

Nodulation in vitro et étapes précoces de l'infection rhizobienne chez *Acacia albida* (Del) (syn *Faidherbia albida*)

YK Gassama/Dia

Département de biologie végétale, faculté des sciences et techniques,
université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal

(Reçu le 19 août 1996 ; accepté le 10 mars 1997)

Summary — **In vitro nodulation and early rhizobial infection in *Acacia albida*.** Infective and effective symbiosis between *Acacia albida* and *Bradyrhizobium* take place when seedlings are inoculated during the first 13 d after germination. During this period (0–13 d), after the apparition of young roots, infectivity (number of new nodules) is optimal; biomass and total nitrogen are significantly higher than compared to inoculation at 23 d. Observation of newly infected roots shows that as with many other leguminous species, infection occurs through a characteristic short and curling root hair. Nodules of *Acacia albida* show two morphological types: spherical and determinated at a young stage (3–4 weeks) and multishaped and undeterminated at adult stage (more than 6 weeks).

***Acacia albida* / *Bradyrhizobium* / date of inoculation / infection / root hair**

Résumé — Chez *Acacia albida*, la meilleure période d'inoculation des semis par *Bradyrhizobium*, se situe dans les 13 premiers jours après la germination. En effet, c'est à la suite d'une inoculation au cours de cette période coïncidant avec l'apparition de nouvelles racines, que l'expression de l'infectivité (nombre de nouveaux nodules formés) est maximale et les critères de biomasse et d'azote total sont significativement plus élevés comparés à une inoculation effectuée à 23 j. L'observation des racines nouvellement infectées a montré que l'infection s'effectue par l'intermédiaire d'un poil absorbant très court recourbé en crosse caractéristique. Les nodules formés sont à croissance « mixte » (de type déterminé entre 3 et 4 semaines et de type indéterminé à un âge supérieur à 6 semaines).

***Acacia albida* / *Bradyrhizobium* / période d'inoculation / infection / poil absorbant**

INTRODUCTION

La plupart des arbres fixateurs d'azote possède l'aptitude à croître rapidement sur des sols extrêmement carencés (Duhoux et Dommergues, 1986). Cette qualité intrinsèque justifie l'intérêt que leur portent de nombreux chercheurs (Dreyfus et Dommergues, 1981 ; Felker et al, 1981 ; Sanginga et al, 1988 ; 1990 ; Danso et al, 1991 ; Dupuy et Dreyfus, 1992 ; Diagne et Baker, 1994).

Acacia albida est une légumineuse tropicale souvent utilisée comme espèce de reboisement (Cazet, 1987) en raison de son potentiel fertilisant. Cependant ce potentiel fertilisant lié en partie à la symbiose fixatrice d'azote atmosphérique, peut être amélioré au moment de l'inoculation (Gassama, 1996 ; N'Doye et al, 1996). Si, en pépinière, l'inoculation avec des souches de *Bradyrhizobium* permet d'accroître significativement la biomasse produite, on ignore quelle est la période la plus favorable à bonne réponse à l'inoculation chez cette espèce.

Par ailleurs, la formation des nodules a été bien étudiée chez les légumineuses tempérées (Dart, 1977 ; Sprent, 1980 ; Newcomb, 1980) ; très peu de travaux ont été consacrés à l'étude du mode d'infection chez les légumineuses tropicales arborées (Dupuy, 1993). Seules certaines espèces tropicales telles *Leucaena leucocephala* (Chen et Rolfe, 1988), *Sesbania rostrata* (Duhoux, 1984), *Aeschynomene afraspera* (Alazard et Duhoux, 1990), *Acacia mangium* (Prin et Reddell, 1993), et *Acacia albida* (Dupuy, 1995) ont été étudiées.

Cet article présente les résultats obtenus concernant l'influence de la période d'inoculation sur l'expression optimale de la nodulation et de la symbiose fixatrice d'azote et rapporte les observations histologiques sur les étapes précoces de l'interaction entre une souche de *Bradyrhizobium* et les tissus de l'hôte, et l'évolution morphologique des nodules chez *Acacia albida*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Les graines d'*Acacia albida* (Provenance 3157N CTFT) sont scarifiées à l'acide sulfurique 98 % pendant 20 min puis sont désinfectées à l'eau de javel pure (16° Cl) pendant 10 min. Après plusieurs rinçages, les graines sont placées aseptiquement dans des germoirs sur un support de coton hydrophile imbibé d'eau distillée. La germination s'effectue dans les 48 h à la pénombre sous une température de 27 °C.

Méthodes

Au total, 24 plantes âgées de 3 j sont transférées en tube pour la phase ultérieure d'inoculation. Le dispositif de culture in vitro est constitué d'un tube en verre pyrex (22 mm × 150 mm) contenant une motte Milcap (Milcap France, SA Trémentines) engainant une baguette de verre creuse ; à l'intérieur de la baguette, est introduit un ruban de papier filtre qui plonge dans la solution nutritive et le liquide, qui remonte par capillarité, imprègne la motte Milcap sans la saturer.

La plante est cultivée sur la motte et son système racinaire est placé entre la paroi du tube et la motte de façon à assurer la visibilité de l'ensemble du système racinaire au cours de sa croissance. L'obturation du tube est effectuée par un bouchon en cellulose qui favorise les échanges gazeux avec l'atmosphère ambiante.

Le milieu minéral liquide sur lequel est cultivée la plante est celui de Broughton et Dilworth (1971), dilué du quart, dépourvu d'azote, dont le pH est ajusté à 6,7. Chaque tube de culture reçoit une quantité de 20 mL de milieu de culture renouvelable au bout de 3 semaines. Le dispositif est stérilisé à l'autoclave avant la mise en culture.

L'inoculation des plants est effectuée avec une culture pure de rhizobium (souche 47.6.4 isolée sur *A. albida*) en phase exponentielle sur YEM liquide (Vincent, 1970) contenant environ 10⁹ bactéries par mL. La suspension bactérienne (1 mL) est déposée aseptiquement au contact de la racine ; la base du tube est recouverte d'un capuchon noir pour simuler l'absence de lumière du sol. Une photopériode (16 h / 8 h), une température de 25 ± 1 °C, et une intensité lumineuse

de 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ déterminent les conditions de la salle de culture.

Nous avons cherché à déterminer la date optimale pour une bonne réponse à l'inoculation. Trois périodes d'inoculation ont été choisies : 0, 10 et 20 j après la mise en culture.

La mesure de l'infectivité se base sur des critères du nombre et du poids sec de nodules formés pendant une période donnée. L'effectivité d'une souche de *Rhizobium* se traduit par l'augmentation de la croissance et de la teneur en azote des plantes inoculées par rapport à des plantes non inoculées.

La hauteur totale de la partie aérienne est mesurée après 3 mois de culture. La biomasse (poids sec) des parties aériennes et racinaires est déterminée après séchage des échantillons (70°C) à l'étuve pendant une semaine.

L'azote contenu dans les différentes parties de la plante (partie aérienne, partie racinaire, nodules) a été dosé par la méthode Kjeldhal (Bremner et Mulvanet, 1982).

La teneur en azote pour un échantillon de 100 mg rapportée au poids sec total des différentes parties, permet de déterminer la quantité totale d'azote contenue dans chaque plante. Toutes les mesures ont été effectuées après 3 mois de culture et les valeurs obtenues ont été analysées grâce à un logiciel de statistique (Anova) en utilisant les tests de Fischer, de Sheffé et Dunnett.

Concernant l'étude des stades précoces de l'infection rhizobienne, des prélèvements de racines infectées ont été effectués 10 puis 15 j après l'inoculation, sur de jeunes plants d'*Acacia albida* nodulés avec la souche de *Bradyrhizobium* 47.6.4.

Nous avons utilisé la méthode décrite par Vasse et Truchet (1989). Les fragments de racines sont d'abord fixés dans un mélange de glutaraldéhyde / cacodylate de sodium puis rincées dans le tampon cacodylate. À la suite d'une décoloration dans une solution concentrée d'eau de javel (16 °Cl) pendant 4 h sous vide partiel, suivie de plusieurs rinçages à l'eau distillée, les racines sont colorées au bleu de méthylène (0,1 %) pendant 5 min puis rincées à l'eau distillée pour éliminer l'excès de colorant.

Les observations se font au microscope phototonique en contraste de phase.

Nous avons également effectué des observations morphologiques sur des nodules jeunes

(âgés de 2 semaines environ) et des nodules matures (4 semaines et au-delà).

RÉSULTATS

Effet de la date de l'inoculation

Cinétique de la nodulation

En suivant la cinétique de formation des nodules durant 5 semaines (fig 1), on constate que l'inoculation à 0 j produit des nodules nombreux, l'expression de l'infectivité est maximale durant la première semaine ; le nombre de nodules nouvellement formés décroît durant les semaines suivantes.

Par contre lorsque l'inoculation est effectuée 10 j après la mise en culture, la formation des nodules est continue et croissante. L'infectivité est très importante, lors des 15 premiers jours (10 nodules en moyenne sont formés par semaine) ; cette expression de l'infectivité s'accroît lors des deux semaines suivantes. Lorsque l'inoculation est faite à 20 j, aucun nodule n'est formé durant la culture.

Efficiencesymbiotique

Le tableau I révèle que les plants inoculés à 0 et 10 j réagissent mieux à l'inoculation que les plants inoculés à 20 j. En effet, l'analyse de variance au seuil de 95 % montre que l'inoculation effectuée au moment de la mise en culture favorise de manière significative une bonne croissance des parties aériennes et racinaires. L'inoculation à 10 j ne donne pas de résultats significativement différents par rapport à l'inoculation à 0 j sauf pour le poids sec des parties racinaires. La quantité d'azote total apportée par l'inoculation et par les réserves cotylédonaires ne varie pas dans les deux traitements. En revanche, lorsque l'inoculation est effectuée à 20 j la nodulation est absente, après 3 mois de culture, la croissance est signifi-

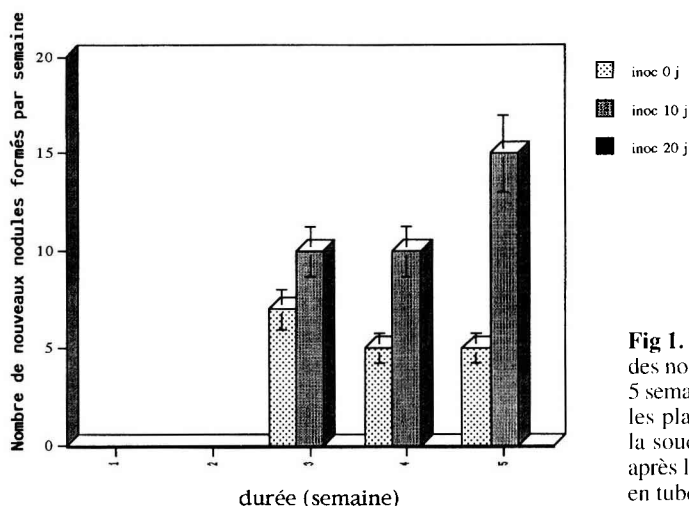


Fig 1. Cinétique de la formation des nodules en tubes au cours de 5 semaines suivant l'inoculation ; les plants ont été inoculés avec la souche 47.6.4 à 0, 10 et 20 j après la mise en place des plants en tube (T0).

Tableau I. Effet de la date d'inoculation avec la souche 47.6.4 sur la croissance, la biomasse et sur la quantité d'azote total par plant chez *A. albida* après 3 mois de culture en tube.

Date d'inoculation (j)	Hauteur totale (cm)	Poids sec nodules (mg)	Poids sec partie aérienne (mg)	Poids sec partie racinaire (mg)	Azote total par plant (mg)
0	14,8 a	5,8 a	89,2 a	24,1 a	3,51 a
10	15,0 a	5,1 a	78,3 a	12,8 b	3,18 a
20	10,1 b	0	70,8 b	11,9 b	2,30 b

Dans chaque colonne les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 95 %.

cativement ralentie, les plants sont jaunes et rabougris en raison de la déficience en azote.

Premières étapes de l'infection

Sur les racines infectées, la présence de la bactérie induit une réaction typique d'enroulement en crosse d'un poil absorbant très court (fig 2A).

Au centre du poil, dans la région interne de la courbure, on distingue un point plus coloré que le reste, qui détermine le point

d'entrée de la bactérie. Le cordon d'infection qui est coloré en bleu se déplace verticalement vers la base du poil, au niveau de la cellule corticale adjacente au poil ; puis il s'oriente horizontalement et parallèlement au grand axe des cellules parenchymateuses corticales (fig 2B).

À quelque millimètres du poil infecté, se forme un primordium nodulaire : des cellules situées tout contre les cellules adjacentes aux vaisseaux conducteurs, au sein du cortex interne, entrent en division active pour donner un amas de cellules de petite taille en forme de dôme qui évoluent plus

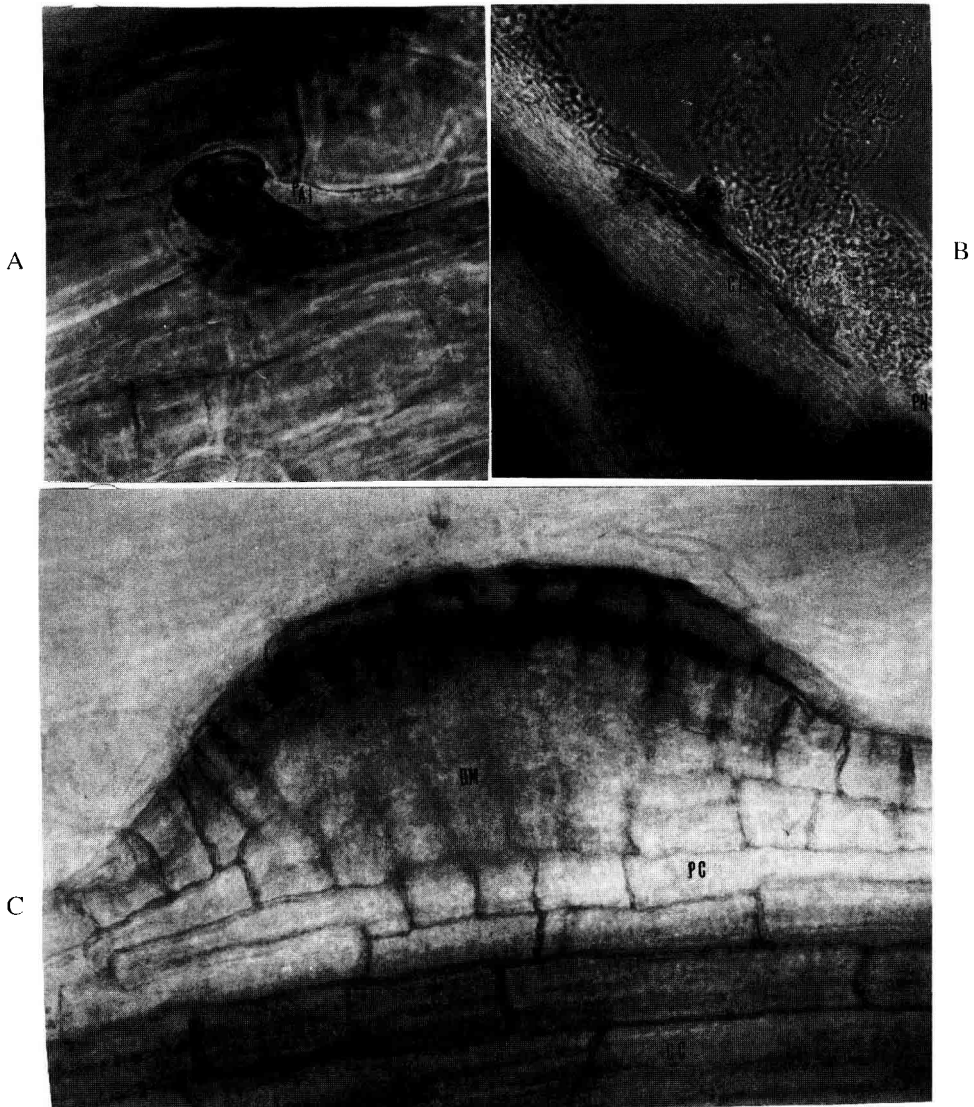


Fig 2.A. Surface d'une racine d'*Acacia albida* infectée par *Bradyrhizobium* ; détail d'un poil absorbant infecté (Pai) très court replié sur lui-même. ($\times 20$.) **B.** Le cordon d'infection dichotomisé ; il s'oriente latéralement en direction d'un primordium nodulaire (pn) qui émerge des tissus du cortex (ci) ($\times 10$.) **C.** Détail d'un primordium nodulaire (pn) observé sur une racine d'*Acacia albida* infectée par *Bradyrhizobium* ; les cellules corticales proches des cellules conductrices (cc) se divisent et s'organisent en dôme méristématique (dm) au sein du parenchyme cortical (pc). ($\times 20$.)

tard vers un nodule méristématique (fig 2C). Le cordon d'infection continue sa migration en direction du méristème nodulaire qu'il envahira plus tard en déversant son contenu à l'intérieur des cellules nouvellement formées.

Les nodules émergent à partir des tissus du cortex après fissuration du rhizoderme (fig 3A).

Chez *Acacia albida*, les nodules sont sphériques au jeune âge (durant les 3 premières semaines de son développement – figure 3B). Lorsque le nodule devient âgé (1 à 2 mois), il s'allonge et/ou se ramifie très souvent. Nous avons observé l'existence de nombreux et nouveaux lobes qui apparaissent au cours du développement du nodule ; ce qui donne la morphologie multilobée des nodules d'*A albida* à l'âge adulte (fig 3C).

DISCUSSIONS

Période d'inoculation

Une inoculation effectuée entre 0 et 10 j après la mise en culture, est plus favorable à la nodulation ; il apparaît en effet qu'à cette période la plupart des organes sont en formation, les racines principales commencent à former des ramifications secondaires ; la présence de racines secondaires favoriserait l'initiation de poils absorbants jeunes qui constituent les sites privilégiés d'infection par la bactérie (Nutman, 1956). Comme cela a été démontré chez *A mangium* (Galiana et al, 1990), lorsque l'inoculation survient entre 0 et 15 j, on obtient une nodulation abondante. Libbenga et Boggers (1974), en confirmant la relation physiologique entre les nodules et les racines latérales, avaient montré que les nodules des légumineuses se forment essentiellement au niveau des zones possédant des poils absorbants en élévation et fréquemment à l'aisselle des racines latérales. Ainsi, il apparaît

que les nodules se forment préférentiellement au niveau de points récents d'activité méristématique et en particulier au niveau de point d'émergence de racines latérales.

Après 20 j de culture sur un milieu axénique, l'inoculation des plants d'*Acacia albida* à cette période, ne produit aucun nodule. De même chez *Acacia mangium*, lorsque l'inoculation est retardée à 30 et 45 j, la réponse à la nodulation est beaucoup plus réduite et par conséquent la fixation est moins bonne (Galiana et al, 1990). On peut ainsi penser que des modifications de la composition du milieu de culture notamment le pH, la faible mobilité des bactéries, les modifications structurales des parois des cellules des poils seraient à l'origine de cette absence de nodulation.

Par ailleurs, chez les légumineuses tropicales, la formation des nodules s'effectuerait par vagues successives alternant avec des phases-plateau au cours desquelles aucun nouveau nodule n'est formé mais les nodules déjà formés augmentent de taille (Galiana et al, 1990).

Infection

Chez *A albida*, la première réaction visible de reconnaissance et d'interaction entre la souche et la plante, est la déformation en crosse d'un poil absorbant très court; par cette voie, la bactérie est emprisonnée dans une boucle et pénètre la cellule du poil après invagination de la membrane plasmique.

L'invasion et l'infection par poils absorbants concerne un nombre très faible de poils chez *A albida* (Dupuy, 1993), ce qui explique probablement la faible quantité de nodules observés chez cette espèce par rapport aux autres espèces de légumineuses.

Ce mode d'infection par poil absorbant se rencontre chez de nombreuses espèces de légumineuses tropicales telles que le soja (Newcomb, 1980), *Leucaena leucocephala* (Chen et Rolfe, 1988), *Acacia senegal*

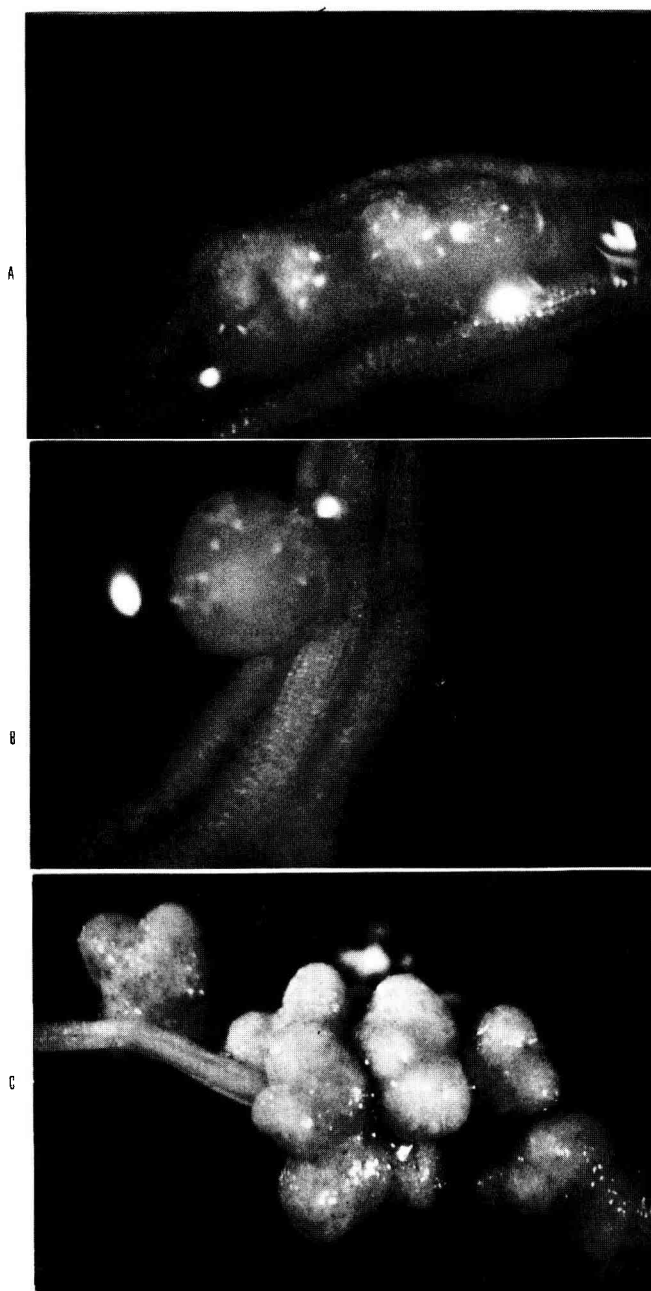


Fig 3.A. Début de formation d'un nodule d'*A. albida* ; on note l'émergence de trois lobes à la suite de la fissuration du rhizoderme, le nodule se développe à partir du tissu cortical (tc). ($\times 20$.) **B.** Jeune nodule d'*A. albida* âgé de 10 à 15 j ; il est de forme arrondie. ($\times 10$). **C.** Nodule d'*A. albida* à un âge plus avancé (25 à 30 j) ; de sphérique, il devient multilobé. ($\times 20$).

(Badji, 1991) et *Acacia mangium* (Prin et Reddell, 1993), comme tempérées (Callaghan et Torrey, 1981 ; Bauer, 1981).

Nous avons aussi constaté que, simultanément à la croissance du cordon d'infection, se différencie à distance du poil infecté, au niveau du cortex interne racinaire, des amas de cellules méristématiques initiatrices d'un primordium nodulaire qui évolue plus tard en nodule fixateur (Newcomb, 1980 ; Sprent et de Faria, 1988 ; Vasse et Truchet, 1989 ; Denarié et al, 1992).

Par ailleurs, *A. albida* présente la particularité de former au jeune âge des nodules sphériques avec un tissu périphérique entourant un tissu central constitué d'une mosaïque de cellules infectées et de cellules interstitielles (Dupuy, 1993). Lorsque le nodule devient allongé il se présente sous la forme allongée et multilobée caractéristique du nodule méristématique à croissance indéterminée. Ces deux types morphologiques à des âges différents chez la même espèce montrent que chez *Acacia albida*, le modèle de croissance est de type « mixte » (déterminé au jeune âge et indéterminé à l'âge adulte) comme cela a été décrit chez une autre légumineuse tropicale *Sesbania rostrata* (N°Doye et al, 1994).

REMERCIEMENTS

Ce travail a pu être réalisé grâce à une subvention de la Fondation internationale pour la science (Fis).

RÉFÉRENCES

- Alazard D, Duhoux E (1990) Development of stem nodules in a tropical forage legume *Aeschynomene afraspera*. *J Exper Bot* 41, 1199-1206
- Badji S (1991) La symbiose *Acacia senegal* (L.) wild-*Rhizobium* sp. Étude des partenaires et optimisation du fonctionnement de la symbiose. Thèse de doctorat de l'université d'Aix-Marseille-III.
- Bauer WD (1981) Infection of legumes by rhizobia. *Ann Rev Plant Physiol* 32, 407-449
- Bremner JM, Mulvanet CS (1982) Nitrogen total. In : *Methods of Soil Analysis, part 2* (Page AL Amer Soc Agron, ed), Madison, WI, 595-624
- Broughton WJ, Dilworth MJ (1971) Control of Lae-haemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J* 125, 1075-1080
- Callaghan DA, Torrey JG (1981) The structure basis of infection root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can J Bot* 59, 1647-1664
- Chen H, Rolfe BG (1988) Rhizobium infection of *Leucaena leucocephala* via the formation of infected threads in curled root hairs. *J Plant Physiol* 332, 379-382
- Danso SKA, Bowen GD, Sanginga N (1991) Biological nitrogen fixation in trees in agroecosystems. *Plant & Soil* 141, 177-196
- Dart PJ (1977) Infection and development of leguminous nodules. In : *A Treatise of Dinitrogen Fixation* (WF Hardy, ed), 367-472
- Denarié J, Debellé F, Rosenberg C (1992) Signaling and host range variation in nodulation. *Ann Rev Microbiol* 46, 497-531
- Diagne O, Baker DD (1994) Quantification of symbiotic nitrogen fixation by *Prosopis juliflora* (Swartz) DC using ¹⁵N isotope dilution methodology. *Soil Biol Bioch* 12, 1709-1710
- Dreyfus B, YR Dommergues (1981) Nitrogen fixing nodules induced by Rhizobium on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. *FEMS Microbiol Lett* 10, 313-317
- Duhoux E (1984) Ontogenèse des nodules caulinaires du *Sesbania rostrata* (légumineuse). *Can J Bot* 62, 982-995
- Duhoux E, Dommergues YR (1986) The use of nitrogen fixing trees in forest and soil restoration in the tropics. In : *Les arbres fixateurs d'azote et l'amélioration de la fertilité des sols*. Actes Séminaire Fis/Orstom 17-25 mars, Dakar, Sénégal (Orstom, ed), 384-400
- Dupuy N (1993) Contribution à l'étude de la symbiose fixatrice d'azote entre *Acacia albida* et *Bradyrhizobium* sp. Thèse de doctorat, université des sciences et techniques de Lille, 158 p
- Dupuy N, Dreyfus B (1992) Presence of Bradyrhizobia under *Acacia albida*. In : *Faidherbia albida in the west African semi-arid tropics*. Proceed of a workshop 22-26 April 1991, ICRISAT, Niamey, Niger (Vandenbelt RJ, ed), 145-148
- Felker P, Clark PR, Laag EA, Pratt FP (1981) Salinity tolerance of the tree legumes : mesquite (*Prosopis glandulosa* var *torreyana*), *P. velutina* and *P. articulata*, algarrobo (*P. chilensis*), kiawe (*P. pallida*) and tamarugo (*P. tamarugo*) grown in sand culture on nitrogen free-media. *Plant & Soil* 61, 311-317
- Galiana A, Alabarce J, Duhoux E (1990) Nodulation in vitro d'*Acacia mangium* Willd (Leguminosae). *Ann Sci For* 47, 451-460

- Gassama YK (1996) Étude des voies d'amélioration génétique par la biologie de la reproduction, les potentialités de clonage in vitro et la symbiose fixatrice d'azote atmosphérique chez *Acacia albida* (Del). Thèse de doctorat d'État, université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal
- Hervouët JP (1992) *Faidherbia albida*: A witness of agrarian transformation In : *Faidherbia albida in the west African semi-arid tropics* : Proceed of a workshop 22-26 April 1991 Icrisat, Niamey, Niger (Vandenbelt RJ, ed), 165-169
- Libbenga KR Boggers RJ (1974) Root nodule morphogenesis. In : *The Biology of Nitrogen Fixation* (A Quispel, ed), North Holland Publishing & Co, Amsterdam, 430-472
- N'Doye I, de Billy F, Vasse J, Dreyfus B, Truchet G (1994) Root nodulation of *Sesbania rostrata*. *J Bacteriol* 176, 1060-1068
- N'Doye I, Gueye M, Danso SKA, B Dreyfus (1995) Nitrogen fixation in *Faidherbia albida*, *Acacia rad-diana*, *Acacia senegal* and *Acacia seyal* estimated using the ^{15}N isotope dilution technique. *Plant & Soil* 172, 175-180
- Newcomb W (1980) Nodule morphogenesis and differentiation In : *Biology of Rhizobiaceae suppl 13 International Review of Cytology* (KL Giles, AG Arthley, eds), Academic Press, 247-294
- Nutman PS (1956) The influence of the legume in root nodule symbiosis. *Biol Rev* 31, 109-151
- Pelissier P (1980) L'arbre dans les paysages agraires de l'Afrique noire. L'arbre en Afrique tropicale : la fonction et le signe. *Cahiers Orstom Série Sciences Humaines* 17, 130-136
- Prin Y, Reddell P (1993) Les stades précoces de la nodulation chez *Acacia mangium*. *Bois et Forêts des Tropiques* 238, 29
- Sanginga N, Mulongoy K, Ayanaba A (1988) Nitrogen fixation of field inoculated *Leucaena leucocephala* L Lam de Witt estimated by the ^{15}N and the difference method. *Plant & Soil* 117, 269-274
- Sanginga N, Bowen GD, Danso SKA (1990) Assessment of genetic variability for N^2 fixation between and within provenances of *Leucaena leucocephala* and *Acacia albida* estimated by ^{15}N labelling techniques. *Plant & Soil* 127, 169-178
- Sprent J, de Faria SM (1988) Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant & Soil* 110, 157-165
- Vasse JM, Truchet C (1989) The Rhizobium-Legume symbiosis: observations of root infection by bright field microscope after staining with methylene blue. *Planta* 161, 487-489
- Vincent JM (1970) *Manual of the Practical Study of Root Nodule Bacteria*, IBP Handbook 15. Blackwell, Oxford.