

# Les arbres actinorhiziens de la famille des *Casuarinaceae* : utilisations et étude de la plasticité racinaire face aux contraintes abiotiques

VALÉRIE HOCHER, HASSEN GHERBI, SERGIO SVISTOONOFF, NATHALIE DIAGNE, VIRGINIE VAYSSAIRE, FLORENCE AUGUY, JOCELYNE BONNEAU, LAURENT LAPLAZE, PATRICK DOUMAS, DIDIER BOGUSZ & CLAUDINE FRANCHE

Equipe Rhizogenèse, UMR DIAPC, IRD (Institut de Recherche pour le Développement), 911 avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France. <http://www.mpl.ird.fr/rhizo>. Email : [Claudine.Franche@ird.fr](mailto:Claudine.Franche@ird.fr)

## Résumé

Les plantes susceptibles d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec l'actinomyète du sol *Frankia* sont appelées plantes actinorhiziennes. Ce sont principalement des plantes ligneuses, capables de coloniser des sols pauvres et de tolérer une grande variété de stress. Dans les régions tropicales arides et semi-arides, les arbres actinorhiziens de la famille des *Casuarinaceae* sont très utilisés pour réhabiliter les sols dégradés, protéger les zones côtières et les cultures de l'ensablement, et fournir du bois de chauffe. Les facultés d'adaptation de *Casuarina* aux sols carencés en éléments nutritifs sont liées à la plasticité racinaire remarquable de cet arbre qui adapte son programme de développement en fonction de son environnement. Les recherches entreprises dans notre laboratoire visent à comprendre les bases moléculaires de cette plasticité chez l'espèce *Casuarina glauca*. Des approches génomiques et des études d'analyse fonctionnelle de gènes candidats sont développées en partenariat avec des laboratoires du Sud.

### Mots clés :

CASUARINA, FRANKIA, SYMBIOSE, NODULE ACTINORHIZIEN, GÈNE SYMBIOTIQUE.

## Introduction

L'échange d'éléments nutritifs prend une importance critique quand la fertilité des sols et la disponibilité en eau sont réduites. Malgré la présence de grandes quantités d'azote dans l'atmosphère (78 % de diazote), sa disponibilité est l'un des facteurs limitants majeurs de la croissance des végétaux. La molécule d'azote est en effet très stable et aucun organisme supérieur n'est capable de la réduire en ammoniac pour la rendre assimilable. Seules des bactéries dites « fixatrices d'azote » sont capables de transformer le diazote atmosphérique en ammoniac (Postgate, 1998). Les systèmes fixateurs d'azote les plus efficaces sont les associations symbiotiques entre bactéries fixatrices d'azote et plantes, permettant un couplage entre photosynthèse et fixation. A côté de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses, il existe un deuxième groupe de plantes symbiotiques toutes aussi importantes, appelées plantes actinorhiziennes. Celles-ci sont capables d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec l'actinomycète du sol *Frankia*. L'établissement de la symbiose aboutit au développement d'un nouvel organe au niveau racinaire, l'actinorhize ou nodule actinorhizien, qui est le site de la fixation d'azote atmosphérique par le microorganisme symbiote (Duhoux *et al.*, 1996 ; Wall, 2000).

Une utilisation raisonnée des plantes fixatrices d'azote, et tout particulièrement des arbres fixateurs d'azote dans le contexte de la « grande muraille verte », est un enjeu majeur pour la réhabilitation des sols dégradés et le maintien de leur fertilité.

## *Casuarina*, un arbre tropical actinorhizien

La famille des *Casuarinaceae* appartient à l'ordre des Casuarinales. Elle compte quatre genres, *Allocasuarina*, *Casuarina*, *Ceuthostoma* et *Gymnostoma*, et constitue un groupe d'environ 90 espèces d'arbres et d'arbustes dont l'aire d'origine s'étend de l'Australie aux îles du Pacifique et au sud-est de l'Asie (National Research Council, 1984). Les *Casuarinaceae* possèdent des rameaux chlorophylliens à activité photosynthétique et des feuilles réduites à des écailles verticillées cornées, limitant les pertes en eau et leur permettant de survivre dans des climats chauds et secs. En association avec *Frankia* et des champignons mycorhiziens, les *Casuarinaceae* peuvent croître sur des sols marginaux carencés en azote et en phosphore. La famille des *Casuarinaceae* comprend des essences tropicales, subtropicales ou méditerranéennes, adaptées à différents climats (arides à humides), à différentes altitudes (0 à 3 000 m) et à différents types de sols (acides à alcalins). L'ensemble de ces propriétés facilite l'introduction de ces arbres en zone tropicale, en dehors de leur aire d'origine.

*Casuarina* joue un rôle essentiel dans les zones tropicales arides et semi-arides pour la production de biomasse et de bois de chauffage (Sénégal, Vietnam) ; il contribue également à la restauration de la fertilité des sols (Inde, Chine), et intervient dans la protection des sols contre les formes d'érosion (fixation des dunes ou des sols érodés en Inde et en Chine) (National research Council, 1984 ; Diem et Dommergues, 1990 ; Diouf *et al.*, 2008).

## La plasticité remarquable du système racinaire de *Casuarina*

L'environnement de la racine est un déterminant majeur de l'architecture racinaire. Comme toutes les plantes, les racines des Casuarinacées sont soumises à de nombreux stress abiotiques et interagissent avec des microorganismes du sol. Cependant, le système racinaire de ces plantes pionnières présente une aptitude particulièrement remarquable à adapter son programme de développement en fonction de son environnement :

- *Casuarina* s'associe à *Frankia* et développe des nodules racinaires qui contribuent à la nutrition azotée de l'arbre ;
- *Casuarina* s'associe également avec des champignons endomycorhiziens arbusculaires et ectomycorhiziens dont les rôles sont multiples : fournir des nutriments tels que le phosphore, améliorer l'absorption de l'eau dans le sol, protéger le système racinaire des pathogènes ; cette association est bénéfique à la fois à la fixation d'azote (augmentation de la biomasse des nodules) et à la croissance de la plante hôte ;
- Enfin, en condition de carence en phosphore ou en fer, un nouveau type racinaire se différencie sur *Casuarina* : les racines protéoïdes ou racines touffes ; ces structures, qui peuvent représenter jusqu'à 5 % de la biomasse racinaire, sont constituées de touffes de radicelles à croissance limitée (2 à 50 mm de long). Le rôle des racines protéoïdes est d'améliorer l'absorption des éléments peu solubles dans le sol ; on a pu montrer que, à mesure que les racines protéoïdes sont formées, la teneur en phosphore et en fer dans les tissus augmente (Neumann et Martinoia, 2002).

Cette plasticité racinaire joue un rôle majeur dans l'adaptation des Casuarinacées aux sols carencés en minéraux (phosphate, phosphore et fer en particulier) ou en azote combiné. L'étude approfondie des mécanismes moléculaires qui permettent la mise en place de ces différents programmes de développement, actinorhize, mycorhize et racine protéoïde, présente donc un intérêt évident au plan écologique et agronomique. Notre équipe a pour objectif de comprendre les bases moléculaires de cette plasticité, en développant à la fois des approches génomiques et d'analyse fonctionnelle de gènes candidats pouvant avoir une fonction clé dans l'adaptation aux stress abiotiques.

## Génomique de l'interaction *Frankia-Casuarina*

Une analyse comparative globale des gènes exprimés (EST) dans les racines inoculées ou non par *Frankia* a été initiée dans l'espèce *Casuarina glauca*. Plus de 40 000 ESTs (séquençage Génoscope) ont été séquencées à partir de différentes banques d'ADNc de *Casuarina* issues des conditions suivantes : (i) nodules fixateurs d'azote induits par *Frankia*, (ii) racines témoins non infectées qui correspondent aux gènes exprimés de manière basale dans les racines, (iii) racines prélevées 2, 4 et 7 jours après l'infection par la bactérie et (iv) racines mycorhizées. Les premiers résultats indiquent que les gènes fortement exprimés dans les nodules appartiennent au métabolisme primaire, à la synthèse de protéines, à la division cellulaire et aux processus de défense (Hocher *et al.*, 2006).

Des puces à ADN "nodule" et "racine" ont été obtenues récemment, et des analyses globales d'expression sont en cours à l'aide de sondes correspondant aux ARNm des racines et de l'ensemble des organes dérivés des racines de *Casuarina* (nodules fixateurs d'azote, ecto et endomycorhizes, racines protéoïdes). Ces études permettront l'identification de gènes présentant des différences d'expression majeures.

## Analyse fonctionnelle de gènes clés permettant l'adaptation du système racinaire

Afin d'aborder ensuite la fonction des gènes chez *C. glauca*, plusieurs outils ont été mis au point. Des techniques de transformation génétique basées sur l'utilisation des vecteurs *Agrobacterium tumefaciens* et *A. rhizogenes* ont été développées avec *C. glauca* (Obertello *et al.*, 2007). Ces avancées ont ensuite permis de développer des approches par ARN interférent aboutissant à éteindre de façon ciblée l'expression des gènes étudiés dans *C. glauca* (Gherbi *et al.*, 2008a). Un gène indispensable à l'établissement du processus symbiotique avec *Frankia* a ainsi pu être caractérisé (Gherbi *et al.*, 2008b).

## Les enjeux de ces recherches

L'ensemble des recherches entreprises sur la symbiose *Casuarina-Frankia* a pour objectif de comprendre comment le système racinaire s'adapte aux sols carencés et modifie son architecture en réponse aux microorganismes du sol. Ces études vont avoir pour conséquence directe une meilleure maîtrise des conditions de nodulation par le microorganisme *Frankia* dans les plantations.

Un autre enjeu majeur est l'identification des molécules « signal » de *Frankia*. Si ces molécules aboutissent au processus symbiotique, elles permettent également une stimulation importante du système racinaire de l'arbre. Le développement d'inoculants bactériens enrichis en ces facteurs pourrait donc avoir des retombées appliquées importantes pour favoriser l'enracinement des arbres actinorhiziens, augmenter de façon significative le taux de nodulation et la croissance des arbres.

## Remerciements

Ce travail a été financé par l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD). Il est effectué dans le cadre de collaborations avec l'Université Cheick Anta Diop de Dakar, le Laboratoire Commun de Microbiologie de Dakar IRD/ISRA/UCAD, le Research Institute of Tropical Forestry (RITF) de Canton, et l'Institute of Forest Genetics and Tree Breeding (IFGTB) de Coimbatore.

## Références

- Diem, H.G., and Dommergues, Y.D. 1990. Current and potential uses and management of *Casuarinaceae* in the tropics and subtropics. In : Schwintzer, C.R. and Tjepkema, J.D. (eds.) *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*. Academic Press, New York, pp. 317-342.
- Diouf, D., Sy, M-O., Gherbi, H., Bogusz, D., and Franche, C. 2008. *Casuarinaceae*. In « Compendium of Transgenic Crop Plants » : Transgenic Forest Tree Species, vol. 9, Kole, C.R., Scorza, R. and Hall, T.C. (eds), Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 279-292.
- Duhoux, E., Diouf, D., Gherbi, H., Franche, C., Ahée, J., and Bogusz, D. 1996. Le nodule actinorhizien. *Acta bot. Gallica* 143 : 593-608.
- Franche, C., Diouf, D., Le, Q.V., N'Diaye, A., Gherbi, H., Bogusz, D., Gobé, C., and Duhoux, E. 1997. Genetic transformation of the actinorhizal tree *Allocasuarina verticillata* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant J.* 11 : 897-904.
- Gherbi, H., Nambiar-Veetil, M., Zhong, C., Félix, J., Autran, D., Girardin, R., Vaissayre, V., Auguy, F., Bogusz, D., and Franche, C. 2008. Post-transcriptional gene silencing in the root system of the actinorhizal tree *Allocasuarina verticillata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21 : 518-524.
- Gherbi, H., Markmann, K., Svistoonoff, S., Estevan, J., Autran, D., Giczey, G., Auguy, F., Péret, B., Laplaze, L., Franche, C., Parniske, M., and Bogusz, D. 2008b. *SymRK* defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with AM fungi, rhizobia and *Frankia* bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105 : 4928-4932.

## Le projet majeur africain de la Grande Muraille Verte

- Hocher, V., Auguy, F., Argout, X., Laplaze, L., Franche, C., and Bogusz, D. 2006. Expressed sequence-tag analysis in *Casuarina glauca* actinorhizal nodule and root. *New Phytol.* 169 : 681-688.
- Laplaze, L., Svistoonoff, S., Santi, C., Auguy, F., Franche, C., and Bogusz, D. 2008. Molecular biology of actinorhizal symbioses. *In* Nitrogen-fixing actinorhizal symbioses. Eds. K Pawlowski and W E Newton. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 235-259.
- National Research Council. 1984. Casuarinas : nitrogen-fixing trees for adverse sites. National Academic Press, Washington DC, USA.
- Neumann, G. and Martinoia, E. 2002. Cluster roots – an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends Plant Sci.* 7 : 162-167.
- Obertello, M., Santi, C., Svistoonoff, S., Hocher, V., Auguy, F., Laplaze, L., Bogusz, D. and Franche, C. 2007. *Casuarina glauca*. *In* : « Economic crops ». Pua, E.C. and Davey, M. R. (eds), Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 433-445.
- Postgate, 1998. Nitrogen fixation. Cambridge University Press, 112 p.
- Wall, L.G. 2000. The actinorhizal symbiosis. *J. Plant Growth Regul.* 19 : 167-182.