

PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE. — Isolement et culture *in vitro* d'une souche infective et effective de *Frankia* isolée de nodules de *Casuarina* sp. Note (\*) de Hoang Gia Diem, Daniel Gauthier et Yvon Dommergues, présentée par Roger Buvat.

On a isolé une souche infective et effective de *Frankia* à partir de nodules d'un hybride de *Casuarina junghuhniana* et *C. equisetifolia*. En culture pure, cette souche présente des hyphes courtes et larges, des sporanges intercalaires allongés mais pas de vésicules. Dans la rhizosphère, cette souche forme des vésicules et des cellules granuliformes.

PLANT PHYSIOLOGY. — Isolation and Cultivation *in vitro* of an Infective and Effective Strain of *Frankia* Isolated from Nodules of *Casuarina* sp.

An infective and effective strain of *Frankia* from root nodules of an hybrid of *Casuarina junghuhniana* and *C. equisetifolia* has been successfully isolated into pure culture. When grown under standard culture conditions the isolate, designated Cj 1-82, exhibited a number of features that differed from those of the non infective strains of *Frankia* previously isolated from *C. equisetifolia*: slower growth, larger and shorter septate hyphae with numerous intercalary elongated sporangia and no vesicles, which probably explains the inability of Cj 1-82 to fix  $N_2$  ex planta and to grow in nitrogen-free media. When inoculated into the rhizosphere of *C. equisetifolia* Cj 1-82 did produce vesicles as well as granule-like cells originating from hyphae fragmentation. Cj 1-82 nodulated *C. equisetifolia* in water culture. Nodules appeared only on root parts bearing young root hairs. After inoculation the root hair tips became deformed and curled within the first 48 h. When the size of inoculum was large enough, root hairs converged towards the inoculum, entrapping it suggesting the involvement of a tactism process. Each root hair contained several infecting hyphae. Nodules were apparent on the roots 14 days after inoculation. Two weeks later the nodules were shown to be effective in nitrogen fixation when acetylene reduction technique was used.

Dans deux publications antérieures ([4], [6]) nous avons rapporté l'isolement de souches de *Frankia* à partir de nodules de *Casuarina equisetifolia*. Mais à partir de ces souches (D 1) et D 11), nous n'avions pu jusqu'à présent obtenir la nodulation de la plante-hôte. Nous rapportons ici l'obtention, pour la première fois, d'une souche infective et effective de *Frankia* à partir de nodules d'un *Casuarina* sp.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les nodules ont été prélevés sur un plant de *Casuarina* en provenance de Thaïlande qui serait un hybride entre *C. equisetifolia* et *C. junghuhniana* [8].

Isolement et culture *in vitro* de la souche de *Frankia*. — Les lobes des nodules ont été lavés et stérilisés superficiellement avec une solution aqueuse de  $OsO_4$  à 3% pendant 4 mn [10]. Après plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile, ces lobes ont été découpés aseptiquement en fragments d'un volume approximatif de 0,5 mm<sup>3</sup>. On a ensuite introduit chaque fragment dans un pilulier de 15 ml renfermant 7 ml de milieu QMOD (11) gélosé à 0,3%. Les piluliers ainsi ensemencés ont été incubés à 28°C pendant 2 mois. Chaque semaine on a éliminé les piluliers où des contaminants s'étaient développés à partir des fragments; dans les piluliers restants, les fragments non contaminés ont donné naissance à des colonies de *Frankia* qui ont été prélevées puis dispersées par agitation. (30-60 mn) dans un flacon serum de 125 ml contenant 50 ml de milieu QMOD liquide et un barreau aimanté. La suspension ainsi obtenue a servi à ensemercer un milieu QMOD gélosé ou non dans lequel des colonies de *Frankia* se sont développées lentement (voir *infra*). La souche pure ainsi obtenue a été appelée Cj 1-82.

Culture des plantules de *Casuarina* en boîte de Petri. — On a placé des plantules stériles de *Casuarina equisetifolia* âgées de 6 à 8 semaines dans des boîtes de Petri en matière plastique (9 cm) avec les racines posées sur le fond et la tige maintenue verticalement par une agrafe fixée sur le bord interne de la boîte. Les couvercles des boîtes de Petri, peints en noir, comportaient une fente pour laisser passer les tiges. Les racines baignaient dans 30 ml de solution nutritive de Crone sans azote [15] diluée au 1/10 où  $Fe_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$  avait été remplacé par Fe EDTA (4 mg/l). On a renouvelé cette solution toutes les semaines.

Test d'infection. — 3 semaines après le transfert des plantules dans les boîtes de Petri, on a inoculé les racines en déposant au niveau des poils absorbants une suspension dense de *Frankia* provenant de la dispersion de colonies obtenues sur milieu QMOD gélosé. 2 à 3 semaines après cette inoculation, on a examiné le développement de *Frankia* dans la rhizosphère [5] et, on a recherché l'apparition des nodules en plaçant les boîtes de Petri sans leur couvercle sous une loupe binoculaire.

Mesure d'activité fixatrice d'azote. — Les plantules de *Casuarina equisetifolia* nodulées par inoculation avec la souche pure de *Frankia* ont été repiquées dans des pots renfermant de la vermiculite stérile arrosée avec la

8 NOV 1983

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

N° : 3663ex 1

Cote : B

B3663 ex 1

solution de Crone sans azote décrite ci-dessus. 2 semaines plus tard on a déterminé l'activité fixatrice d'azote des plantules nodulées par la méthode de réduction de l'acétylène [7].

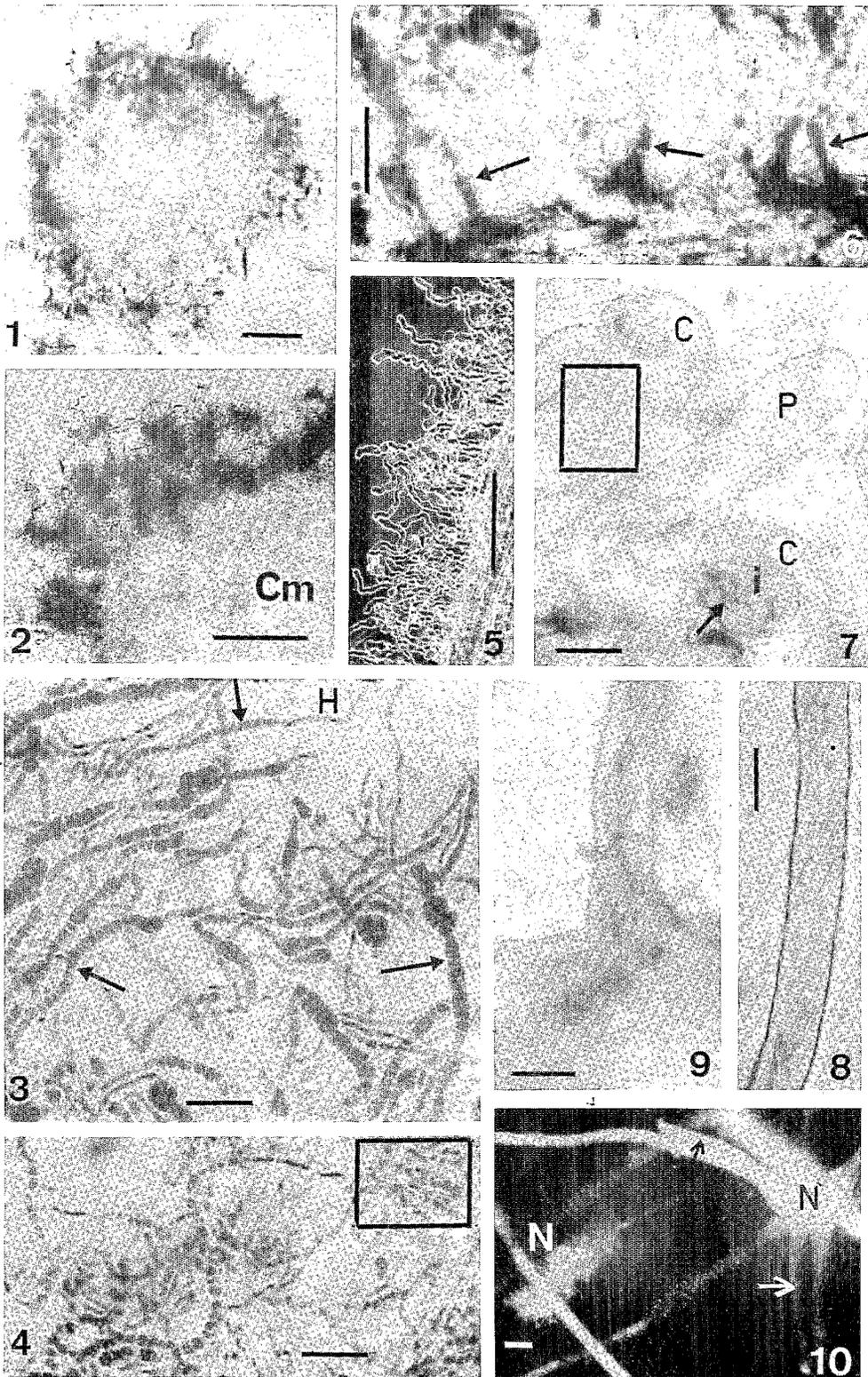
**RÉSULTATS ET DISCUSSION.** — *Caractéristiques morphologiques de la souche Cj 1-82 en culture pure.* — Après 1 mois de culture sur milieu QMOD gélifié les colonies de Cj 1-82 forment des masses globuleuses d'environ 0,2 mm de diamètre d'apparence compacte et mucilagineuse (fig. 1). Seule la périphérie de ces colonies a pris la coloration bleue lors de l'application d'une solution à 0,02% de bleu trypan dans du lactophénol (fig. 2). Les hyphes sont courtes, larges (1,0-1,5 µm) et se différencient souvent en sporanges intercalaires et très allongés (fig. 3). En milieu QMOD liquide, les colonies de Cj 1-82 sont plus floconneuses avec des hyphes plus longues et produisant, en plus des sporanges intercalaires et allongés, des sporanges en forme de massue. Pas plus en milieu liquide qu'en milieu solide, les sporanges ne libèrent spontanément les spores, contrairement à ce que l'on observe chez les autres souches de *Frankia* ([1], [2], [4], [11], [12]). A l'inverse des autres souches de *Frankia* de *Casuarina* [4] la souche Cj 1-82 ne produit pas de pigment rouge et, fait remarquable, ne forme pas de vésicules en culture pure, ce qui expliquerait son incapacité à fixer l'azote *in vitro* et à croître sur milieu sans azote.

*Caractéristiques morphologiques de la souche Cj 1-82 dans la rhizosphère.* — Quelques jours après l'inoculation, les hyphes se fragmentent et donnent naissance à des cellules

#### EXPLICATION DE LA PLANCHE

Fig. 1. — Colonie globuleuse de *Frankia* Cj 1-82 sur milieu QMOD solide, après coloration au bleu trypan; barre=100 µm. Fig. 2. — Agrandissement du bord de la colonie de Cj 1-82 de la figure 1; les hyphes périphériques sont courtes et colorées par le bleu trypan; le centre mucilagineux (Cm) de la colonie n'est pas coloré; barre=50 µm. Fig. 3. — Cj 1-82 sur milieu QMOD solide; hyphes septées (H) se différencient en sporanges intercalaires allongés (flèches); noter l'abondance de ce type de sporanges; barre=10 µm. Fig. 4. — Cj 1-82 dans la rhizosphère de *C. equisetifolia*; hyphes et sporanges fragmentés en cellules granuliformes (partie encadrée); barre=10 µm. Fig. 5. — Poils absorbants de *C. equisetifolia* déformés, 2 jours après inoculation avec Cj 1-82; barre=150 µm. Fig. 6. — Infection simultanée de plusieurs poils absorbants de *C. equisetifolia*, seuls les poils infectés sont colorés (flèches); barre=45 µm. Fig. 7. — Extrémités des poils absorbants de *C. equisetifolia* recourbés en crosse (C), poil non infecté (P), site d'infection (i) avec début de formation de l'hyphe infectieuse (flèche), dans la partie encadrée, cellules granuliformes provenant de Cj 1-82; barre=10 µm. Fig. 8. — Poil infecté contenant plusieurs hyphes infectieuses; barre=10 µm. Fig. 9. — Faisceau de plusieurs hyphes infectieuses dans la cellule basale d'un poil absorbant; barre=10 µm. Fig. 10. — Nodules (N) formés 3 semaines après l'inoculation de *C. equisetifolia* avec Cj 1-82, racines nodulaires (flèches); barre=0,5 mm.

Fig. 1. — Globoid colony of *Frankia* Cj 1-82 on agar QMOD medium, stained with trypan blue; bar=100 µm. Fig. 2. — Enlarged border of Cj 1-82 colony shown in Figure 1; peripheral hyphae are short and stained by trypan blue; the mucilaginous central part (Cm) of the colony is not stained; bar=50 µm. Fig. 3. — Cj 1-82 on agar QMOD medium; septate hyphae (H) with intercalary elongated sporangia (arrows); note the high frequency of this type of sporangium; bar=10 µm. Fig. 4. — Cj 1-82 in the rhizosphere of *C. equisetifolia*; hyphae and sporangia fragmented into granule-like cells (outlined area); bar=10 µm. Fig. 5. — Deformed root hairs of *C. equisetifolia*, 2 days after inoculation with Cj 1-82; bar=150 µm. Fig. 6. — Simultaneous infection of several root hairs of *C. equisetifolia*; only infected root hairs are stained (arrows); bar=45 µm. Fig. 7. — Curled tips (C) of root hairs of *C. equisetifolia*; non infected root hair (P); infection site (i) with initiating infecting hyphae (arrows); in outlined area, granule-like cells from Cj 1-82; bar=10 µm. Fig. 8. — A root hair with several infecting hyphae; bar=10 µm. Fig. 9. — Bunch of several infecting hyphae at the base of a root hair; bar=10 µm. Fig. 10. — Nodules (N) observed 3 weeks after inoculation of *C. equisetifolia* with Cj 1-82; nodular roots (arrows); bar=0.5 mm.



granuliformes (fig. 4). Contrairement à ce que l'on observe dans la culture *in vitro*, la souche Cj 1-82 forme dans la rhizosphère des vésicules typiques ([4], [11], et [14]).

*Résultats des tests d'infection.* — Il résulte de ces tests que 80 % des plantules présentant des racines latérales nouvelles pourvues de jeunes poils absorbants au moment de l'inoculation avec Cj 1-82 ont formé de un à quatre nodules visibles dès le 14<sup>e</sup> jour. A cette date, les plantules dont les racines étaient dépourvues de jeunes poils absorbants, soit environ 30 % du nombre total des plantules inoculées, n'avaient pas encore nodulé. De même que dans le cas de l'Aune [13], la présence de jeunes poils absorbants est donc indispensable au succès de l'infection.

*Étapes préliminaires de la nodulation.* — La déformation des poils absorbants est visible dans les 2 jours suivant l'inoculation (fig. 5). Lorsque l'inoculum est constitué par un fragment de colonie, les poils convergent en se courbant vers ce fragment et l'entourent, ce qui suggère l'intervention d'un processus de tactisme. Ultérieurement, les extrémités d'un certain nombre de poils se recourbent en crosse (fig. 7). De 7 à 10 jours après l'inoculation, les hyphes de *Frankia* se développent dans la crosse où s'accumulent des substances supposées de même nature que la paroi des poils [3]. Chaque poil renferme jusqu'à quatre hyphes infectieuses (cordons infectieux) à paroi épaisse et parfois ramifiées (fig. 8 et 9). Ces hyphes envahissent ensuite les cellules du cortex racinaire selon un processus déjà décrit antérieurement ([9], [16]). Environ 10 jours après la déformation des poils, la base de la racine latérale se gonfle à la suite de la prolifération et de l'hypertrophie des cellules corticales. L'initiation du nodule peut résulter d'une infection simultanée de plusieurs poils (fig. 6). En général, sur chaque racine latérale, il se forme au début seulement un nodule à un lobe, mais parfois d'autres lobes peuvent se juxtaposer, chacun étant surmonté d'une racine nodulaire à croissance limitée (fig. 10).

*Effectivité des nodules.* — L'activité fixatrice d'azote spécifique des nodules, appréciée par la réduction de  $C_2H_2$ , s'élève à 24  $\mu$ moles de  $C_2H_4$  par gramme (poids sec) et par heure, ce qui indique que la souche Cj 1-82 est infective et effective.

Ce travail a été réalisé avec l'aide financière de la D.G.R.S.T. (programme LAT/OG2). Le docteur P. Chittachumnonk nous a aimablement procuré l'hybride de *Casuarina junghuhniana*.

(\*) Remise le 7 juin 1982, acceptée le 18 octobre 1982.

- [1] D. BAKER, J. G. TORREY et G. H. KIDD, *Nature*, 281, 1979, p. 76.
- [2] A. J. P. BURGGRAAF, A. QUISPEL, T. TAK et J. VALSTAR, *Plant Soil*, 61, 1981, p. 157.
- [3] D. CALLAHAM, P. DEL TREDICI et J. G. TORREY, *Science*, 199, 1978, p. 899.
- [4] H. G. DIEM, D. GAUTHIER et Y. R. DOMMERGUES, *Can. J. Microbiol.*, 28, 1982, p. 526.
- [5] H. G. DIEM, D. GAUTHIER et Y. R. DOMMERGUES, *F.E.M.S. Microbiol. Letters*, 15, 1982, p. 181.
- [6] GAUTHIER, H. G. DIEM et Y. R. DOMMERGUES, *Comptes rendus*, 293, série III, 1981, p. 489.
- [7] R. W. HARDY, R. D. HOLSTEN, E. K. JACKSON et R. C. BURNS, *Plant Physiol.*, 43, 1968, p. 1185.
- [8] L. A. S. JOHNSON et B. G. BRIGGS, *Aust. J. Bot.*, 11, 1962, p. 21.
- [9] S. KANT et H. S. NARAYANA, *Proc. Indian Acad. Sc.*, 85, 1977, p. 34.
- [10] M. LALONDE, H. E. CALVERT et S. PINE, In: A. H. GIBSON et W. E. NEWTON, éd., *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*, Australian Academy of Science, Canberra, 1981, p. 296.
- [11] M. LALONDE et H. E. CALVERT, In: J. C. GORDON, C. T. WHEELER et D. A. PERRY, éd., *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests*, Oregon State University Press, Corvallis, 1979, p. 95.
- [12] W. NEWCOMB, D. CALLAHAM, J. G. TORREY et R. L. PETERSON, *Bot. Gaz.*, 140, (S), 1979, p. S22.
- [13] G. PIZELLE, *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 119, 1972, p. 571.
- [14] J. D. TJEKEMA, W. ORMEROD et J. G. TORREY, *Nature*, 287, 1980, p. 633.
- [15] J. G. TORREY, *Amer. J. Bot.*, 63, 1976, p. 335.
- [16] J. G. TORREY, In: P. GRAHAM, éd., *Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture*, C.I.A.T., Cali, 1982 (sous presse).