

## Fixation biologique de l'azote et possibilité de nodulation croisée chez les deux espèces d'acacias producteurs de gomme dure : *Acacia senegal* L. Willd. et *Acacia laeta* R. Br. ex. Benth.

Simon BADJI, Marc DUCOUSSO, Mamadou GUEYE et Jean-Paul COLONNA

**Résumé** — Neuf souches de *Rhizobium* à croissance rapide, isolées de nodosités soit d'*A. laeta* soit d'*A. senegal* provoquent indifféremment, en trois semaines, au laboratoire, la nodulation de l'une et de l'autre de ces deux espèces : la nodulation croisée est donc possible entre elles malgré leurs différences. L'effectivité de ces souches est démontrée : les symbioses obtenues amènent, en 5 semaines de fonctionnement et par rapport aux témoins, une augmentation moyenne de l'azote des parties aériennes de la plante égale à 49% pour *A. senegal* et à 98% pour *A. laeta*. Les différences morphologiques et physiologiques entre les deux espèces apparaissent très tôt.

**Nitrogen fixation and cross inoculation with *Rhizobium* from two acacia species producing arabic gum: *Acacia Senegal* L. Willd and *Acacia laeta* R. Br. ex. Benth.**

**Abstract** — Nine fast-growing *Rhizobium* strains isolated from *A. laeta* and *A. senegal* were found to produce nodules in both species after three weeks under laboratory conditions: thus cross-nodulation is possible between these two species in spite of their differences. The effectiveness of these nine strains has been demonstrated: the resulting symbiosis produced, in 5 weeks, an average increase in shoot nitrogen content of 49% for *A. senegal* and 98% for *A. laeta* compared with controls. Morphological and physiological differences between the two species appear very early.

**Abridged English Version** — INTRODUCTION. — Among the thousand or so different *Acacia* species [1], *A. senegal* and *A. laeta*, which are nitrogen fixing trees [2], both supply arabic gum [3] but they present some differences ([4], [5]). *A. senegal* is nodulated by a fast growing *Rhizobium*, *A. albida* by a slow growing *Bradyrhizobium* and *A. seyal* by both strains ([2], [6]) but the genus of strains which infect *A. laeta* is unknown.

The optimization of nitrogen fixing symbiosis from the two arabic gum trees is required for drought control, soil improvement and economical development of sahelian countries.

For these reasons and before beginning a large development programme, it was important to know: (i) if the strains isolated from *A. senegal* nodules could nodulate *A. laeta* and inversely; (ii) if the compatibility between the strains and the arabic gum trees was sufficiently large so that all nodules could be effective in both cases.

As a first step, a short term tube experiment appeared to be well adapted.

**MATERIALS AND METHODS.** — 1. *Rhizobium* isolation. — The tested *Rhizobium* strains were isolated from effective nodules in young plants of *A. senegal* and *A. laeta*. They were isolated by classic microbiological methods [7].

2. *Preparation and cultivation of Acacia trees.* — The seeds were soaked in  $H_2SO_4$  during 14 min. and then rinsed in sterile  $H_2O$ . They were then transferred to a 0.6% agar solution medium. After 24 hrs., the seedling was introduced into a Gibson tube, as indicated by Vincent [7], which contained 30 ml of agar Jensen broth without nitrogen; all tubes were maintained at  $28^\circ C$  and illuminated by  $75,000 \text{ ergs. cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . The experiment lasted 8 weeks after inoculation.

Note présentée par Alexis MOYSE.

0249-6313/88/03070663 \$2.00 © Académie des Sciences

ORSTOM Fonds Documentaire

N° : 25.955 ex 1

Cote : B

M

3. *Plant inoculation.* — Each culture tube was inoculated with a drop of *Rhizobium* suspension containing  $10^9$  cells/ml.

4. *Experimental design.* — A factorial randomized design was used, with seven replicates and two controlled factors. The strains, with ten levels, constituted the first controlled factor: six strains isolated from *A. senegal* (ORS 1001, ORS 1002, ORS 1003, ORS 1004, ORS 1005 and ORS 1006), three strains isolated from *A. laeta* (ORS 1007, ORS 1008 and ORS 1009) and one uninoculated control. The second controlled factor was "species" with two levels: *A. senegal* and *A. laeta*.

RESULTS AND DISCUSSION. — 1. *Infectivity of strains and cross nodulation.* — Compared with non-nodulated controls, the nine strains, isolated either from *A. senegal* or from *A. laeta*, all nodulated both tree species. The nine strains were fast growing.

Statistical analysis of nodules dry weight per plant showed significant differences (Table I, A). The L.S.D. was 4.37 mg for *A. senegal* and 7.07 for *A. laeta*. These results indicate for the first time that cross nodulation is possible between two arabic gum and nitrogen fixing trees such as *A. senegal* and *A. laeta*, with fast growing bacteria, which are therefore included in *Rhizobium* genus [6]. *A. laeta* is nodulated by *Rhizobium*.

2. *Efficacy of strains.* — The specific ARA ( $\text{nmoles} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) varied from 5 to 13 for *A. senegal* and from 3 to 9 for *A. laeta*: all strains used in this study were effective and formed nodules which fixed atmospheric nitrogen. For all strains, the shoot of *A. senegal* contained  $3.15 \pm 0.35$  mg of nitrogen compared with 2.11 for the control: the nitrogen increase by biological fixation was 49%; the equivalent increase for *A. laeta* was 98% ( $4.65 \pm 0.37$  instead of 2.36). In comparison with the control there was more shoot growth in the inoculated plants (Table I, B, C). With *A. senegal*, the strains isolated from *A. senegal* gave, for all measured parameters, average values which were not significantly different from the equivalent values obtained from strains isolated from *A. laeta* (Table II). The same was observed with *A. laeta*.

3. *Characterization of the two species.* — For the measured parameters, the "species effect" was very significant. Nodule dry weight, shoot height, shoot dry weight and total shoot nitrogen were significantly higher in *A. laeta* than in *A. senegal* (+53, +93, +112 and +49% respectively).

---

INTRODUCTION. — Le genre *Acacia* (Miller) renferme plus d'un millier d'espèces [1]. Parmi elles, *Acacia senegal* et *Acacia laeta* fixant l'azote atmosphérique [2] et fournissant la gomme arabique, produit atoxique et non polluant aux nombreuses applications industrielles [3], présentent quelques différences. (i) La composition de la gomme obtenue varie de l'une à l'autre (4). (ii) L'une est spontanée au Sénégal, l'autre, sauf introduction, n'y existe pas [5]. (iii) Leurs aires de distribution ne se recouvrent que partiellement [5]. Ces faits peuvent être l'indice de différences plus générales concernant en particulier l'établissement et le fonctionnement des symbioses fixatrices d'azote.

Si *A. senegal* est nodulé par des bactéries du genre *Rhizobium*, à croissance rapide, *A. albida* par des *Bradyrhizobium* à croissance lente et *A. seyal* par les deux ([2], [6]), on ne sait à quel genre appartiennent les souches infectant *A. laeta*.

Par ailleurs, les perspectives d'utilisation de ces deux gommiers dans la lutte contre la désertification, l'amélioration des sols et la mise en valeur du Sahel, nécessitent l'optimisation de ces symbioses. Avant d'aborder un vaste travail de sélection des souches bactériennes et de recomposition des couples symbiotiques en vue de retenir les plus

performants, il convenait de savoir (i) si les couches de *Rhizobium* isolées de nodosités d'*A. senegal* provoquent l'apparition d'organes symbiotiques chez *A. laeta* et inversement; (ii) si la compatibilité souches-espèces est suffisante pour que les nodosités formées soient fonctionnelles dans les deux cas.

Pour atteindre ces objectifs préliminaires, l'expérimentation de courte durée, en tubes, au laboratoire paraît bien adaptée. L'étape suivante utilise un modèle expérimental différent, compatible avec ce dernier objectif.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — 1. *Obtention des souches de Rhizobium*. — Les souches de *Rhizobium* éprouvées proviennent de nodosités fonctionnelles de jeunes *A. senegal* ou *A. laeta*. Chaque nodosité récoltée est lavée, séchée puis trempée dans  $\text{HgCl}_2$  à 0,1 % (5 mn). Les opérations suivantes se déroulent en conditions aseptiques : après huit rinçages abondants par  $\text{H}_2\text{O}$ , l'organe symbiotique est écrasé; l'isolement se fait en étalant, par la méthode des stries, une goutte du broyat sur milieu YEM gélosé (7); les boîtes de Petri contenant ce milieu sont placées en chambre d'incubation à 37°C durant 1 à 2 jours; les cultures pures de chaque souche isolée sont obtenues par un ou plusieurs ensemencements successifs à partir des colonies ci-dessus.

2. *Obtention et culture des jeunes acacias*. — Les graines d'acacias subissent un trempage de 14 mn dans  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentré; après une série de rinçage à  $\text{H}_2\text{O}$  stérile, intervient leur transfert aseptique sur eau gélosée à 0,6%; au bout de 24 h, la jeune plantule est placée aseptiquement en tube; chaque tube, recouvert d'un capuchon en feuille d'aluminium percée d'un trou, reçoit un plant sur 30 ml de milieu de Jensen gélosé, dépourvu d'azote, moulé en biseau ascendant dans le tube selon le dispositif classique de Vincent [7];  $\text{H}_2\text{O}$  stérile emplit le volume du tube non occupé par la gélose; la partie aérienne du jeune plant se trouve à l'air libre au-dessus du capuchon d'aluminium. Les tubes sont placés en chambre de cultures, à 28°C, sous éclairage continu de  $75\,000 \text{ erg. cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . L'expérience se déroule sur 8 semaines après inoculation.

3. *Inoculation des plants*. — A partir d'une colonie sur milieu YEM gélosé, les diverses souches sont repiquées sur milieu YEM liquide puis placées sur table d'agitation en chambre d'incubation à 30°C. Après 1 à 2 jours, les cultures obtenues (environ  $10^9$  *Rhizobium/ml*) sont introduites aseptiquement, à raison d'une goutte, dans chaque tube venant de recevoir un jeune plant.

4. *Dispositif expérimental*. — Il s'agit d'un dispositif factoriel en blocs randomisés (sept répétitions); le premier facteur contrôlé est l'inoculation avec dix niveaux : six souches isolées d'*A. senegal* (ORS 1001, ORS 1002, ORS 1003, ORS 1004, ORS 1005 et ORS 1006), trois souches isolées d'*A. laeta* (ORS 1007, ORS 1008 et ORS 1009) et un témoin non inoculé; le second facteur contrôlé est l'espèce avec deux niveaux : *A. senegal* et *A. laeta*. Les paramètres étudiés figurent en légende des tableaux.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — 1. *Infectivité des souches et nodulation croisée entre A. senegal et A. laeta*. — La masse de matière sèche des nodosités d'un plant rend compte de l'infectivité des souches. Par rapport aux témoins non inoculés, qui ne portent évidemment aucune nodosité, les neuf souches utilisées, qu'elles proviennent d'*Acacia senegal* ou d'*Acacia laeta* et qui sont toutes à croissance rapide, provoquent l'apparition de nodosités sur les racines de chacune de ces deux espèces : elles sont donc significativement infectives.

Un second degré de signification apparaît si l'on compare les valeurs de ce paramètre pour les neuf souches (tableau I, A) : l'interprétation statistique montre des différences

TABLEAU I

Caractéristiques des nodulations obtenues : A, Masse de matière sèche des nodosités d'un plant (mg); B, Hauteur des parties aériennes d'un plant (cm); C, Masse de matière sèche des parties aériennes d'un plant (mg); D, Azote total des parties aériennes d'un plant (mg). (\*) = Pour les dosages d'azote, les sept répétitions ont été réunies en un seul échantillon. (\*\*) ppds = Plus petite différence significative moyenne.

Characteristics of observed nodulations. A, Dry weight of nodules per plant (mg); B, Height of aerial parts of plant (cm); C, Dry weight of aerial parts of plant (mg); D, Total nitrogen in aerial parts per plant (mg). (\*) = For N determination, the seven repetitions were mixed. (\*\*) ppds = Middle low significative difference.

Origine des souches	Traitements (souches ou témoins)	Sur <i>Acacia senegal</i>				Sur <i>Acacia laeta</i>			
		A	B	C	D (*)	A	B	C	D (*)
Issues d' <i>Acacia senegal</i> . . . . .	ORS 1001	11,67	7,21	118,57	3,50	12,43	17,33	258,57	4,37
	ORS 1002	8,13	7,29	111,43	2,71	13,00	17,43	248,57	4,65
	ORS 1003	8,87	6,14	114,29	3,31	15,43	19,50	215,71	4,23
	ORS 1004	6,57	5,29	102,86	2,84	13,86	17,07	228,57	5,46
	ORS 1005	5,90	5,14	82,86	2,30	16,43	18,04	191,43	4,71
	ORS 1006	14,21	6,36	114,29	3,65	8,71	18,07	248,57	4,82
Issues d' <i>Acacia laeta</i> . . . . .	ORS 1007	8,90	6,64	115,71	3,44	17,57	17,43	235,71	4,24
	ORS 1008	9,56	6,64	125,71	3,63	16,00	19,14	244,29	4,37
	ORS 1009	8,04	6,14	105,71	2,95	11,71	18,57	234,29	4,15
Néant . . . . .	Témoin	0	4,57	85,71	2,11	0	16,71	177,14	2,36
ppds moyenne (**). . . . .		4,37	1,69	32,80	-	7,07	2,30	47,91	-

significatives et établit l'existence d'un effet « souches ». La plus petite différence significative moyenne vaut 4,37 mg chez *A. senegal* et 7,07 mg chez *A. laeta*; il s'en suit que, pour la première espèce, les souches ORS 1006 et ORS 1001, toutes deux issues d'*A. senegal*, sont significativement les meilleures : la première est significativement différente de toutes les autres, la seconde de ORS 1004 et ORS 1005, qui se révèlent comme les moins infectives; on constate que sur *A. senegal* les souches issues d'*A. laeta* donnent des résultats moyens comparables à ceux des autres souches, provenant d'*A. senegal*. La signification statistique d'ensemble est moins nette chez *A. laeta*, espèce pour laquelle les souches ORS 1007, ORS 1008 et ORS 1005 sont significativement meilleures que ORS 1006; les autres souches fournissent des résultats intermédiaires.

Ces résultats établissent pour la première fois que la *nodulation croisée est possible entre les deux espèces d'acacias productrices de gomme arabique, à partir de souches bactériennes à croissance rapide*. On constate donc que *A. laeta* est nodulé ici par des bactéries appartenant au genre *Rhizobium* [6].

2. *Efficacité des souches*. — Il ne suffit pas que les souches de *Rhizobium* provoquent la formation de nodosités, il faut encore qu'elles soient efficaces et que ces nodosités fixent réellement l'azote atmosphérique. Si elle n'existe pas chez les témoins non inoculés, l'activité réductrice d'acétylène (ARA), qui rend compte de la réalité de cette fixation, exprimée en nanomoles par heure et par milligramme de nodule sec, varie en moyenne de 5 à 13 chez *A. senegal* inoculé par les diverses souches et de 3 à 9 chez *A. laeta* : *toutes les souches utilisées ici forment des nodosités qui fixent réellement l'azote atmosphérique*.

L'augmentation, par rapport aux témoins, de la quantité d'azote totale des parties aériennes d'un plant prouve aussi l'efficacité de ces souches. La détermination de ces quantités a été effectuée, pour chaque souche, sur des aliquotes d'un échantillon moyen réunissant les plants des sept répétitions (tableau I, D). Pour l'ensemble des souches, les

TABLEAU II

Moyennes des paramètres mesurés, rapportées à la provenance des souches.  
*Comparison of averages of measured parameters in reference to origin of strains.*

Souches	Sur <i>Acacia senegal</i>				Sur <i>Acacia laeta</i>			
	A	B	C	D (*)	A	B	C	D (*)
Provenant d' <i>A. senegal</i> . . . . .	9,2	6,2	107	3,0	13,3	18,0	232	4,7
Provenant d' <i>A. laeta</i> . . . . .	8,8	6,4	115	3,3	15,1	18,4	238	4,6

TABLEAU III

Différences entre les espèces. (Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes.)  
*Differences between species.*

	A	B	C	D (*)
<i>Acacia senegal</i> . . . . .	8,19 <sup>a</sup>	6,14 <sup>a</sup>	107,71 <sup>a</sup>	3,14
<i>Acacia laeta</i> . . . . .	12,51 <sup>b</sup>	8,00 <sup>b</sup>	228,29 <sup>b</sup>	4,67

parties aériennes des jeunes *A. senegal* inoculés contiennent, en moyenne,  $3,15 \pm 0,35$  mg d'azote au lieu de 2,11 pour les témoins : l'accroissement en azote atteint 49% ; pour *A. laeta*, il se monte à 98%, la quantité d'azote moyenne se situant, pour les plants inoculés à  $4,65 \pm 0,37$  mg et à 2,36 pour les témoins.

Les plants inoculés, qui disposent de plus d'azote, forment une biomasse aérienne plus importante que les témoins. Donnent des résultats significativement supérieurs aux témoins, chez *A. senegal* : (i) les souches ORS 1001, 1002, 1006, 1007 et 1008 pour les hauteurs (ppds = 1,69), (ii) ORS 1001 et 1008 pour la biomasse sèche (ppds = 32,80), chez *A. laeta* : (i) ORS 1003 et 1008 pour les hauteurs (ppds = 2,30), (ii) ORS 1001, 1002, 1004, 1006, 1007, 1008 et 1009 pour les masses de matière sèche (ppds = 47,91), (tableau I, B, C).

Sur *A. senegal*, les souches issues d'*A. senegal* fournissent pour tous les paramètres mesurés, des résultats moyens non significativement différents de ceux obtenus à partir des souches issues d'*A. laeta* (tableau II); il en est de même sur *A. laeta*.

3. *Caractérisation des deux espèces : effet « espèces »*. Bien que les mêmes souches de *Rhizobium* les infectent également, les deux espèces d'acacias gommiers considérées montrent très tôt leurs différences physiologiques et morphologiques. Pour les paramètres mesurés l'effet « espèces » est largement significatif : le test de Newman Keuls établi, au seuil de 5%, que les deux espèces se situent toujours dans des groupes homogènes différents (tableau III). Chez *A. laeta*, par rapport à *A. senegal*, sont plus élevées : la masse de matière sèche des nodosités (+53%), la hauteur des parties aériennes (+93%), la biomasse aérienne (+112%) et la quantité d'azote qu'elle renferme (+49%).

CONCLUSIONS. — 1. Neuf souches bactériennes à croissance rapide, donc du genre *Rhizobium*, isolées soit d'*A. senegal* soit d'*A. laeta*, provoquent en 3 semaines, l'apparition de nodosités sur chacune de ces deux espèces. La nodulation croisée entre les deux espèces d'acacias producteurs de gomme arabique est possible.

2. Les symbioses obtenues sont efficaces : avec le dispositif expérimental utilisé, les parties aériennes des plantes nodulées renferment en moyenne pour les deux espèces confondues, au bout de 2 mois de végétation, 75% d'azote de plus que les témoins non

nodulés, qui n'ont pu employer que les réserves de la graine. Ce surplus correspond à l'azote atmosphérique fixé en 5 semaines, environ, de fonctionnement du système fixateur.

3. Dès le début de la croissance, l'*A. laeta*, qui sera un arbre plus grand, affiche une biomasse plus importante que l'*A. senegal*.

Nous remercions ici B. Dreyfus pour sa collaboration.

Note reçue le 11 juillet 1988, acceptée le 30 août 1988.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] T. R. NEW, *A biology of Acacia*, J. TAYLOR éd., Oxford University Press, Melbourne, 1984, 153 p.
- [2] B. L. DREYFUS et Y. R. DOMMERGUES, *Appl. Env. Microbiol.*, 41, 1981, p. 97-99.
- [3] Centre du Commerce international, *Le Marché de la Gomme Arabique*, Cnuceid/Gatt, 1978, 181 p.
- [4] D. M. W. ANDERSON et I. C. M. DEA, *Phytochem.*, 8, 1969, p. 167-176.
- [5] P. L. GIFFARD, *Les essences de reboisement au Sénégal*, C.T.F.T., Dakar, 1974, 29 p.
- [6] B. DREYFUS, J. L. GARCIA et M. GILLIS, *Int. J. System. Bacter.*, 38, n° 1, 1988, p. 89-98.
- [7] J. M. VINCENT, *A manual for practical study of root nodules bacteria*, I.B.P. Hand Book, 15, Blackwell Sc. Publ., Oxford, Edimburgh, 1970, 164 p.

---

S. B. et J.-P. C. : O.R.S.T.O.M., Laboratoire de Microbiologie Sols, B.P. n° 1386, Dakar, Sénégal;  
M. D. : I.S.R.A.-C.N.R.F., route des Maristes, Dakar, Sénégal;  
M. G. : M.I.R.C.E.N.-C.N.R.A., B.P. n° 53, Bambey, Sénégal.

---