

Etude structurale de nodules caulinaires de *Sesbania rostrata* induits en présence d'azote combiné

A. Moudiongui¹, E. Duhoux² et G. Rinaudo¹

Introduction

Il est bien établi que l'azote combiné peut inhiber les différentes étapes du processus conduisant à l'établissement d'une symbiose entre un *Rhizobium* et la légumineuse hôte. L'attachement aux poils absorbants, l'infection et la formation des nodules, sont inhibés en présence de doses élevées d'azote combiné (3, 5, 9).

Dans le cas de cultures hydroponiques de *Sesbania rostrata* la présence de concentrations élevées en azote combiné se traduit par une inhibition de la nodulation racinaire; cependant on observe des nodules caulinaires de petite taille dont l'activité fixatrice d'azote est très réduite (8).

La présente étude a eu pour objet d'analyser la structure de nodules caulinaires de *S. rostrata* induits en présence de différentes concentrations d'azote combiné, et d'évaluer leur activité fixatrice d'azote.

Matériel et méthodes

Les graines de *Sesbania rostrata* sont scarifiées et stérilisées par immersion pendant 30 mn dans l'acide sulfurique concentré. Elles sont ensuite abondamment rincées à l'eau distillée stérile, puis mises à germer sur eau gélosée (5 g/l d'Agar) en boîte de Pétri. Lorsque les plantules atteignent 1 à 2 cm de long, elles sont transférées dans des tubes de 22 x 220mm contenant environ 60 ml de milieu de culture. Le milieu utilisé est proche de celui de Betlenfalvay et Phillips (1); sa composition est la suivante (en g/l): K₂CO₃ 0,23; K₃PO₄ 2H₂O 0,5; MgSO₄ 7H₂O 0,25; FeCl₃ 0,1; pH 6,8.

Les plantes sont cultivées en chambre de culture sous lumière artificielle (éclairage: 12000 lux; photopériode: 14 h d'illumination; température comprise entre 28°C et 32°C).

Les plantes sont tout d'abord maintenues pendant quatre semaines sur ce milieu additionné de 2 mM de nitrate de potassium. A compter de la cinquième semaine elles sont cultivées en présence de différentes concentrations d'azote (0, 3,0, 6,0 et 12 mM KNO₃), le milieu étant renouvelé quotidiennement; l'inoculation est effectuée au même moment par pulvérisation des tiges avec une culture d'*Azorhizobium* ORS 571.

Les mesures d'activité réductrice d'acétylène et l'étude structurale des nodules caulinaires sont effectuées 20 jours après l'inoculation.

Microscopie photonique

La fixation des nodules est effectuée par le mélange de Nawashine (7). Le matériel est ensuite rincé à l'eau courante pendant 24h, puis déshydraté durant 5 à 10 minutes dans une série de bains d'éthanol (de concentrations croissantes de 30 à 100% d'éthanol).

Après inclusion dans du Paraplast, on effectue au microtome des coupes longitudinales et transversales d'environ 10µm d'épaisseur. Les coupes sont alors déparaffinées par chauffage modéré, réhydratées et colorées à l'hématoxyline de Régaud ou au Paragon (7).

Les lames sont ensuite déshydratées par traitement au toluène puis montées dans le baume du Canada.

Les coupes sont observées au photomicroscope Wild M 400 et au microscope Nikon Labophot.

Microscopie électronique

Des coupes ultrafines sont réalisées après fixation pendant 4 h dans du glutaraldéhyde en solution à 4% dans un tampon cacodylate de sodium à pH 7. Les échantillons sont ensuite fixés pendant 4 h par le tétroxyde d'osmium en solution à 1% dans un tampon cacodylate de sodium. Le matériel est inclus dans l'Epon.

Les coupes sont observées au microscope électronique Siemens Elmiskop 101 après contraste par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb (12).

Résultats

L'observation en microscopie photonique de coupes de nodules développés en l'absence d'azote combiné, montre que le tissu central (le méristème nodulaire) représente 40% environ du volume total du nodule (Fig. 1A). Au fort grossissement (Fig.1B) on remarque que le tissu central est constitué de grandes cellules envahies par des bactéroïdes.

En microscopie électronique (Fig.1C) on note la présence de nombreuses bactéries entourées d'une membrane pér bactéroïde. L'organisation histologique de ces nodules développés en l'absence d'azote combiné, est donc conforme à la description de Duhoux (4).

Quand *Sesbania rostrata* se développe en présence de concentrations croissantes en azote combiné, on observe en premier lieu

(1) ORSTOM, UCB-Lyon 1, Ecologie Microbienne, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

(2) BSSFT (ORSTOM/CTET), 45 bis av. de la Belle Gabrielle, Nogent-sur-Marne Cedex, France.

une diminution de la taille des nodules (Fig. 2A, C et E).

A 3 mM KNO₃, le tissu central ne représente plus que 25% environ du volume total du nodule (Fig. 2A). Au fort grossissement on observe que la taille des cellules du tissu central a diminué, et qu'une grande proportion de ces cellules ne contiennent pas de bactéroïdes (Fig. 2B). Ces effets sont encore plus marqués à 6 mM KNO₃ (Fig. 2D) et 12 mM KNO₃ (Fig. 2F). L'analyse en microscopie électronique confirme ces observations (Fig. 3A) et montre que la membrane péribactéroïde est partiellement détériorée (Fig. 3B).

En présence de fortes concentrations en azote combiné (12 mM KNO₃), les cordons d'infection contiennent des bactéries dégénérantes; les bactéries ne sont pas déversées dans le cytoplasme des cellules du tissu central (Fig. 4A, 4B).

L'activité réductrice d'acétylène des nodules est inhibée par l'azote combiné (tableau 1). En présence de 3 mM KNO₃ le taux d'inhibition par rapport au témoin est de 35%. L'inhibition est totale en présence de 12 mM KNO₃.

Discussion

L'azote combiné agit sur le développement et l'activité réductrice d'acétylène des nodules caulinaires de *Sesbania rostrata*. Le degré d'inhibition est d'autant plus marqué que la concentration en nitrate de potassium est plus forte (tableau 1). Lors d'une précédente étude, des résultats analogues ont été obtenus en utilisant

du nitrate d'ammonium comme source d'azote (8).

On observe une bonne corrélation entre la diminution de volume du tissu central sous l'effet de concentrations croissantes en azote combiné et le degré d'inhibition de l'activité réductrice d'acétylène.

En présence de fortes concentrations en azote combiné (12 mM KNO₃), on remarque la présence de cordons d'infection intracellulaires. Les premières étapes de la nodulation caulinaire de *S. rostrata* (la pénétration des bactéries dans les sites de nodulation, l'induction du méristème nodulaire et l'émission de cordons d'infection) paraissent donc insensibles à l'azote combiné. L'absence de bactéroïdes dans les cellules laisse supposer que la dernière étape du processus d'infection (la libération des bactéries du cordon d'infection dans le cytoplasme des cellules du méristème nodulaire) est bloquée par les fortes concentrations en azote combiné. Des observations analogues ont été faites par Truchet et Dazzo (13) avec des nodules de luzerne induits en absence d'azote combiné, puis développés en présence de 18 mM KNO₃.

Par contre, au niveau racinaire, l'effet localisé de l'azote combiné se traduit par une inhibition des premières étapes de l'infection, notamment l'attachement des bactéries aux poils absorbants et la courbure de ces poils absorbants (2, 6, 10).

Ces résultats encore préliminaires devront être précisés par une étude en microscopie électronique plus détaillée. Cependant, en raison de sa double nodulation (caulinaire et racinaire) et la différence des modes

d'infection impliqués (4,11), il apparaît que *Sesbania rostrata* constitue un modèle de choix pour étudier les effets de l'azote combiné sur la symbiose *Rhizobium*-légumineuse.

Références

1. Betlenfalvay, G.J. and D.A. Phillips, 1978. Interaction between symbiotic nitrogen fixation, combined-N application and photosynthesis in *Pisum sativum*. *Physiol. Plant* 42:119-123.
2. Dart, P.J., 1977. Infection and development of leguminous nodules, p. 367-412. In R.W.F. Hardy and W.S. Silver (ed.), a treatise on nitrogen fixation. Wiley J. & Sons, New York.
3. Dazzo, F.B. and W.J. Brill, 1978. Regulation by fixed nitrogen of host-symbiot recognition in the *Rhizobium*-clover symbiosis. *Plant Physiol.* 62:18-21.
4. Duhoux, E., 1984. Ontogénèse de nodules caulinaires de *Sesbania rostrata* (légumineuse). *Can. J. Bot.* 62:982-994.
5. Gibson, A.H., and J.D. Pagan, 1977. Nitrate effects on the nodulation of legumes inoculated with nitrate-reductase deficient mutants of *Rhizobium*. *Planta* 134:17-22.
6. Hinson, K., 1975. Nodulation response from nitrogen applied to soybean half-root system. *Agron. J.* 94:116-124.
7. Lison, L., 1960. Histochimie et cytochimie animale. Principes et méthodes. Gauthier-Villars, Paris.
8. Moudiongui, A., and G. Rinaudo, 1987. Effect on ammonium nitrate on nodulation and nitrogen fixation (acetylene reduction) of the tropical legume *Sesbania rostrata*. *MIRCEN J.* 3:235-241.
9. Munns, D.N., 1968. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. III-Effects of nitrate on root hairs and infection. *Plant & Soil* 29:33-49.
10. Munns, D.N., 1977. Mineral nutrition and the legume symbiosis, p. 353-391. In R.W.F. Hardy and A.H. Gibson (ed.), a treatise on nitrogen fixation. Wiley J. & Sons, New York.
11. Olsson, J.E. and B.G. Rolfe, 1985. Stem and root nodulation of the tropical legume *Sesbania rostrata* by *Rhizobium* strain ORS 571 and WE7. *J. Plant Physiol.* 121:199-210.
12. Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH on electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17:208.
13. Truchet, G.L., and F.B. Dazzo, 1982. Morphogenesis of lucerne root nodules induced by *Rhizobium meliloti* in the presence of combined nitrogen. *Planta* 154:352-360.

KNO ₃ (mM/1)	Poids sec (mg nodules/plante)	Activité réductrice d'acétylène µmoles C ₂ H ₄ /plante/h
0	64,5 a	7,5 c
3	60,0 b	3,7 b
6	14,0 a	0,5 a
12	12,0 a	-

Tableau 1 : Effet de l'azote combiné sur le poids sec et l'activité d'acétylène des nodules caulinaires de *Sesbania rostrata*

Les valeurs suivies par une même lettre dans une colonne ne sont pas significativement différentes (test de Duncan, P = 0,05).

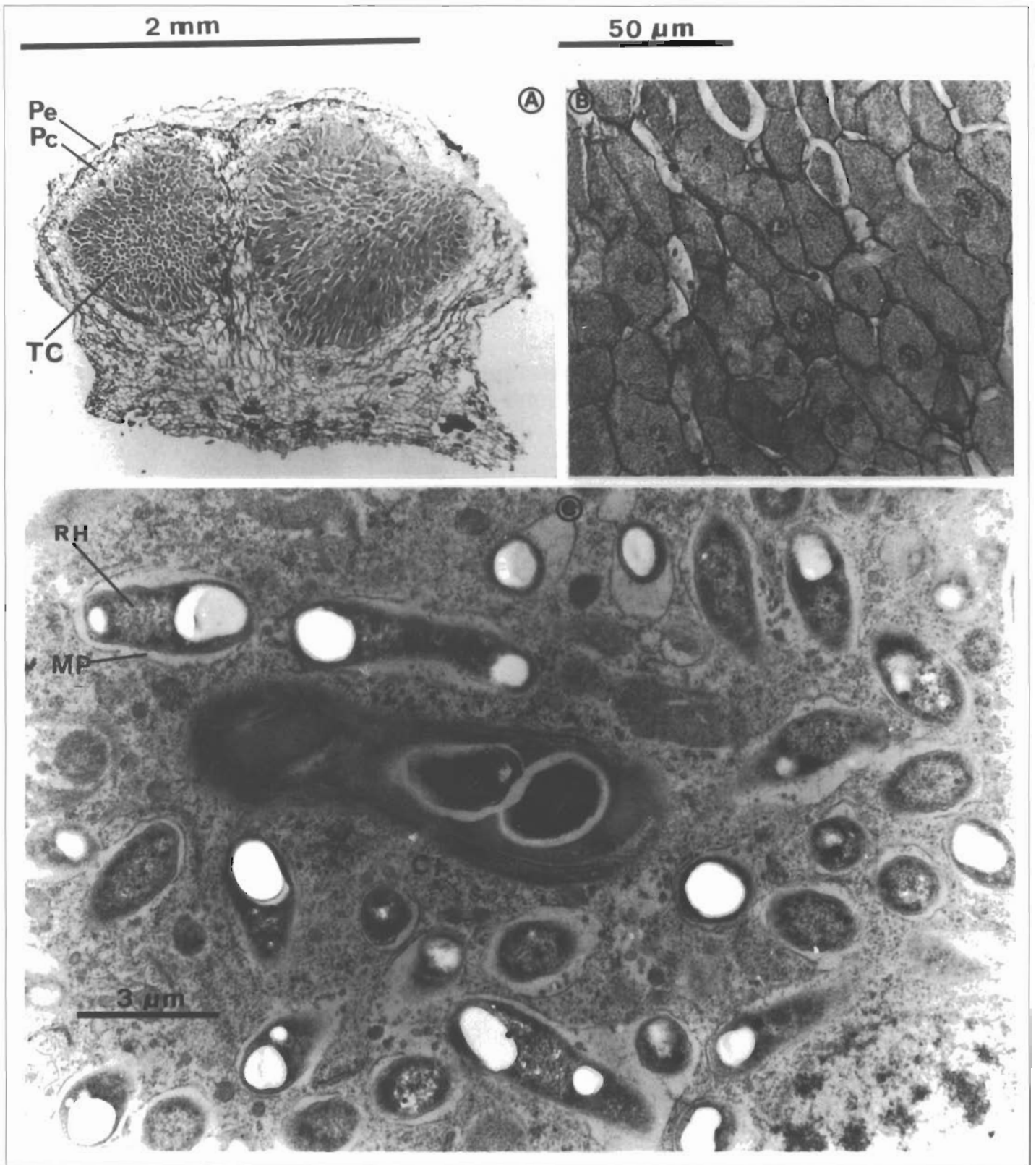


Fig 1 : Coupe d'un nodule caulinaire de *Sesbania rostrata* développé en l'absence d'azote combiné

- A - Le tissu central (TC) bien développé représente environ 40% du volume total du nodule (Pe:périderme, Pc:parenchyme chlorophyllien). MPH (microscopie photonique), x32.
- B - Le cytoplasme des cellules du tissu central est totalement envahi par des bactéroïdes. MPH, x200.
- C - On observe des *Azorhizobium* (RH) entourés d'une membrane pér bactéroïde (ME) (CI:cordon d'infection). MET(Microscopie électronique à transmission), x8000.

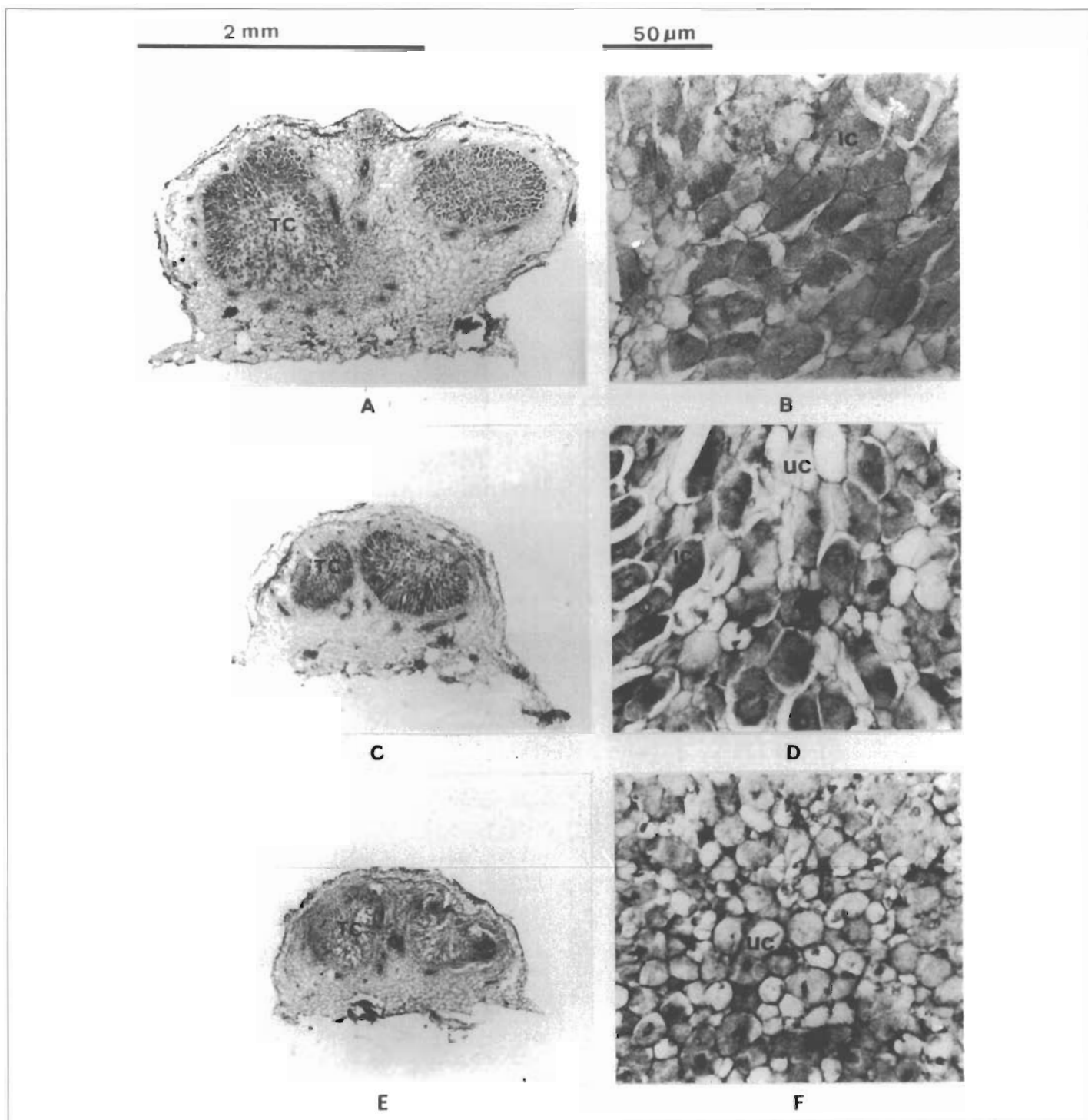
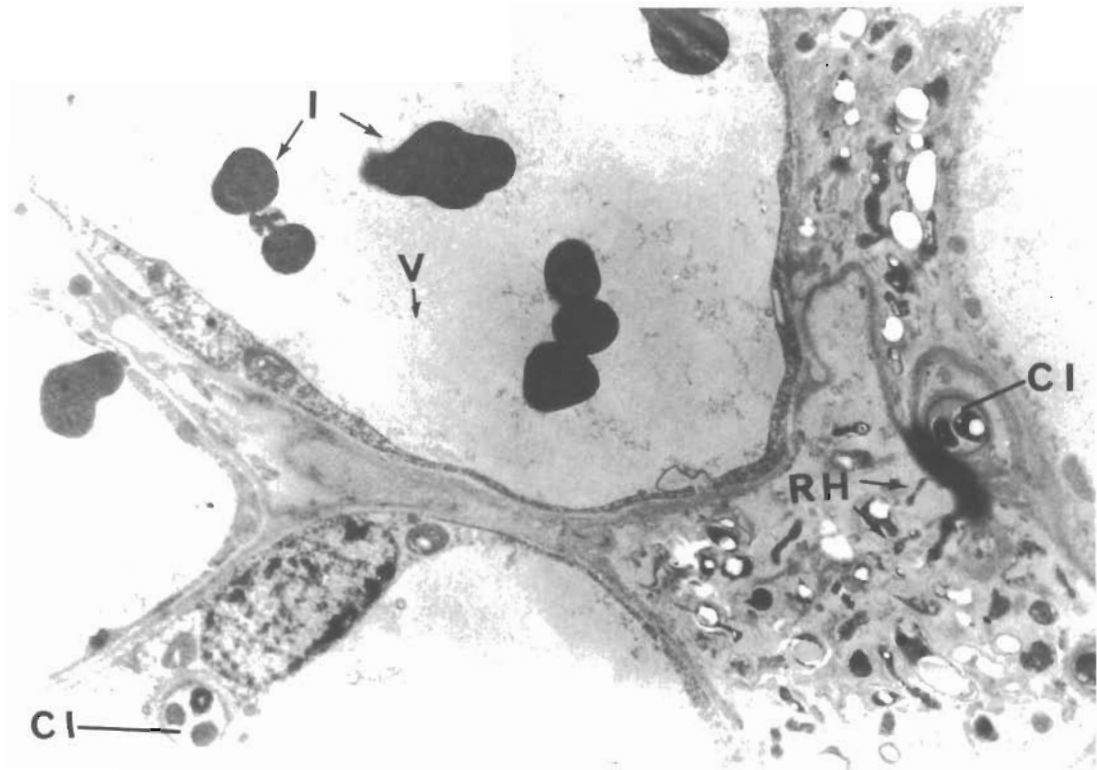
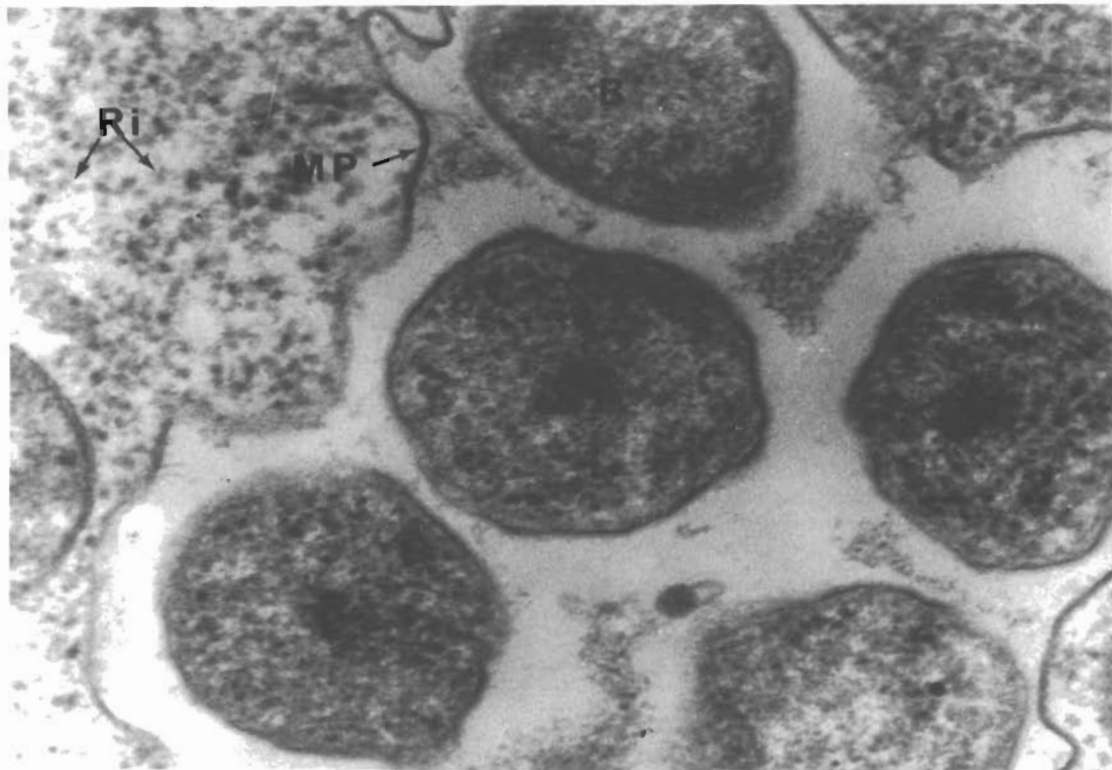


Fig 2 : Coupes de nodules caulinaires de *Sesbania rostrata* développés en présence de diverses concentrations d'azote combiné. La proportion de cellules envahies par *Azorhizobium* et leur taille, diminuent avec des concentrations croissantes en azote combiné (IC: cellules infectées, UC: cellules non infectées).

- A - 3 mM KNO_3 : le tissu central est moyennement développé; il représente environ 25% du volume total du nodule MPH, x 32.
- B - 3 mM KNO_3 : MPH, x 200.
- C - 6 mM KNO_3 : on observe une diminution de la taille du nodule; le tissu central représente environ 20% du volume total du nodule MPH, x 32.
- D - 6 mM KNO_3 : MPH, x 200.
- E - 12 mM KNO_3 : on observe une diminution de la taille du nodule; le tissu central, clair par endroit, présente un contour mal défini MPH, x 32.
- F - 12 mM KNO_3 : MPH, x 200.



A



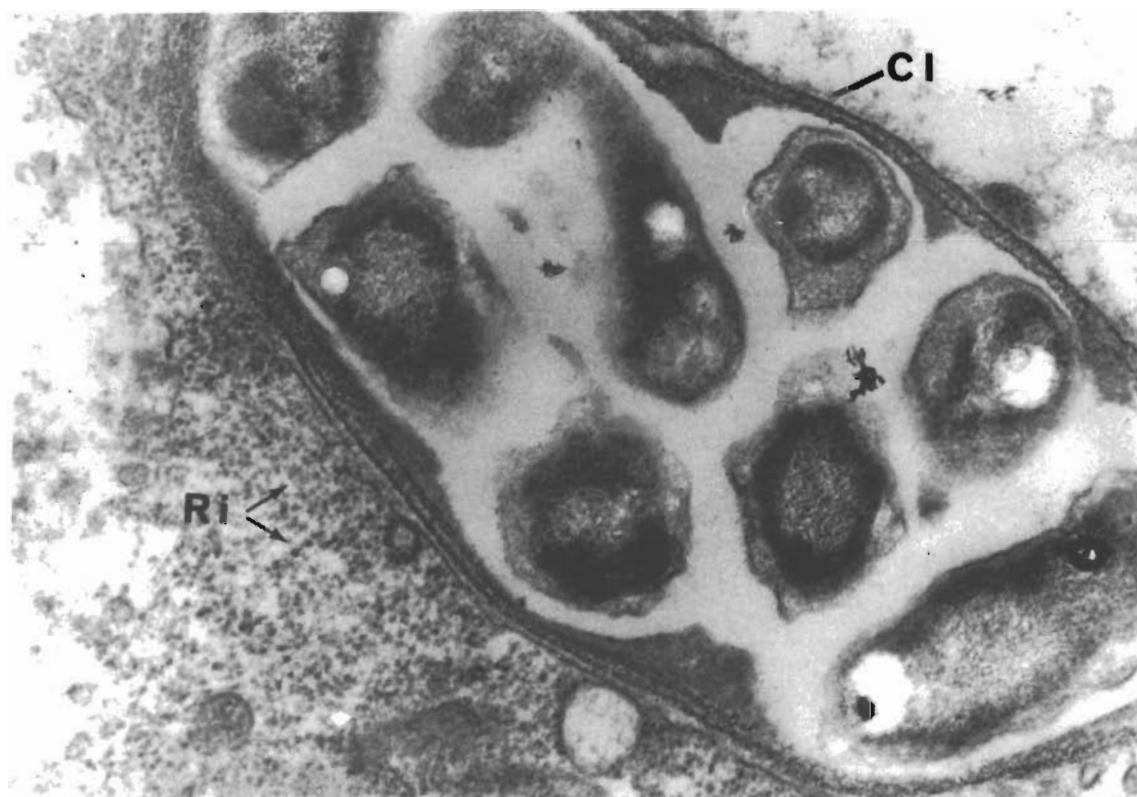
B

Fig 3 : Ultrastructure d'un nodule caulinaire développé en présence de 6 mM KNO_3 .

- A - On observe des cellules non infectées contenant des inclusions denses aux électrons dans leur appareil vacuolaire (V). MET, $\times 9000$.
 B - Les bactéroïdes (B) sont entourés d'une membrane pér bactéroïde (MP) aux contours mal définis (Ri: ribosomes). MET, $\times 168000$.



A



B

Fig 4 : Ultrastructure de cordons d'infection de nodules caulinaires développés en présence de 12 mM KNO_3 . On observe des bactéries dégénérantes dans les cordons d'infection (CI). MET, x90000

Moudiongui Adako, Duhoux E., Rinaudo Gérard.

Etude structurale de nodules caulinaires de *Sesbania rostrata* induits en présence d'azote combiné.

In : *Sesbania rostrata*.

Wageningen (NLD), Dakar : CTA, ORSTOM, 1989, p. 91-96.

Sesbania rostrata : Congrès International, 1989, Dakar