يلعب دور كبير في تنشيط عمل هذا الأنزيم و بالتالي تحسين تثبيت الأزوت تحت ظروف الإجهاد المائي. كما تسمح بارتفاع كتلة العقدة البكتيرية بالتزامن مع ارتفاع نشاط تحويل الأستيلين و هذا بإضافة كمية محصورة بين 4 و 8 ميلي مول من المنغيز.

الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير دور المنغيز على تحليل الإيرويدات في الأوراق و بالتالي تأثيره على تثبيت الأزوت الجوي عند نبات الحمص المزروع تحت الإجهاد المائي.

الكلمات المفتاحية : نبات الحمص، الإجهاد المائي، الإيرويدات، المنغيز، تثبيت الأزوت.

1. INTRODUCTION

Chez les légumineuses, le stress hydrique se traduit généralement par une baisse de la fixation symbiotique de l'azote. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce mécanisme, notamment celui qui met en cause le ralentissement de la dégradation des uréides dans les feuilles et leur retour au niveau des nodules (SERRAJ *et al.* 1999a).

Les uréides (allantoïne et allantoate) sont les produits de la fixation N₂ chez la plupart des légumineuses. Ils sont transportés des nodules vers les feuilles où ils sont dégradés naturellement grâce à l'amidohydrolase (Winkler *et al.*, 1987). Pendant une contrainte hydrique, le fonctionnement de cette enzyme est ralenti, provoquant ainsi une accumulation des uréides dans les feuilles (De SILVA *et al.*, 1996; SERRAJ et SINCLAIR, 1996; PURCELL *et al.*, 1998). Par feedback, ces uréides retournent aux nodules dans la sève du phloème et leur accumulation provoque l'inhibition de la nitrogénase (SERRAJ *et al.*, 1999a).

Le taux d'accumulation des uréides en réponse à un déficit hydrique est variable suivant les variétés ou les écotypes. Cette variabilité existe chez le soja, avec notamment le cultivar « Jackson » réputé tolérant à la sécheresse et qui accumule moins d'uréides que les cultivars sensibles (SERRAJ et SINCLAIR, 1996; PURCELL *et al.*, 1998). Par conséquent, la plus grande capacité de fixation N₂ chez « Jackson » pendant la sécheresse peut être associée à son aptitude à maintenir les uréides des feuilles, à une concentration moindre par rapport aux cultivars sensibles. Ce cultivar a été largement étudié pour comprendre les mécanismes impliqués lors d'un stress hydrique.

SERRAJ *et al.* (1999b) observent une baisse de l'ARA après une application de 10 mM d'allantoate aux racines de soja en culture hydroponique. Le cultivar de soja « Jackson » dont la fixation N₂ est tolérante à la sécheresse, accumule moins d'uréides dans les feuilles que le cultivar sensible KS4895 (PURCELL *et al.*, 1997 ; SERRAJ *et al.*, 1997).

D'une population initiale de 3000 lignées de soja soumise au test RAU (Relative Abondance Uréides) pour évaluer la fixation N₂ sous contrainte hydrique, huit ont été identifiées pour leur tolérance à la sécheresse grâce à la faible teneur en uréides de leurs feuilles (SINCLAIR *et al.*, 2000).

Ces géotypes sont actuellement étudiés comme modèle pour comprendre les mécanismes physiologiques de la régulation de la fixation N_2 . Il est connu cependant que la fixation N_2 est un processus complexe qui implique la formation du nodule, l'activité du nodule, le transport des produits entre les nodules et les feuilles et tous les processus biochimiques dans les feuilles. Il est donc possible qu'il y ait plusieurs mécanismes impliqués dans la régulation de la fixation N_2 de ces géotypes.

L'importance du manganèse dans le maintien de la fixation N_2 en réponse au déficit hydrique a été démontrée en serre (PURCELL *et al.*, 2000). Chez le cultivar de soja KS4895, la fixation N_2 sous stress hydrique modéré représente 30% par rapport au témoin sans apport de Mn et 111% avec apport de Mn au sol. Par contre chez « Jackson », le taux de fixation N_2 pendant un stress modéré n'est pas affecté par le Mn alors que chez KS4895, cet ion provoque une diminution de la concentration en uréides dans les feuilles, accompagnée d'une augmentation de la fixation N_2 (PURCELL *et al.*, 2000).

Des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer la réponse de l'amidohydrolase aux différentes sources de manganèse et pour déterminer l'emplacement du pool de manganèse et des uréides dans la plante et comment un apport supplémentaire de manganèse et la sécheresse affectent ce pool.

Le stress hydrique modifie aussi la teneur en manganèse des feuilles. Il provoque une augmentation au premier jour et une diminution au 14ème jour de stress de la concentration en manganèse des feuilles (PURCELL *et al.*, 2000). Cette diminution serait due en partie à la remobilisation du manganèse des vieilles feuilles aux plus jeunes (MARSCHNER, 1995).

En l'absence d'une teneur suffisante en manganèse dans les feuilles, l'activité amidohydrolase diminue, provoquant ainsi une accumulation des uréides dans les feuilles. Par feedback, ces uréides reviennent aux nodules dans la sève du phloème et leur accumulation provoque l'inhibition de la nitrogénase. La présence d'une concentration suffisante en manganèse dans les feuilles peut accélérer le catabolisme des uréides et prévenir ainsi une inhibition par feedback de la nitrogénase dans les nodules. A partir de ces données nous avons essayé de vérifier l'hypothèse que l'apport de manganèse pourrait atténuer l'action inhibitrice des uréides sur l'activité de la nitrogénase chez le pois chiche soumis à une contrainte hydrique.

2. MATERIEL ET METHODES

L'essai a été réalisé en serre dans des pots avec un substrat composé de sable de rivière. Les plantules de pois chiche (ILC3279) issues de la germination des graines au laboratoire sont repiquées en pots puis inoculées avec la souche IC2018 (ICRISAT). L'alimentation minérale des plantes est assurée par une solution nutritive contenant les éléments suivants : CaCl_2 (3.3 mM), MgSO_4 (2.05 mM), K_2SO_4 (1.25 mM), KH_2PO_4 (0.35 mM), H_3BO_3 (4 μM), ZnSO_4 (1.55 μM), CuSO_4 (1.55 μM), NaMoO_4 (0.12 μM) et FeEDTA (40 μM) (Kalia et Drevon, 1985).

Les uréides sont apportés sous forme d'allantoate (1,5,10,15 μM) et le manganèse sous forme de MnSO_4 (1,4,8,12 μM). Ils sont incorporés à des doses croissantes dans la solution nutritive juste avant emploi.

Le stress hydrique est provoqué par un arrêt de l'arrosage pendant 8 jours au stade floraison.

Dosage des uréides :

Les uréides sont extraits à partir de folioles de la dernière feuille entièrement formée avec 1 ml de NaOH 0.2 M dans un bain marie bouillant pendant 30 mn. L'extrait est ensuite centrifugé et le surnageant entreposé à 4°C. La méthode colorimétrique de Triebel et Vogel (1966) est utilisée pour ce dosage. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{M/g MS}$.

Mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) :

L'activité réductrice d'acétylène (ARA), mise au point par Balandreau et Dommergues (1971), est jusqu'à l'heure actuelle la méthode la plus utilisée pour mesurer la fixation N_2 . Des modifications ont été apportées pour faire des mesures dans des pots. Un couvercle en bois fendu sur un rayon et de même diamètre que le pot permet d'isoler le système racinaire de la partie aérienne. L'application de mastic assure l'étanchéité du dispositif. Un trou dans le couvercle, fermé avec un bouchon en caoutchouc, permet d'introduire et de retirer les gaz à l'aide d'une seringue. Les échantillons d'éthylène sont conservés dans des venojects puis dosés en chromatographie phase gaz (Colonne porapak T de 1,5 m de long, four à ionisation de flamme à 80°C, gaz vecteur N_2 à 30ml/mn). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{moles de C}_2\text{H}_4 / \text{heure plante}$

Dispositif expérimental :

Le dispositif expérimental est une randomisation totale avec un plant par pot et 5 plants par répétition. Les données sont traitées par l'analyse de variance.

3. R E S U L T A T S

1. EFFET DU STRESS HYDRIQUE SUR L'ACCUMULATION DES UREIDES DANS LES FEUILLES

La figure 1 montre une accumulation très importante en uréides dans les feuilles de plantes soumises à une contrainte hydrique sévère, alors que les plantes témoins bien arrosées maintiennent une concentration nettement plus faible et sensiblement stable pendant la même période de stress. Cette accumulation se stabilise à partir du 6^{ème} jour de stress et serait due à une baisse de l'activité amidohydrolase responsable de la dégradation des uréides en NH_3 (WINKLER *et al.*, 1987). L'effet du stress hydrique sur l'activité de cette enzyme est encore mal expliqué. Il a été observé chez le soja par plusieurs auteurs qui ont trouvé une corrélation positive entre le stress hydrique et le taux d'accumulation des uréides dans les feuilles (SERRAJ *et al.*, 1999b; SINCLAIR *et al.*, 2000 ; SINCLAIR *et al.*, 2003).

2. EFFET DE L'ACCUMULATION DES UREIDES DANS LES FEUILLES SUR L'ACTIVITE REDUCTRICE D'ACETYLENE

La figure 2 met en évidence une relation entre la fixation N_2 et le taux d'accumulation des uréides dans les feuilles. L'augmentation de la concentration en uréides dans la solution nutritive se traduit par une forte accumulation de ce dernier dans les feuilles et une diminution brutale de l'ARA à partir de 5 mM. Cette accumulation va être ensuite remobilisée par le transport phloémique vers les différentes parties de la plante et notamment les racines, siège de l'activité nitrogénase (SERRAJ *et al.* 2001). SERRAJ *et al.* (1999b) ont observé une baisse semblable de l'ARA après une application de 10 mM d'allantoate aux racines de soja cultivé en hydroponie.

Néanmoins, le cultivar « Jackson » dont la fixation N_2 est tolérante à la sécheresse (SERRAJ *et al.*, 1997; PURCELL *et al.*, 1997), accumule moins d'uréides dans les feuilles que le cultivar sensible KS4895 (PURCELL *et al.*, 2000) ; de ce fait il est possible de trouver au sein de la diversité d'une espèce, des populations capables de dégrader efficacement les uréides afin d'empêcher leur accumulation dans les feuilles.

3. EFFET DU MANGANESE SUR LE TAUX D'ACCUMULATION DES UREIDES DANS LES FEUILLES

Le manganèse est un cofacteur de l'amidohydrolase qui catalyse la dégradation des uréides. Un apport supplémentaire de Mn permet une stimulation de l'activité de cette enzyme et par conséquent une accélération de la dégradation des uréides. La figure 3 montre l'action du Mn sur le contenu en uréides des feuilles qui s'observe nettement à partir de 4mM de Mn avec une forte baisse de la concentration en uréides des feuilles. Les mêmes observations ont été faites chez le soja par PURCELL *et al.* (2000) qui ont obtenu une baisse en uréides mais avec des concentrations plus faibles de Mn.

Il existe cependant, deux voies de dégradation des uréides, la voie amidohydrolase qui nécessite la présence du Mn et la voie amidinohydrolase qui peut fonctionner sans Mn.

Les génotypes de soja qui n'exigent pas le Mn pour la dégradation des uréides sont généralement tolérants à la sécheresse (VADEZ et SINCLAIR, 2001). De ce fait, il est possible de sélectionner des génotypes sur la base de leur capacité à dégrader les uréides par la voie amidinohydrolase et qui sont susceptibles de présenter une meilleure tolérance de la fixation N_2 au stress hydrique.

4. EFFET DU MANGANESE SUR LA MASSE DU NODULE ET L'ARA.

Le manganèse intervient indirectement sur la masse individuelle d'un nodule et l'ARA en agissant sur le taux d'accumulation des uréides. La figure 4 illustre bien une augmentation de la masse d'un nodule et de l'ARA en fonction des concentrations croissantes de Mn de la solution nutritive. Les concentrations supérieures à 8 μ M ne semblent pas influencer l'ARA qui garde la même valeur jusqu'à 12 μ M de Mn. Ce résultat montre bien l'intérêt d'un

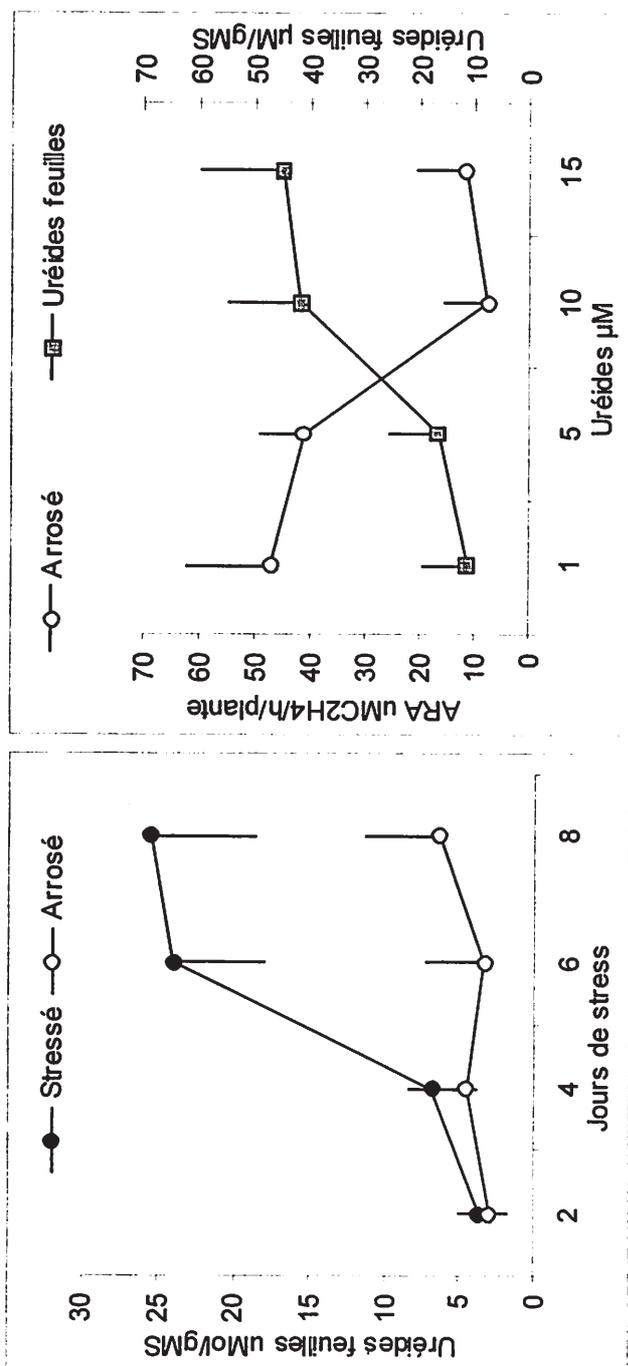


Figure 1 : Effet du stress hydrique sur le contenu en uréides des feuilles au stade floraison. Les barres verticales représentent l'intervalle de confiance (p<0,05)

Figure 2 : Effet des uréides exogènes sur l'ARA et l'accumulation des uréides dans les feuilles au stade floraison. Les barres verticales représentent l'intervalle de confiance (p<0,05)

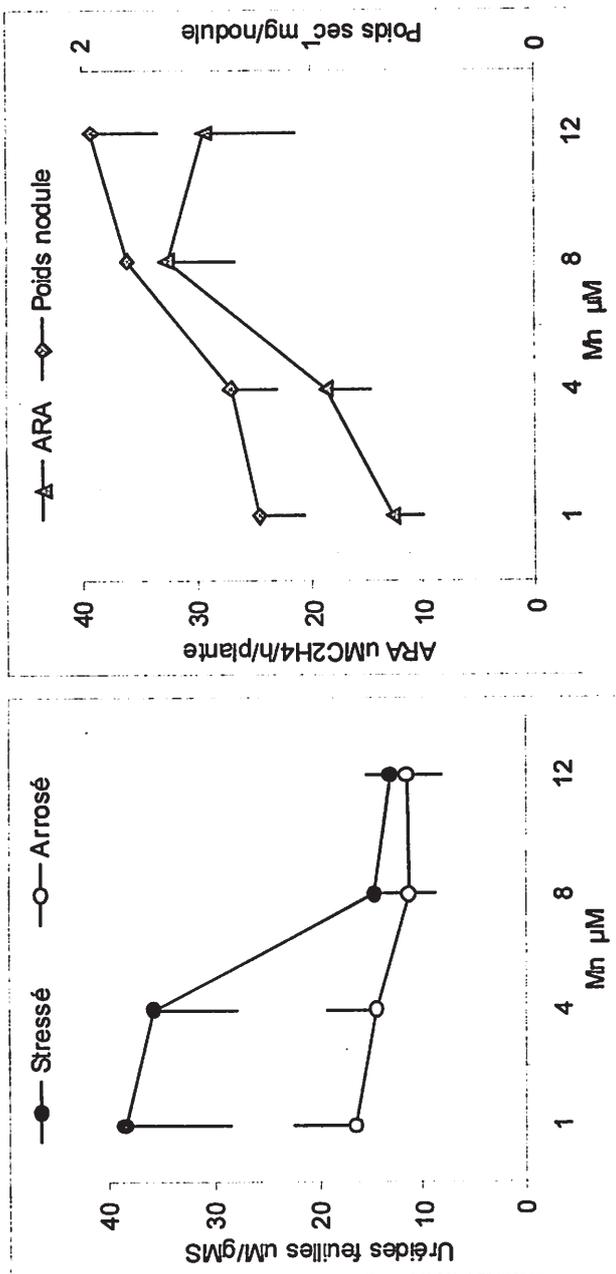


Figure 3 : Effet du Mn sur le contenu en uréides des feuilles au stade floraison chez des plantes stressées pendant 8 jours
 Les barres verticales représentent l'intervalle de confiance (p<0,05)

Figure 4 : Effet du Mn sur le poids sec d'un nodule et sur l'ARA au stade floraison chez des plantes stressées pendant 8 jours.
 Les barres verticales représentent l'intervalle de confiance (p<0,05)

apport supplémentaire de Mn pour améliorer la fixation N₂ sous contrainte hydrique (VADEZ *et al.*, 2006).

L'importance du manganèse dans le maintien de la fixation N₂ en réponse au déficit hydrique a été démontrée aussi chez plusieurs cultivars de soja cultivés en serre (Purcell *et al.*, 2000).

Les applications foliaires sous forme de Mn-EDTA seraient encore plus efficaces pour augmenter la concentration de manganèse, diminuer le contenu en uréides dans les feuilles et améliorer la fixation N₂ (Sinclair *et al.*, 2003).

3. DISCUSSION

Les résultats obtenus dans cette étude confirment la complexité des modifications qui se déclenchent en réponse au déficit hydrique chez le pois chiche (VADEZ *et al.*, 2007). Ils mettent en évidence des relations de cause à effet entre le stress hydrique, le Mn, les uréides et l'ARA. Une dégradation plus importante des uréides, pendant un stress hydrique, se traduit par une diminution de leur concentration dans les feuilles et une interruption des signaux chimiques inhibiteurs entre les feuilles et les nodules qui favorise le maintien de la fixation N₂ (SERRAJ *et al.*, 1999a).

Chez le pois chiche, l'accumulation des uréides dans les feuilles, suite au stress hydrique, se traduit par leur retour dans les nodules (Fig.2). Ce feedback entraîne une forte concentration des uréides qui provoque l'inhibition de l'activité nitrogénase dans les nodules. Cette hypothèse a été appuyée par plusieurs auteurs depuis les travaux de WINKLER *et al.* en 1987 (RICE *et al.*, 1990 ; LUKASZEWSKI *et al.*, 1992 ; GRAHAM *et al.*, 1995 ; De SILVA *et al.*, 1996 ; PURCELL *et al.*, 2000 ; SINCLAIR *et al.*, 2003).

L'inhibition de l'activité nitrogénase par l'application d'uréides exogènes, constitue une preuve supplémentaire en faveur de l'hypothèse d'une régulation « feedback ». Le mécanisme physiologique responsable de l'accumulation des uréides est supposé résulter d'une diminution du catabolisme foliaire des uréides, mais la nature exacte de la molécule chimique impliquée dans le signal reste encore inconnue. SERRAJ *et al.* (2001) ont montré que l'asparagine (Asn) pourrait induire une inhibition de la dégradation des uréides dans les feuilles et par conséquent, leur accumulation dans les différents tissus de la plante. Ces

Les résultats soutiennent l'hypothèse de l'intervention de Asn comme signal de régulation du métabolisme des uréides et de la fixation symbiotique de N₂ sous déficit hydrique.

Le manganèse (Mn) est le cofacteur de l'amidohydrolase et joue un rôle important dans la dégradation des uréides par cette enzyme (IZAGUIRE-MAYORAL et SINCLAIR, 2005). Des apports croissants en cet élément stimulent la dégradation des uréides et améliorent la fixation N₂ sous contrainte hydrique (fig.4). Des résultats analogues ont été obtenus chez le soja par des apports racinaires ou des pulvérisations foliaires de Mn (SERRAJ *et al.*, 1997). Par contre, VADEZ et SINCLAIR (2001) n'ont pas pu observer d'effet, après pulvérisation foliaire avec le Mn, sur l'accumulation des uréides dans les feuilles. Ils l'ont attribué à la présence de fortes concentrations initiales en uréides qui auraient masqué l'action du Mn. Les applications foliaires avec Mn-EDTA peuvent être plus efficaces qu'avec le MnSO₄ à partir du milieu de culture, pour augmenter l'accumulation du manganèse dans les feuilles (VADEZ et SINCLAIR, 2001).

Il existe cependant des contradictions quant à la réponse de l'amidohydrolase aux apports supplémentaires de Mn. Ces contradictions sont renforcées par l'existence de deux voies du catabolisme des uréides : la voie amidohydrolase qui nécessite la présence du Mn et la voie amidinohydrolase qui peut fonctionner sans Mn. VADEZ et SINCLAIR (2001) ont pu montrer que les génotypes de soja qui dégradent les uréides par la voie amidinohydrolase sont généralement plus tolérants au stress hydrique.

Chez le pois chiche, l'application du manganèse a permis une augmentation de la masse du nodule individuel à partir d'une concentration de 4 mM (fig.4). Cette augmentation s'accompagne d'un accroissement de l'ARA jusqu'à 8 mM de Mn. PURCELL *et al.* (1997) ont pu observer chez le cultivar Jackson une augmentation de la taille du nodule après application de 10 mM de Mn. La cause serait une faible concentration en uréides, ou un composé apparenté, transportés aux nodules dans le phloème. La diminution de la concentration en uréides dans la sève du phloème délivrée aux nodules, protège l'activité de la nitrogénase, assure la respiration des bactéroïdes et augmente le flux de l'eau et des photosynthétats ; ce qui se traduit par une augmentation de la taille des nodules et de la fixation symbiotique de l'azote (SINCLAIR *et al.*, 2003).

4. CONCLUSION

Le catabolisme des uréides dans les feuilles joue un rôle important dans la sensibilité de la fixation N_2 au stress hydrique. La voie amidohydrolase de l'allantoate semble avantageuse et peut conférer au pois chiche une tolérance à la sécheresse, surtout dans les sols où la disponibilité du Mn est limitée. Par contre les plantes qui utilisent la voie amidohydrolase ont besoin d'un apport supplémentaire de Mn pour accélérer la dégradation des uréides et préserver une activité normale de la fixation N_2 .

Une autre approche de sélection serait d'évaluer les génotypes de pois chiche identifiés comme tolérants au manque de manganèse et de rechercher ceux qui arrivent à maintenir de basses concentrations en uréides et dont la fixation N_2 est tolérante à la sécheresse sous conditions limitantes en manganèse.

Par conséquent, des apports supplémentaires de Mn (dans le sol ou par pulvérisation foliaire) de même que la sélection de cultivars qui accumulent moins d'uréides dans les feuilles, seraient deux approches fiables pour améliorer la fixation N_2 sous contrainte hydrique.

Le dosage des uréides a été utilisé comme test (RAU : Relative Abondance Uréides) pour sélectionner les génotypes de soja tolérants à la sécheresse. C'est une technique rapide qui permet le screening d'un grand nombre d'écotypes (PURCELL *et al.*, 2000) et qui pourrait être adaptée et appliquée dans les programmes de sélection du pois chiche (BHATNAGAR-MATHUR *et al.*, 2008)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BALANDREAU J, DOMMERGES Y, 1971.-** Mesure in situ de l'activité nitrogénase. C.R. Acad. Sci. Paris, 273, 2020-2023.
- BHATNAGAR-MATHUR P. VADEZ V., SHARMA K.K., 2008.** Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. Plant Cell Reports. 27, 3, 411-424.
- DE SILVA M., PURCELL L.C., KING C.A., 1996.-** Soybean petiole ureide response to water deficits and decreased transpiration. Crop Sci., 6, 36, 611-616.
- GRAHAM M.J., NICKELL C.D., HOEFT R.G., 1995.-** Inheritance of tolerance to manganese deficiency in soybean. Crop Science, 35, 1007-1010.
- ZAGUIRRE-MAYORAL, M. L., SINCLAIR, T. R., 2005.-** Soybean Genotypic Difference in Growth, Nutrient Accumulation and Ultrastructure in Response to Manganese and Iron Supply in Solution Culture. Annals of Botany. 96(1):149-158.
- KALIA V.C., DREVON J.J., 1985.-** Variation in nitrogenase activity (C_2H_2 reduction) during the *in situ* incubation of root nodules of *Glycine max* (L.) Merr. Compte rendu hebdomadaire des séances de l'académie des sciences, Séries III 301, 591–596.
- LUKASZEWSKI K.M., BLEVINS D.G., RANDALL D.D., 1992.-** Asparagine and boric acid cause allantoate accumulation in soybean leaves by inhibiting manganese-dependent allantoate amidohydrolase. Plant Physiol., 99, 1670-1676.
- MARSCHNER H., 1995.-** Mineral nutrition of higher plants, second edition. New York: Academic Press.
- PURCELL L.C., DE SILVA M., KING C.A., KIM W.H., 1997.-** Biomass accumulation and allocation in soybean associated with genotypic differences in tolerance of nitrogen fixation to water deficits. Plant Soil, 196, 101-113.

- PURCELL L.C., SERRAJ R., DE SILVA M., SINCLAIR T.R., BONA S., 1998.-** Ureide concentration in field-grown soybean in response to drought and the relationship to nitrogen fixation. *J. Plant Nutr.*, 21, 949-966.
- PURCELL L.C., KING C.A., ROSALIND A. B., 2000.-** Soybean Cultivar Differences in Ureides and the Relationship to Drought Tolerant Nitrogen Fixation and Manganese Nutrition. *Crop Science*, 40, 1062-1070.
- RICE C.F., LUKASZEWSKI K.M., WALKER S., BLEVINS D.G., WINKLER R.G., RANDALL D.D., 1990.-** Changes in ureide synthesis, transport and assimilation following ammonium nitrate fertilization of nodulated soybeans. *J. Plant Nutr.*, 13, 1539-1553.
- SERRAJ R., SINCLAIR T.R., 1996.-** Nitrogen fixation insensitivity to drought in soybean cultivar "Jackson". *Crop Science*, 36, 961-968.
- SERRAJ R, BONA S, PURCELL LC, SINCLAIR T R, 1997.-** Nitrogen fixation response to water-deficits in field-grown Jackson soybean. *Field Crops Res.*, 52,109-116.
- SERRAJ R., SINCLAIR T.R., PURCELL L.C., 1999A.-** Symbiotic N₂ fixation response to drought. *J. Exp. Bot.*, 50, 143-155 .
- SERRAJ R., VADEZ V., DENISON R.F., SINCLAIR T.R., 1999B.-** Involvement of ureides in nitrogen fixation inhibition in soybean. *Plant Physiol.* ,119, 289-296.
- SINCLAIR T.R., PURCELL L.C., VADEZ , SERRAJ R., KING C.A., NELSON R.V., 2000.-** Identification of Soybean Genotypes with N₂ Fixation Tolerance to Water Deficits. *Crop Science*, 40, 1803-1809.
- SERRAJ R., VADEZ V.; THOMAS R., SINCLAIR T.R., 2001.-** Feedback regulation of symbiotic N₂ fixation under drought stress. *Agronomie* , 21, 621–626 621
- SINCLAIR T. R , VADEZ V. CHENU K., 2003.-** Ureide accumulation in Response to Mn Nutrition by Eight Soybean Genotypes with N₂ Fixation Tolerance to Soil Drying. *Crop Science*, 43, 592-597.
- TRIJBELS F, VOGEL GD, 1966.-** Degradation of allantoin by *Pseudomonas acidovorans*. *Biochimica , Biophysica Acta*, 113, 292–301.
- VADEZ V., SINCLAIR T. R., 2001.-** Leaf ureide degradation and N₂ fixation tolerance to water deficit in soybean. *J. Exp. Bot.* ,1,52 (354), 153 - 159.

- VADEZ V., SINCLAIR T. R., SERRAJ R., PURCELL L.C., 2006.-**
Manganese application alleviates the water deficit-induced decline of N₂ fixation. Plant, Cell & Environment, 23, 5, 497-505.
- VADEZ V. RAO S. SHARMA K.K., BHATNAGAR-MATHUR, DEVI J.M. 2007.-**
DREB1A allows for more water uptake in groundnut by a large modification in the root/shoot ratio under water deficit. International Arachis Newsletter, 27, 27-31.
- WINKLER R.D., BLEVINS D.G., POLACCO J.C., RANDALL D.D., 1987.-**
Ureide catabolism in soybeans. II. Pathway of catabolism in intact leaf tissue. Plant Physiol., 83, 585-591.