

PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE. — Culture *in vitro* de nodules de *Sesbania rostrata* : mode d'infection des tissus néoformés et comparaison avec l'infection chez la plante. Note (\*) de Émile Duhoux et Didier Alazard, présentée par Roger Buvat.

Dans les tissus néoformés *in vitro* à partir d'un explant de nodule de *Sesbania rostrata*, l'infection par les *Rhizobium* se développe par infiltration de « pseudo cordons d'infection » dans les espaces intercellulaires des cals. L'infection ainsi obtenue *in vitro* semble bloquée au stade intercellulaire alors que dans les nodules caulinaires formés sur la plante, l'infection comporte trois phases : multiplication des Bactéries dans des poches intercellulaires, émission de cordons d'infection typiques et libération des *Rhizobium* à l'intérieur des cellules de l'hôte. Les matériaux fibrillaires élaborés aussi bien *in vitro* que dans les nodules de la plante présentent une grande analogie.

PLANT PHYSIOLOGY. — *In vitro* Cultured Nodules of *Sesbania rostrata*: Infection of Calluses by *Rhizobium* Compared with Infection of the Stem Nodulation Sites.

Infection of calluses obtained from explants of *Sesbania rostrata* nodules occurs as "pseudo-infection threads". The infection of calluses is apparently blocked at this intercellular stage whereas the infection of plant nodulation sites is shown to proceed according to three stages: proliferation of Bacteria in intercellular cavities, protrusion of typical infection threads, and release of *Rhizobium* into the host cells. Fibrillar material synthesized *in vitro* is apparently similar to that occurring in the plant nodules.

On peut concevoir deux voies d'approche pour l'étude expérimentale *in vitro* de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuse. La première consiste à réaliser la synthèse de cette symbiose en infectant par les *Rhizobium* spécifiques des cultures de cals de la plante-hôte [1]. La deuxième voie consiste à cultiver *in vitro* des nodules prélevés aseptiquement sur la plante et à suivre la propagation spontanée des Bactéries dans les tissus néoformés à partir de l'explant nodulaire. C'est cette dernière voie que nous avons retenue pour l'étude expérimentale *in vitro* de la symbiose entre la Légumineuse tropicale *Sesbania rostrata* et son *Rhizobium* spécifique. Le développement de l'infection *in vitro* a été comparé à celui observé *in situ*.

Rappelons que *S. rostrata* forme des nodules fixateurs d'azote à la fois sur les racines et sur les tiges [2]. Les sites de nodulation de la tige appelés mamelons caulinaires [3] sont constitués d'un dôme épidermique et d'une ébauche racinaire qui se développe en nodule caulinaire après infection par les *Rhizobium* spécifiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — *Matériel végétal.* — Les nodules racinaires ou caulinaires prélevés sur des plants de *Sesbania rostrata* âgés de 2 à 3 mois, sont désinfectés selon la méthode de Vincent [4], puis sectionnés en deux parties égales et chaque moitié qui constitue l'explant nodulaire est mise en culture (milieu minéral de Lin et Staba [5], saccharose, 2 %; vitamines de Nitsch et Nitsch [6]; acide naphthalène acétique, 4 mg/l; 6-benzyl-amino purine, 1 mg/l; gélose Bacto Agar DIFCO, 0,8 %; le pH est ajusté à 5,7 avant autoclavage). Les cultures ont été exposées à une intensité lumineuse de 1 500 lx environ pendant 14 h par jour, la température étant de 28°C environ.

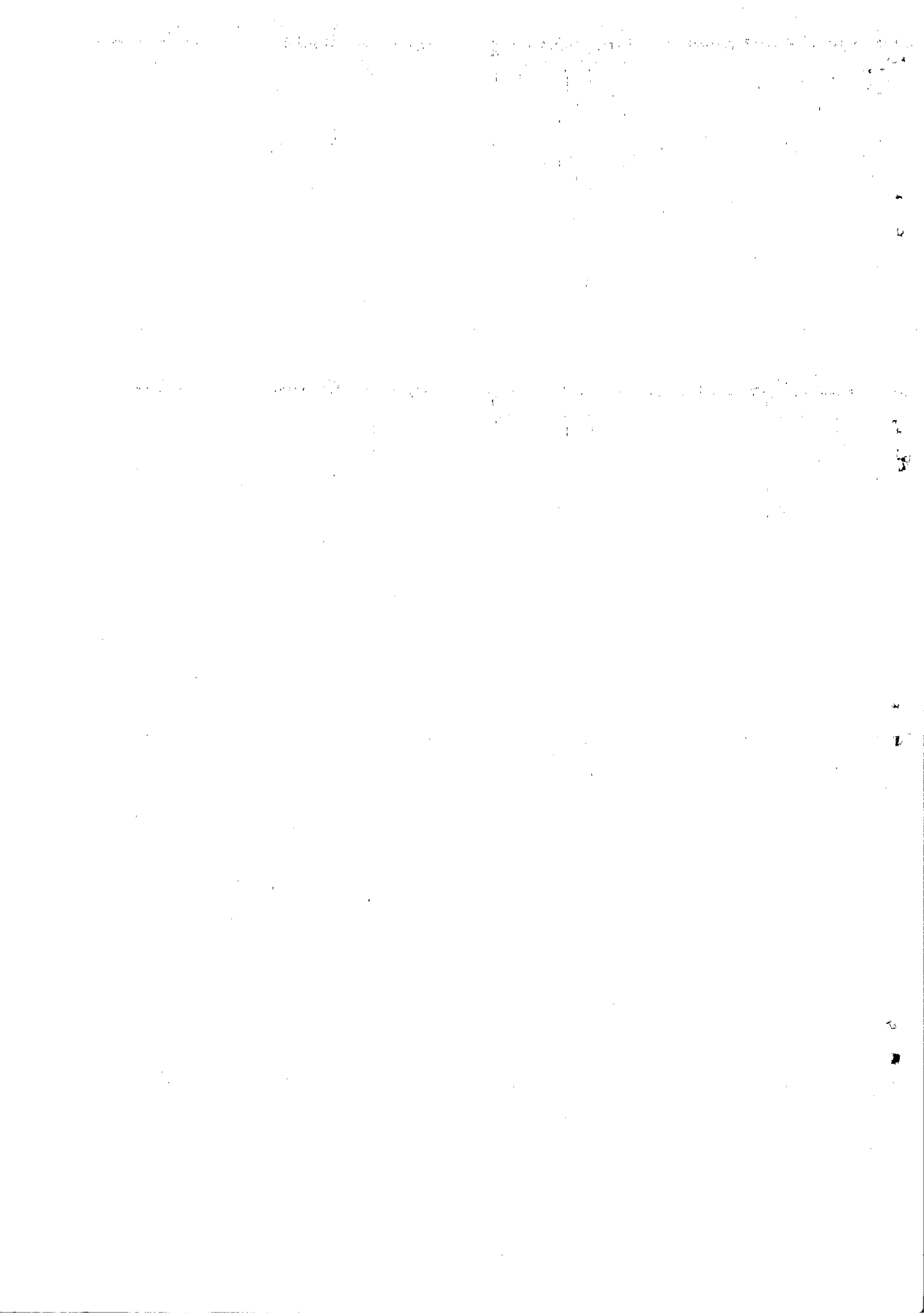
*Microscopie photonique.* — Après fixation du matériel au Nawaschine et inclusion dans le Paraplast (+) (Brunswick Lab.), les coupes sont colorées soit par le Paragon, soit par l'hématoxyline ferrique de Regaud [7].

*Microscopie électronique.* — Le matériel est fixé par le glutaraldéhyde Osmium et inclus dans l'« Epon ». Les coupes ultrafines sont observées au microscope électronique « Siemens Elmiskop 101 » après contraste par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb [8].

*Fixation de l'azote atmosphérique par les cals.* — L'activité réductrice d'acétylène a été éprouvée suivant la procédure classique de chromatographie en phase gazeuse [9].

RÉSULTATS. — I. *Obtention des cals.* — 4 jours environ après la mise en culture des explants nodulaires, les premiers cals apparaissent et se développent en formant des renflements chlorophylliens irréguliers (fig. 1, pl. I). Les proliférations cellulaires prennent naissance dans la zone corticale de l'explant au contact du milieu de culture (fig. 2 et 3, pl. I). Les tissus ainsi néoformés (cals) sont repiqués régulièrement à intervalles de





3 semaines. Environ 5 % des explants ne forment pas de cal. Dans ce cas, les *Rhizobium* initialement contenus dans le tissu central du nodule recouvrent l'explant et envahissent le milieu gélosé.

## EXPLICATION DES PLANCHES

## Planche I

Cals de nodule caulinaire de *Sesbania rostrata*.

*Stem nodule callus from Sesbania rostrata.*

Fig. 1, 2 et 3. — Aspects macroscopiques.

Fig. 1, 2 and 3. — *Macroscopic features.*

Fig. 4, 5, 6, 7 et 8. — Microscopie photonique.

Fig. 4, 5, 6, 7 and 8. — *Light microscopy.*

Fig. 1. — Cal formé (Ca.) après 3 semaines de culture d'une moitié de nodule caulinaire (Nc).

Fig. 1. — *Callus (Ca.) obtained three weeks after placing the explant (half stem nodule-Nc) in culture.*

Fig. 2 et 3. — Coupe d'un nodule cultivé *in vitro*.

Fig. 2 and 3. — *Section of the callus outgrowth the explant.*

Fig. 2. — Observation vitale.

Fig. 2. — *No staining.*

Fig. 3. — Fixation par le Nawaschine, coloration, hématoxyline.

Fig. 3. — *Fixation with Nawaschine, staining with haematoxylin.*

N. c : nodule caulinaire; Ca, cal; C, cortex; t. c., tissu central infecté.

*N. c.: Stem nodule explant; Ca, callus; C, cortex; t. c., infection zone of nodule explant.*

Fig. 4 et 5. — « Pseudo cordon d'infection » (P. c. i.) dans les cals. Coloration par le Paragon (fig. 4), par l'hématoxyline (fig. 5).

Fig. 4 and 5. — *"Pseudo infection thread" (P. c. i.) in callus. Staining with Paragon (fig. 4), with haematoxylin (fig. 5).*

Fig. 6, 7 et 8. — Infection intracellulaire sous forme de cellules isolées (c.i. fig. 6) ou de cellules entourant des trachéides néoformées (fig. 7 et 8).

Fig. 6, 7 and 8. — *Intracellular infection: isolated cell (c.i. fig. 6) or cells surrounding tracheids (fig. 7 and 8).*

## Planche II

Mode d'infection des tissus néoformés en culture *in vitro*. Microscopie électronique : glutaraldéhyde. O<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Citrate de plomb.

Microscopie électronique : glutaraldéhyde. O<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, citrate de plomb.

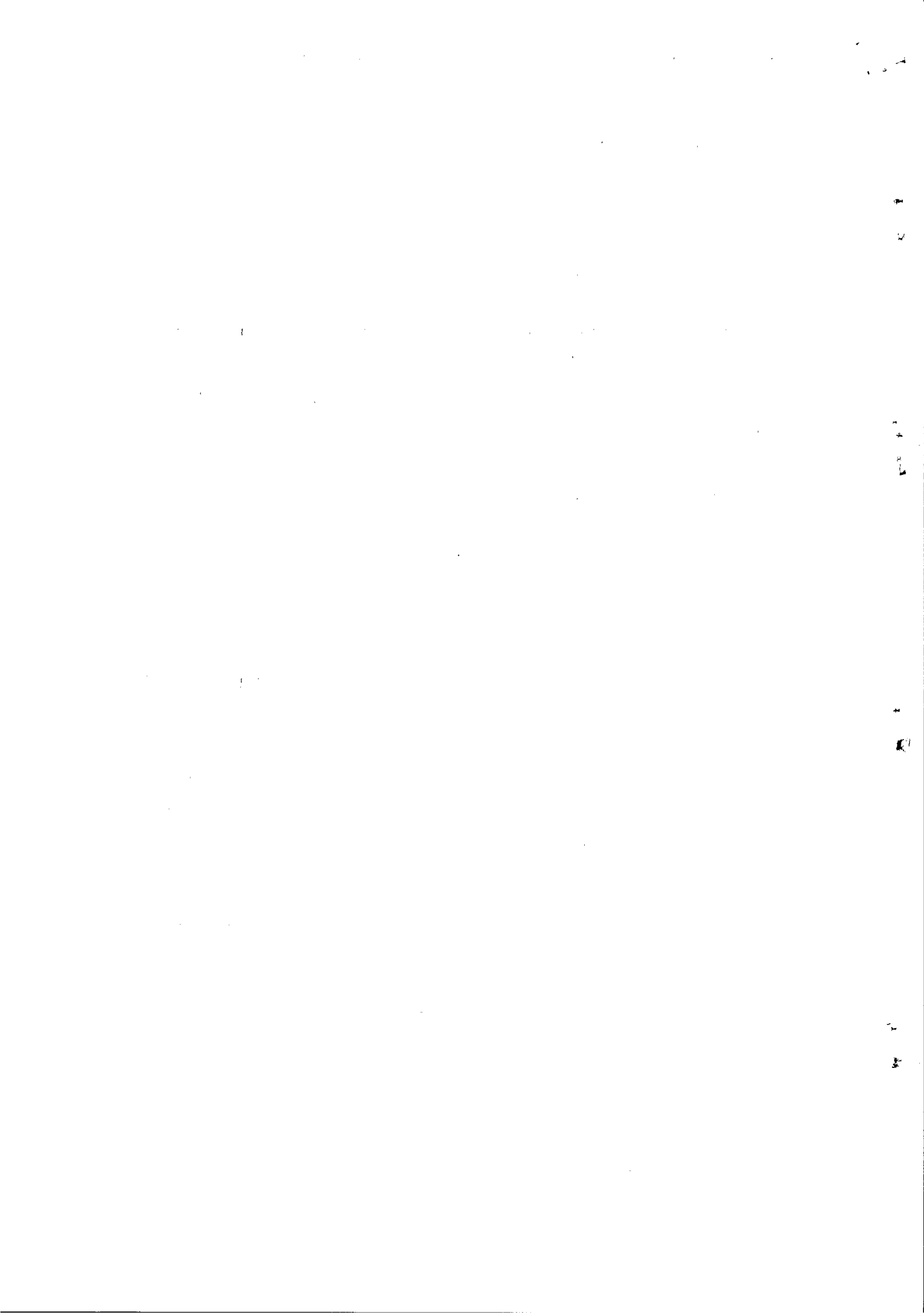
*Mode of infection of calluses. Transmission electron microscopy: glutaraldehyde. O<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, Pb citrate.*

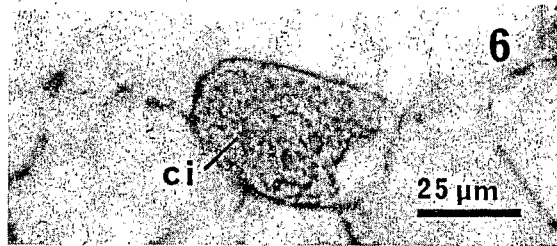
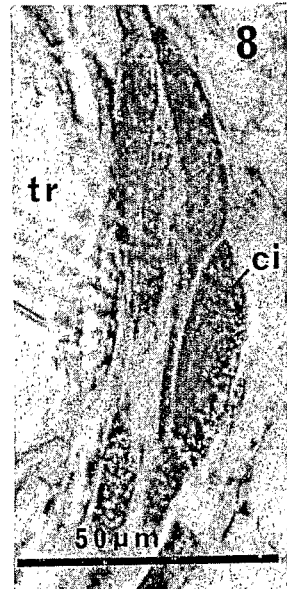
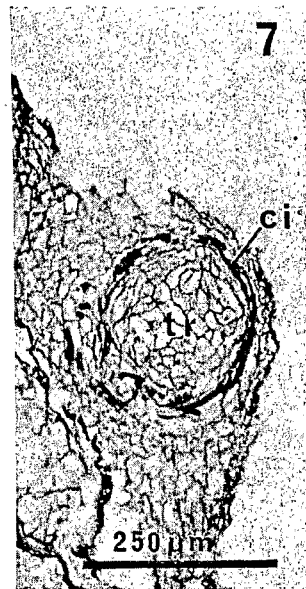
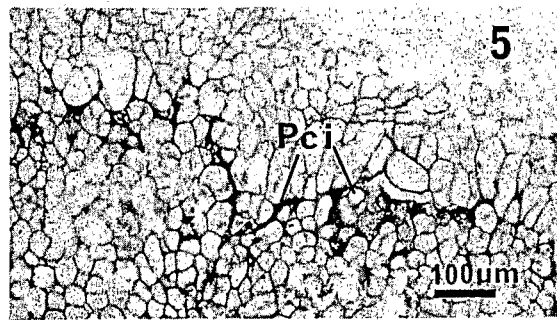
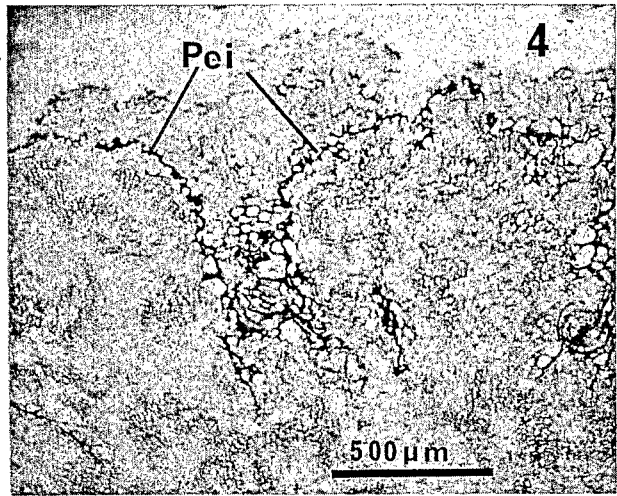
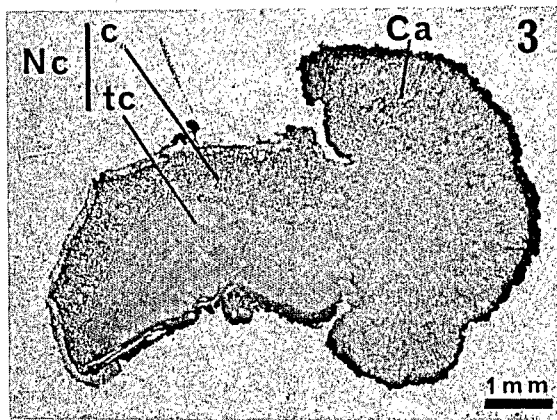
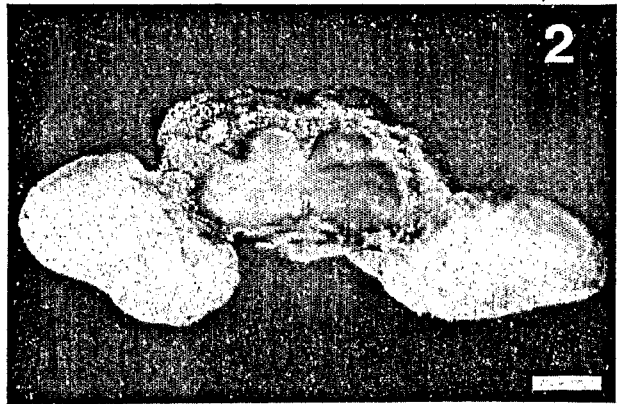
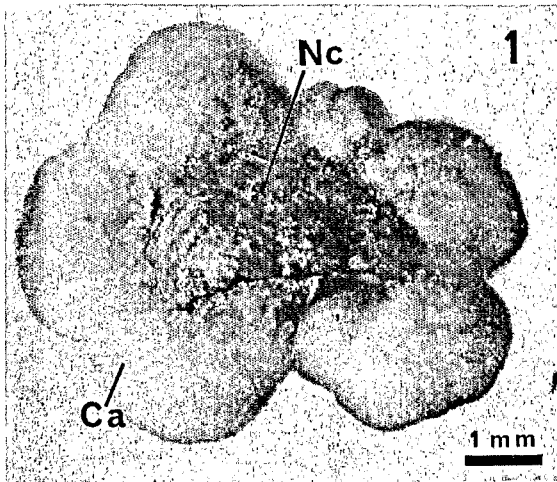
Fig. 1. — « Pseudo cordon d'infection » renfermant des *Rhizobium* (Rh), dans les tissus néoformés à partir d'un nodule caulinaire mis en culture. (C.C) cellule du cal.

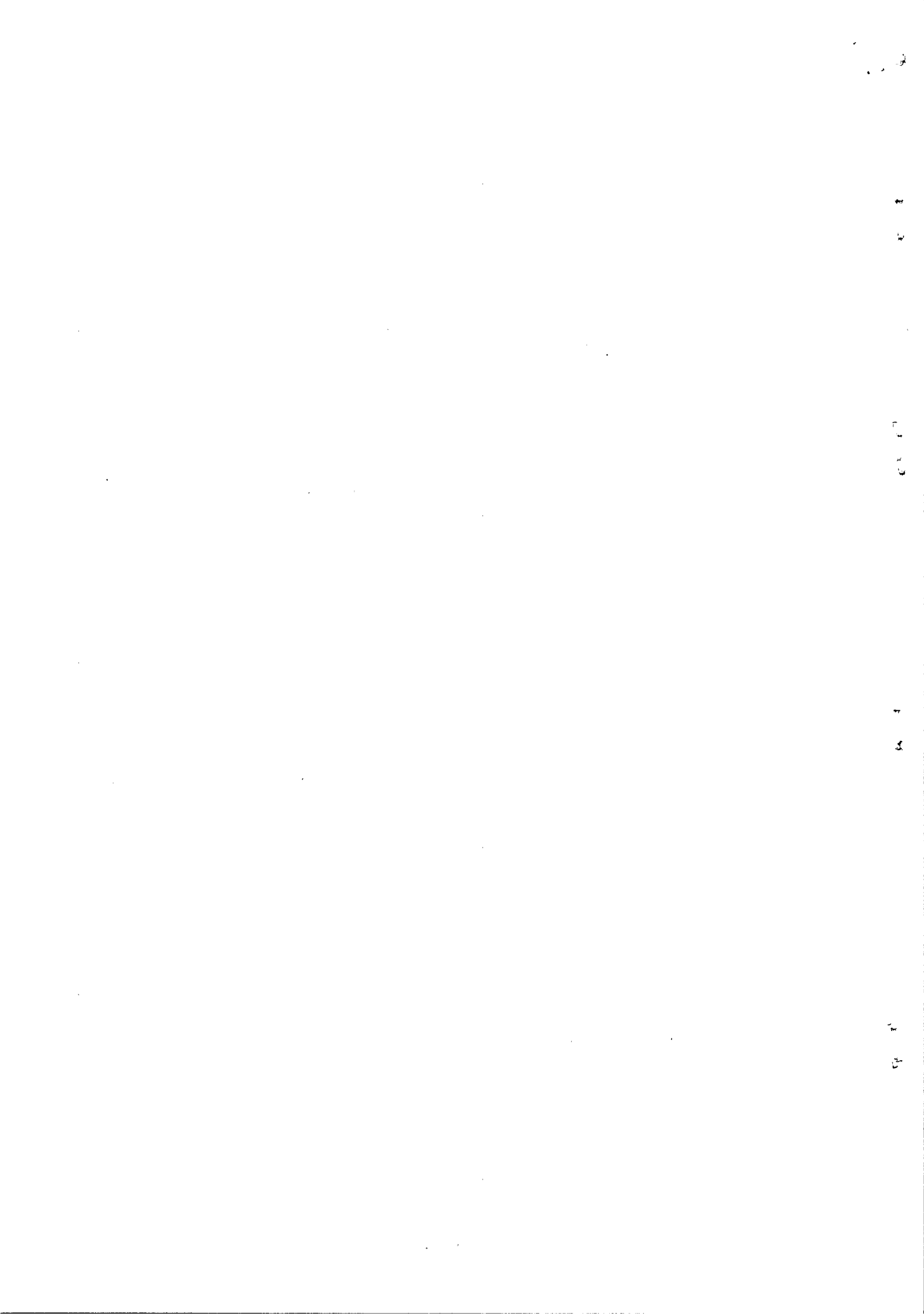
Fig. 1. — *"Pseudo infection thread" with Rhizobium in a callus obtained from a cultured stem nodule (C.C.) callus cell.*

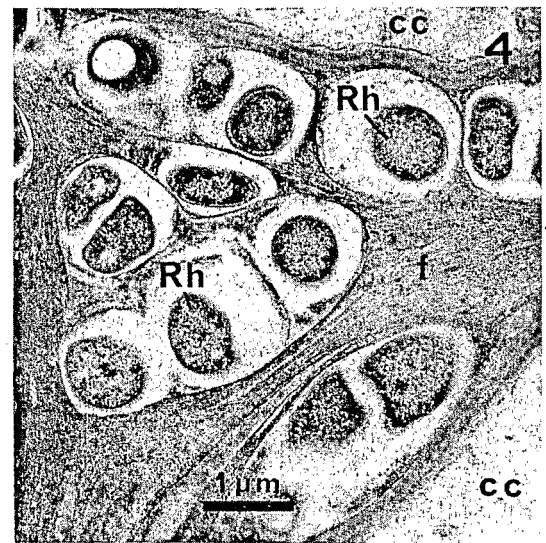
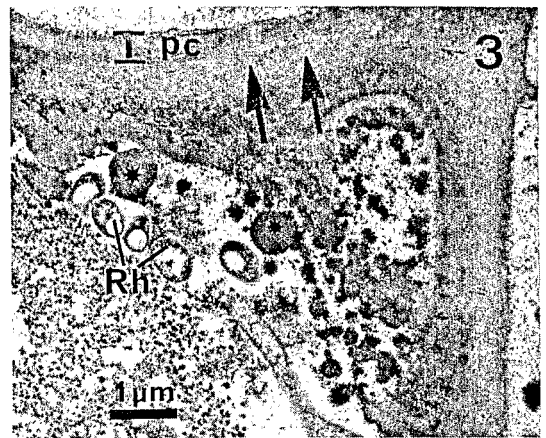
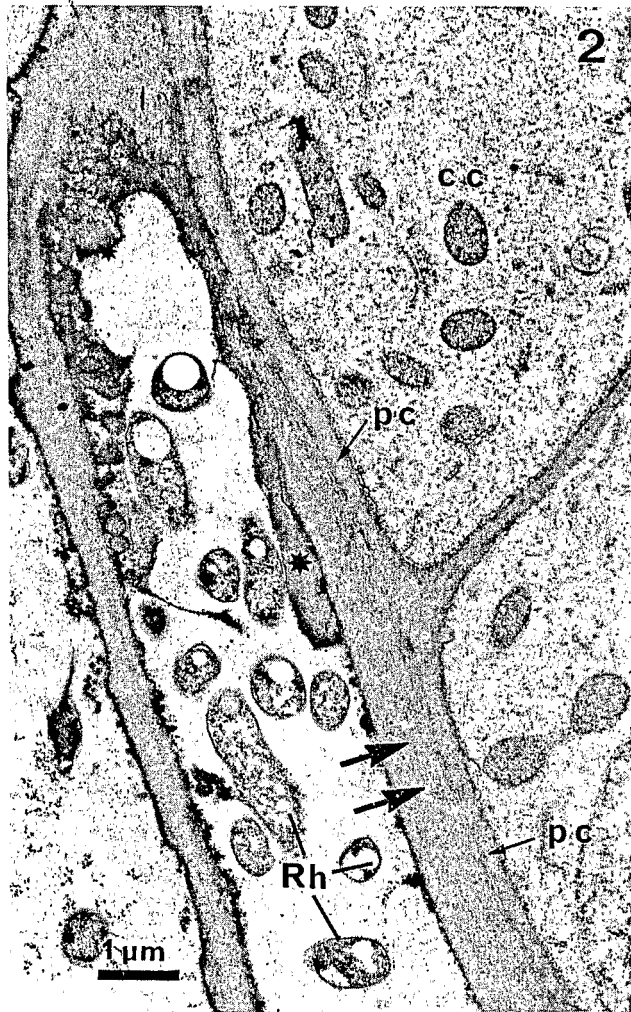
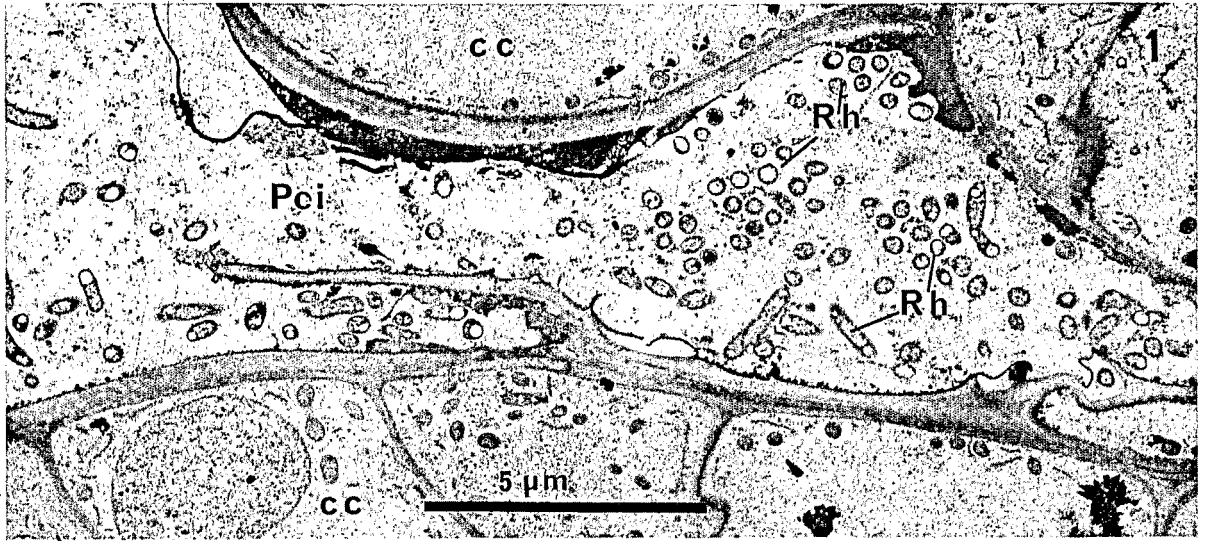
Fig. 2, 3 et 4. — Détail d'un « Pseudo cordon d'infection ». Au matériel pariétal fibrillaire (double flèche, fig. 2 et 3) mis en place contre la paroi de la cellule du cal (p. c.), s'ajoutent des dépôts granulaires denses aux électrons (étoiles, fig. 2 et 3). Dans les « Pseudo cordons d'infection » plus étroits, les *Rhizobium* (Rh) sont entourés à distance par un réseau dense de fibrilles allongées (f, fig. 4).

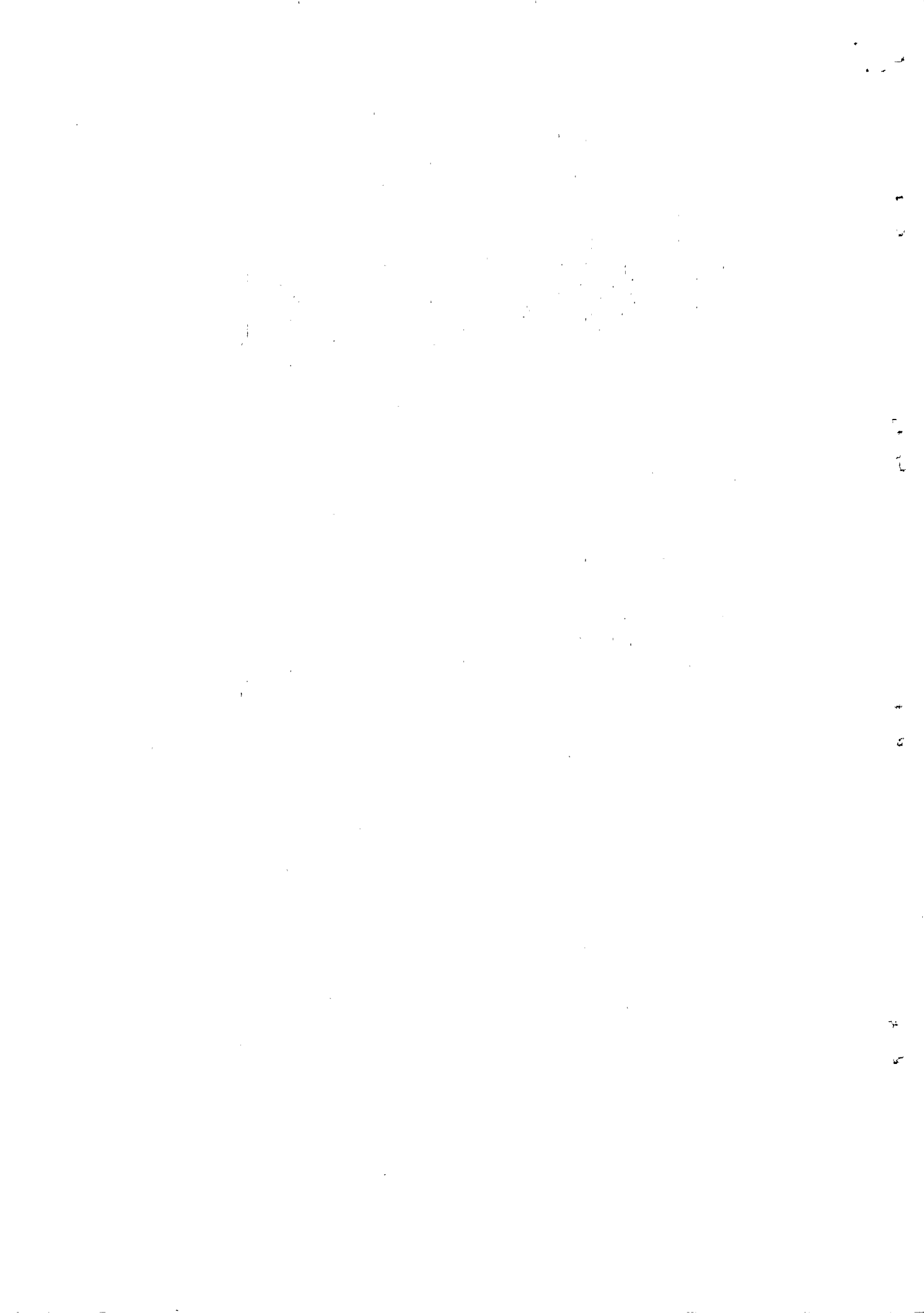
Fig. 2, 3 and 4. — *Enlargement of a "Pseudo infection thread": callus cell wall (p. c.); parietal fibrillar material (double arrow), electron dense granules (stars), internal fibrillar material (f).*



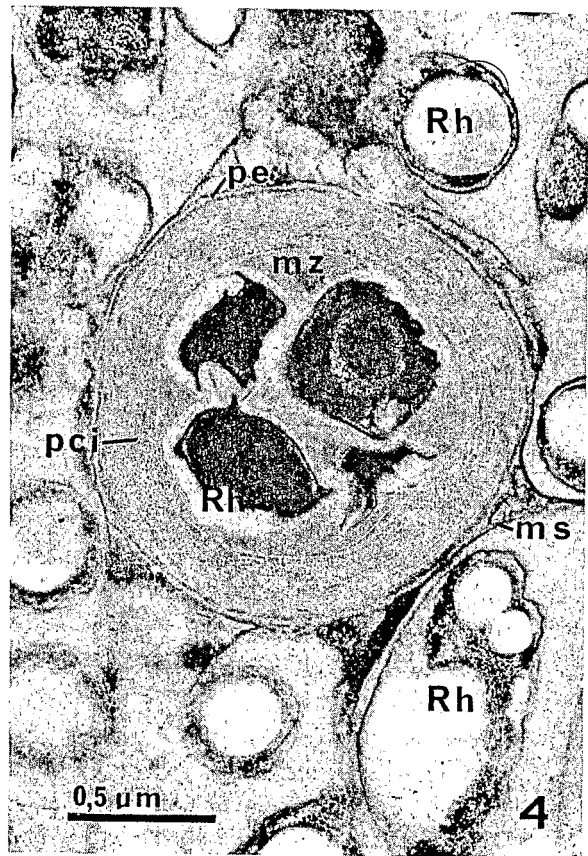
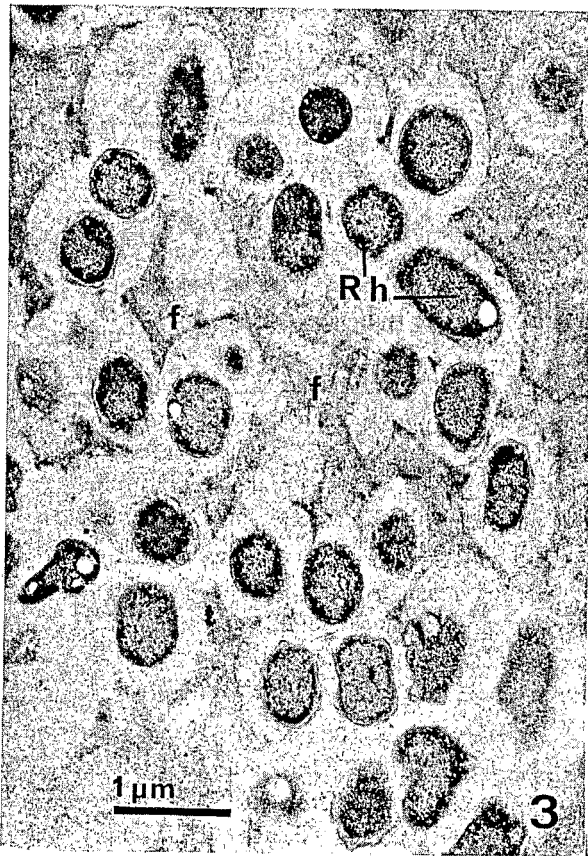
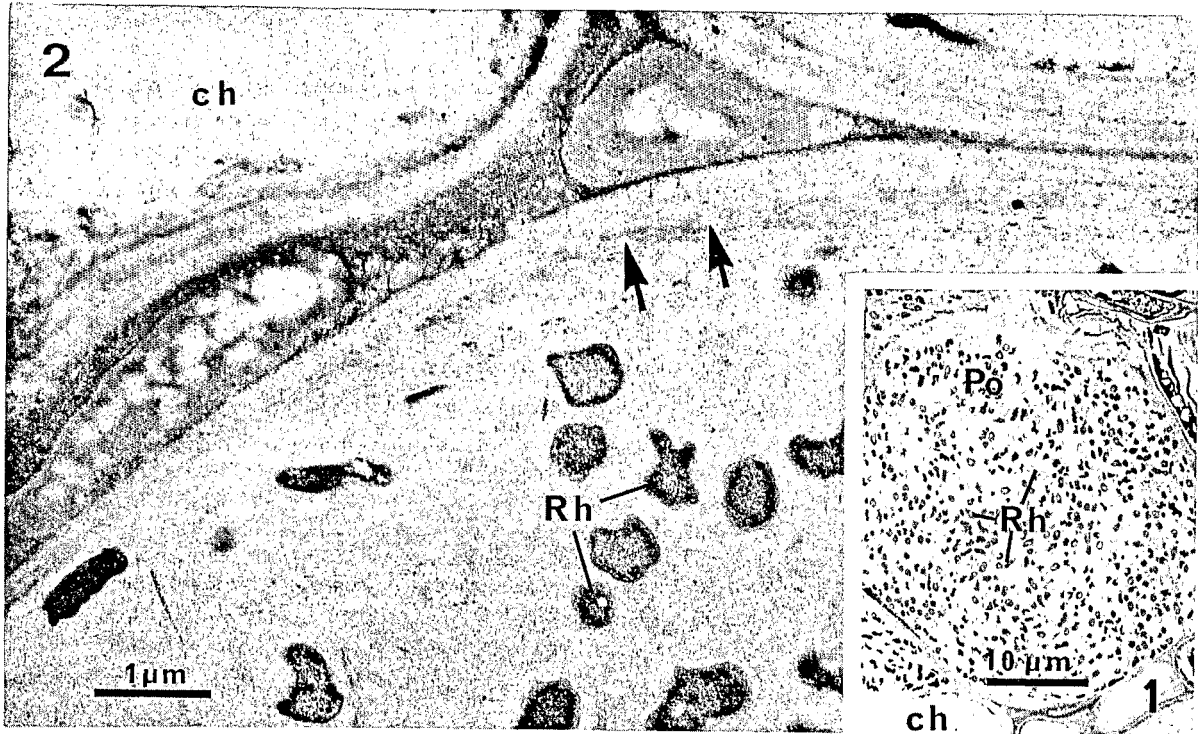


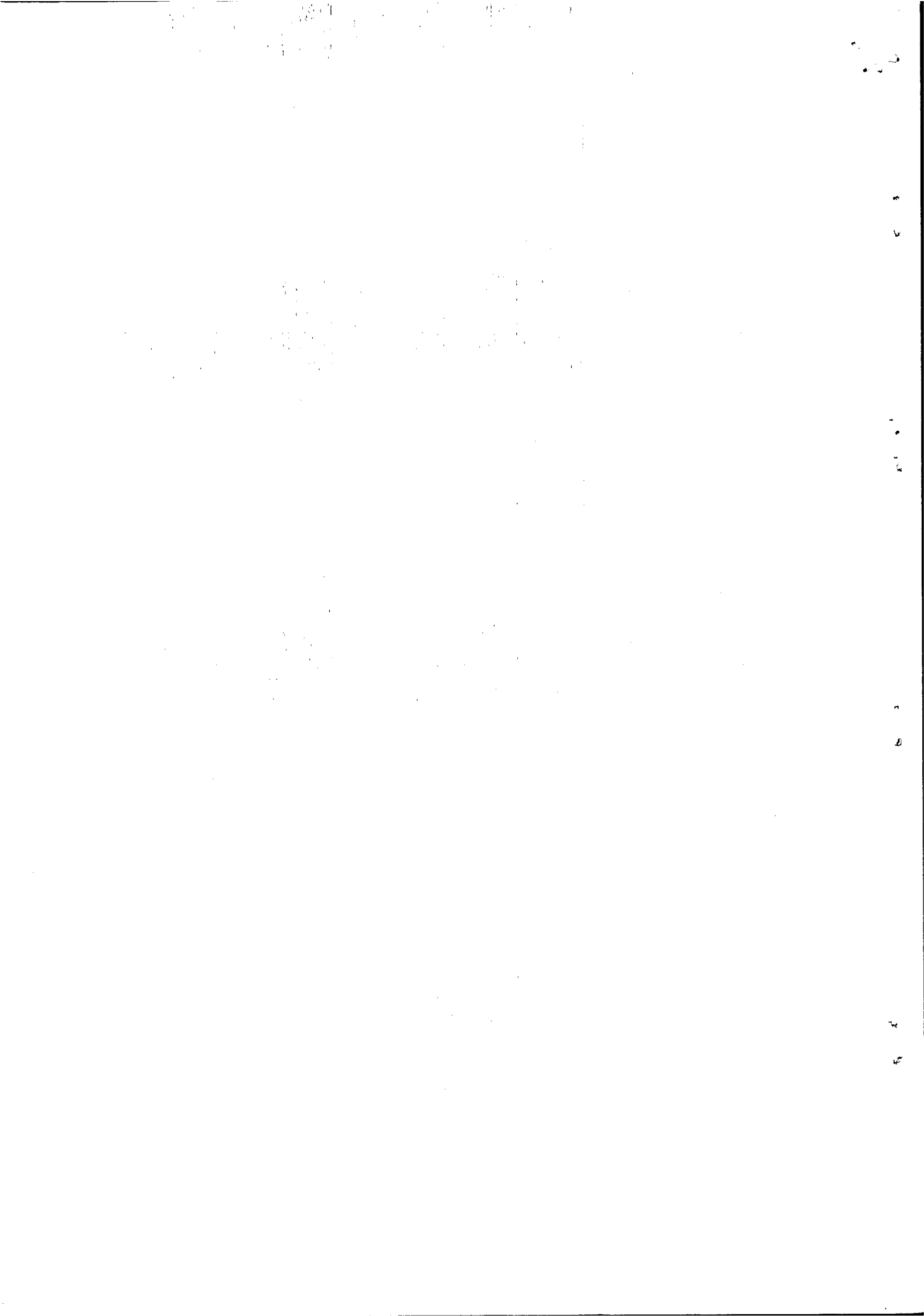












## Planche III

Mode d'infection du mamelon caulinaire sur la plante.

*Infection of a nodulation site on the plant stem.*

Microscopie électronique : glutaraldéhyde.  $O_2O_4$ , citrate de plomb.

*Transmission electron microscopy: glutaraldehyde.  $O_2O_4$ , Pb citrate.*

Fig. 1, 2 et 3. — Poche intercellulaire située entre les tissus périphériques de la base du mamelon caulinaire 3 jours après l'infection.

*Fig. 1, 2 and 3. — Intercellular cavity located in the peripheral tissues at the base of the nodulation site.*

Fig. 2. — Noter le dépôt pariétal fibrillaire (double flèche) qui entoure la poche. Rh : *Rhizobium*.

*Fig. 2. — Fibrillar material (double arrow) deposited on the wall of the cavity. Rh: Rhizobium.*

Fig. 3. — Détail de la lumière de la poche. Les *Rhizobium* (Rh) sont entourés à distance par un matériel fibrillaire lâche (f).

*Fig. 3. — Enlargement of the intercellular cavity showing Rhizobium cells (Rh). Bacteria are surrounded by a loose fibrillar material.*

Fig. 4. — Détail d'une cellule infectée dans le nodule à un stade plus avancé de l'infection. On observe à la fois des *Rhizobium* (Rh) inclus dans leur membrane de séquestration (ms) et des cordons d'infection (c. i.). p. c. i., paroi du cordon d'infection; p. e., plasmalemme; m. m., matériel matriciel.

*Fig. 4. — Rhizobium cells (Rh) sequestered in their membrane envelope and a typical infection thread (c. i.) in a mature nodule. m. m., matrix material.*

I. INFECTION DES TISSUS NÉOFORMÉS *in vitro*. MICROSCOPIE OPTIQUE. — Dans les tissus néoformés, l'infection se développe entre les cellules sous la forme d'infiltrations qui prennent fortement les colorants (fig. 4 et 5, pl. I). Ces structures, situées le plus souvent près des cellules périphériques du cal, sont analogues aux « pseudo cordons d'infection » observés dans les cas d'infection *in vitro* de cals obtenus à partir d'autres Légumineuses ([1], [10], [11]). Nous adopterons par la suite cette terminologie. Plus rarement, l'infection apparaît intracellulaire. Il s'agit soit de cellules isolées (fig. 6, pl. I), soit de cellules enveloppant des petits massifs de tracheides néoformées (fig. 7 et 8, pl. I).

*Microscopie électronique.* — Les coupes ultrafines des cals montrent de nombreux *Rhizobium* dans les « pseudo cordons d'infection » (fig. 1, pl. II). Ceux-ci sont limités par un matériel pariétal fibrillaire déposé contre les cellules de *Sesbania rostrata* (fig. 2, pl. II). Ils renferment des granules plus ou moins volumineux, des dépôts denses aux électrons (fig. 2 et 3, pl. II) et plus rarement de longues fibrilles très contrastées par le citrate de plomb (fig. 4, pl. II). On observe alors autour des Bactéries des espaces clairs aux électrons qui évoquent les enclaves délimitées par les membranes de séquestration des bactéroïdes dans les nodules *in situ*. L'infection intracellulaire décrite en microscopie photonique n'a pu être retrouvée en microscopie électronique en raison du très faible nombre de cellules renfermant les *Rhizobium*.

II. FIXATION DE L'AZOTE ATMOSPHÉRIQUE PAR LES CALS. — Les tissus néoformés et infectés par les *Rhizobium* présentent une activité réductrice d'acétylène variable (0 à 1 nmole de  $C_2H_4/h/g$  de matière fraîche). Nous ne savons pas si cette très faible activité doit être attribuée aux *Rhizobium* situés dans les zones d'infection intercellulaire ou aux *Rhizobium* situés à l'intérieur des rares cellules infectées.

III. INFECTION DES MAMELONS CAULINAIRES CHEZ LA PLANTE. — Chez la plante, les premiers stades de l'infection [12] aboutissent à la formation de poches volumineuses remplies de *Rhizobium* situées entre les cellules périphériques de la base de l'ébauche racinaire (fig. 1, pl. III). Un matériel pariétal fibrillaire néoformé et indépendant des cellules de l'hôte

constitue l'enveloppe de ces poches (fig. 2, pl. III). A l'intérieur, les *Rhizobium* sont inclus dans un matériel fibrillaire lâche ménageant des zones transparentes aux électrons autour des Bactéries (fig. 3, pl. III). Ultérieurement, des cordons d'infection émis à partir des poches pénètrent dans les cellules de l'hôte et y déversent les Bactéries [12]. Le tissu central du nodule est alors constitué de cellules renfermant à la fois des cordons d'infection et de nombreux bactéroïdes limités par une membrane de séquestration (fig. 4, pl. III). Notons que le cordon d'infection renferme un matériel matriciel dense aux électrons qui enveloppe les Bactéries.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS. — L'infection qui se développe *in vitro* peut être rapprochée de l'infection chez la plante par le fait qu'elle est intercellulaire et qu'elle induit également la synthèse de matériaux fibrillaires. Mais en réalité, il existe des différences importantes entre les deux types d'infection. Alors que l'infection *in vitro* comporte un stade unique, celui de l'infiltration des *Rhizobium* suivant des « pseudo cordons d'infection », l'infection dans les nodules de la plante comprend trois stades : multiplication des *Rhizobium* dans les poches intercellulaires, émission de cordons d'infection typiques et libération des *Rhizobium* à l'intérieur des cellules de l'hôte.

Il est permis de penser que si la première phase intercellulaire de l'infection peut être réalisée avec l'association cal-bactérie, la formation des cordons d'infection typiques à partir des poches intercellulaires nécessite la présence ou le contrôle des tissus différenciés de la plante-hôte.

La recherche de nouvelles conditions de culture des cals (régulateurs de croissance, acides aminés, teneur en azote...) pourrait permettre d'améliorer de façon sensible l'infection *in vitro* et contribuer ainsi à une meilleure connaissance de la physiologie de la symbiose *Rhizobium-Sesbania rostrata*.

M. le Professeur X. Mattei, du laboratoire de biologie animale de l'Université de Dakar, nous a permis d'utiliser le microscope électronique; M. C. Chauve nous a apporté sa collaboration technique.

(\*) Remise le 25 octobre 1982, acceptée le 15 novembre 1982.

- [1] R. D. HOLSTEN, R. C. BURNS, R. W. F. HARDY et R. R. HEBERT, *Nature*, 232, 1971, p. 173.
- [2] B. DREYFUS et Y. DOMMERGUES, *Comptes rendus*, 291, série D, 1980, p. 767.
- [3] E. DUHOX et B. DREYFUS, *Comptes rendus*, 294, série III, 1982, p. 407.
- [4] J. M. VINCENT, in *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*, Blackwell, Oxford, 1970, p. 7.
- [5] M. L. LIN et J. STABA, *Lloydia*, 24, 1961, p. 139.
- [6] J. C. NITSCH et C. NITSCH, *Ann. Physiol. Vég.*, 7, 1965, p. 251.
- [7] L. LISON, Gauthier-Villars, Paris, 1960, 397 p.
- [8] E. S. REYNOLDS, *J. Cell. Biol.*, 17, 1963, p. 208.
- [9] R. W. F. HARDY, R. D. HOLSTEN, E. K. JACKSON et R. C. BURNS, *Plant Physiol.*, 43, 1968, p. 1185.
- [10] V. RANGA RAO et N. S. SUBBA RAO, *Curr. Sc.*, 43, 1974, p. 503.
- [11] V. RANGA RAO et N. S. SUBBA RAO, *Z. Pflanzenphysiol.*, 80, 1976, p. 14.
- [12] E. DUHOX (en préparation).

E. D. : Laboratoire de Cytophysiologie végétale,  
Faculté des Sciences, Dakar, Sénégal.

D. A. : O.R.S.T.O.M., Laboratoire de Microbiologie du Sol,  
B.P. n° 1386, Dakar, Sénégal.