

Effet des souches arctiques de *Rhizobium* sur la structure des nodules du sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) et de légumineuses arctiques (*Astragalus* et *Oxytropis* spp.)¹

DANIELLE PRÉVOST² ET L. M. BORDELEAU

Station de recherches, Agriculture Canada, 2560, boulevard Hochelaga, Sainte-Foy (Québec), Canada G1V 2J3

ET

H. ANTOUN

Département des sols, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, Québec (Québec), Canada G1K 7P4

Reçu le 2 février 1988

Révision reçue le 16 décembre 1988

PRÉVOST, D., BORDELEAU, L. M., et ANTOUN, H. 1989. Effet des souches arctiques de *Rhizobium* sur la structure des nodules du sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) et de légumineuses arctiques (*Astragalus* et *Oxytropis* spp.). Can. J. Bot. **67** : 3164–3168.

La souche de *Rhizobium* N₃₁, isolée de la légumineuse arctique *Astragalus alpinus*, nodule le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) aussi efficacement que la souche SM-2, isolée du sainfoin. Nous avons examiné l'anatomie externe et la disposition des tissus des nodules de ces plantes âgées de 70 jours et infectées par ces deux souches. Les nodules du sainfoin, formés par la souche N₃₁ ou la souche SM-2, sont de forme cylindrique, à croissance indéterminée et similaires à ceux des légumineuses arctiques. Dans la zone symbiotique active des nodules de sainfoin, les bactéroïdes de la souche arctique N₃₁ sont pléiomorphiques ou sphériques, et sont entourés individuellement ou par groupes de trois par une membrane enveloppante. Cependant, les bactéroïdes de la souche SM-2 sont allongés et entourés par groupes de 3 à 12 par la membrane enveloppante. La souche arctique N₃₁ affecte donc la structure interne des nodules du sainfoin. Les nodules des légumineuses arctiques *A. alpinus*, *Oxytropis maydelliana* et *O. arctobia*, formés avec la souche N₃₁ ou la souche SM-2, contiennent des globules lipidiques, alors que les nodules du sainfoin n'en contiennent pas. Ce phénomène semble donc spécifique aux légumineuses arctiques et indépendant de l'origine de la souche infectieuse.

PRÉVOST, D., BORDELEAU, L. M., and ANTOUN, H. 1989. Effet des souches arctiques de *Rhizobium* sur la structure des nodules du sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) et de légumineuses arctiques (*Astragalus* et *Oxytropis* spp.). Can. J. Bot. **67** : 3164–3168.

Rhizobium strain N₃₁, isolated from the arctic legume *Astragalus alpinus*, nodulates sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) as efficiently as strain SM-2, isolated from sainfoin. Nodule shape and tissue arrangement of 70-day-old plants infected by these two strains were examined. Sainfoin nodules formed by either strain N₃₁ or SM-2 were cylindrical, with indeterminate growth, and similar to those found on arctic legumes. However, in the active symbiotic zone of sainfoin nodules, bacteroids of strain N₃₁ were pleiomorphic or spherical and found individually or in groups of three, surrounded by the membrane envelope, whereas the bacteroids of strain SM-2 were elongated and enclosed in clusters of 3 to 12 by each membrane envelope. Thus, arctic strain N₃₁ affects the internal structure of sainfoin nodules. Nodules of arctic legumes *A. alpinus*, *Oxytropis maydelliana*, and *Oxytropis arctobia*, infected with either strain N₃₁ or SM-2, contained lipid droplets, while sainfoin nodules did not show such characteristics. This phenomenon seems specific to arctic legumes and it is not influenced by the origin of the nodulating strain.

Introduction

L'azote fixé biologiquement par les légumineuses (*Astragalus alpinus* L., *Oxytropis maydelliana* Trautv. et *Oxytropis arctobia* Bunge) indigènes de la péninsule de Melville, Territoires du Nord-Ouest, Canada, constitue l'apport le plus important au bilan azoté de cet écosystème (Karagatzides *et al.* 1985). L'adaptation aux basses températures de cette symbiose est démontrée par une activité de la nitrogénase détectable à des températures entre 0 et -4°C mesurée sur des nodules récoltés *in situ* (Schulman *et al.* 1988) et par une bonne croissance à 5°C des souches de *Rhizobium* associées à ces légumineuses (Prévost *et al.* 1987a). À cause de leur adaptation au froid, les légumineuses et les *Rhizobium* arctiques constituent une source de matériel génétique unique et un modèle que nous explorons dans le but d'améliorer la fixation d'azote des légumineuses agricoles des régions tempérées où la basse

température diminue l'efficacité de la fixation d'azote. Dans une étude récente, nous avons montré que certaines souches arctiques peuvent noduler efficacement une légumineuse agricole des régions tempérées, le sainfoin (Prévost *et al.* 1987c). Comme l'activité de la nitrogénase paraît liée à la structure nodulaire (Sen *et al.* 1986), nous avons donc entrepris une étude comparative de la structure des nodules de sainfoin induits avec deux souches efficaces : une souche isolée d'une légumineuse arctique (N₃₁) et une souche isolée du sainfoin (SM-2). De plus, d'après une étude structurale (Newcomb et Wood 1986), la présence de globules lipidiques observés dans les nodules arctiques récoltés dans leur environnement constitue un caractère unique pouvant être relié à l'adaptation au froid de cette symbiose. Dans le but de vérifier si la présence de ces lipides est reliée génétiquement à la plante et déterminée par l'origine de la souche, nous avons donc comparé les nodules des légumineuses arctiques avec ceux de sainfoin, induits avec les deux souches citées précédemment et développés sous des conditions optimales de croissance.

1. Contribution n° 369 de la Station de recherches d'Agriculture Canada à Sainte-Foy.

2. Auteur à qui faire parvenir toute correspondance.

Matériel et méthodes

Microorganismes et culture des plantes

Les souches efficaces de *Rhizobium* utilisées dans cette étude sont la souche arctique N₃₁, isolée de *A. alpinus*, et la souche de référence SM-2, isolée du sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) (Prévost *et al.* 1987a, 1987b, 1987c). Chaque souche a poussé jusqu'à la phase stationnaire dans un milieu à base d'extrait de levure et de mannitol (Vincent 1970). Les légumineuses arctiques *A. alpinus*, *O. maydeliana* et *O. arctobia*, et le sainfoin ont été semés et inoculés tel que décrit précédemment (Prévost *et al.* 1987a). Les conditions de croissance étaient 20°C, 16 h à 350 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, alternant avec 8 h à 15°C et à l'obscurité pour le sainfoin, et à 250 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ pour les légumineuses arctiques. Après 70 jours de croissance, les nodules ont été récoltés, fixés et enrobés pour les études microscopiques.

Préparation des échantillons pour la microscopie

Des sections longitudinales de 1–2 mm de nodules ont été fixées pendant 3 h à la température de la pièce dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% préparée dans un tampon phosphate de potassium, 0,025 M, pH 6,8. Les tissus ont ensuite été lavés dans la solution tampon à 4°C pendant 30 min avec trois changements de bain, puis postfixés dans une solution de tétraoxyde d'osmium à 1% pendant 2 h à la température de la pièce. Après trois lavages dans le tampon phosphate sur une période de 30 min, les tissus fixés ont été déshydratés dans des solutions d'acétone à différents degrés (10 à 100%), suivi de deux bains d'oxyde de propylène. L'infiltration a été faite graduellement en utilisant un mélange 1:1 (v/v) d'oxyde de propylène et de résine de Spurr (Newcomb et Wood 1984). Après évaporation de l'oxyde de propylène (16–20 h), les tissus ont été enrobés dans la résine de Spurr en utilisant des moules plats (Peel-a-way). Les moules ont été placés dans un dessiccateur pendant 24 h, puis à l'étuve à 60°C pendant 48 h pour la polymérisation.

Microscopie photonique

Des coupes semi-épaisses de 0,5 à 1,5 μm ont été préparées avec un ultramicrotome LKB Ultratome III. Les observations générales ont été faites sur les coupes colorées au bleu de toluidine à 0,05% préparé dans une solution 1% de tétraborate de sodium (Newcomb et Wood 1986). Pour vérifier l'identité des globules lipidiques, d'autres coupes ont été colorées avec une solution saturée de noir Soudan B, préparée dans l'éthylène glycol (O'Brien et McCully 1981), en chauffant les lames à 60°C pendant 30 min pour assurer la pénétration du colorant à travers la résine. Les coupes ont été observées et photographiées avec un microscope Leitz Orthomat.

Microscopie électronique

Les coupes ultraminces ont été effectuées avec un couteau à diamant. Elles ont été déposées sur des grilles recouvertes de Formvar, et colorées pendant 30 min dans une solution saturée d'acétate d'uranyl préparée dans 50% éthanol, puis 5 à 10 min dans du citrate de plomb à 0,02% (Newcomb et Wood 1986). Les observations et photographies ont été faites avec un microscope électronique à transmission Siemens.

Résultats et discussion

Morphologie externe et arrangement des tissus

La morphologie des nodules de sainfoin est similaire à celle des nodules des légumineuses arctiques des genres *Astragalus* et *Oxytropis*. Ils sont cylindriques, à croissance indéterminée, comme ceux de la plupart des légumineuses des régions tempérées (Newcomb 1981). D'après les relations taxonomiques entre les espèces de la famille des légumineuses, ce sont des nodules de type astragaloïde, lequel se retrouve dans plusieurs tribus, notamment la tribu des *Galegeae*, à laquelle appartiennent les légumineuses arctiques, et la tribu des *Hedysareae*, dont le sainfoin fait partie (Corby 1981). L'origine de la souche infectieuse (souche arctique N₃₁ ou souche du sainfoin

SM-2) n'a pas affecté la morphologie externe et la disposition des tissus des nodules du sainfoin. Ces résultats confirment les observations antérieures qui suggèrent que la morphologie externe d'un nodule est une caractéristique de la plante-hôte. En effet, des souches différentes de *Rhizobium*, à croissance rapide et à croissance lente, produisent le même type de nodule sur l'espèce *Vigna unguiculata* et, dans plusieurs cas, une même souche de *Rhizobium* induit des nodules différents sur des plantes-hôtes différentes (Meyer 1982; Dart 1977).

Bactéroïdes des nodules du sainfoin

Au niveau de la forme des bactéroïdes observés dans les cellules infectées matures de la zone symbiotique active des nodules de sainfoin, les deux souches étudiées ont montré des morphologies différentes (fig. 1). La souche homologue au sainfoin, SM-2, forme essentiellement des bactéroïdes allongés, souvent groupés en grand nombre dans chaque membrane enveloppante. Les bactéroïdes de la souche arctique N₃₁ sont sphériques, ovoïdes ou pléiomorphiques et entourés individuellement ou par groupes de trois dans chaque membrane enveloppante.

Ces deux souches d'origine différente ont la même efficacité symbiotique sur le sainfoin d'après le rendement obtenu en poids de matière sèche (Prévost *et al.* 1987c). L'activité de la nitrogénase à 70 jours de croissance est également similaire pour les deux souches (Prévost *et al.* 1987b), soit 29,23 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot (\text{g masse sèche de la partie aérienne})^{-1}$ pour la souche N₃₁, et 27,67 pour la souche du sainfoin SM-2. Cependant, l'activité spécifique de la nitrogénase exprimée par gramme de nodules (masse sèche) est plus élevée pour la souche arctique N₃₁ (130 μmol) que pour la souche du sainfoin SM-2 (81,21 μmol) puisque la masse nodulaire formée avec la souche N₃₁ (35,8 mg/plante) est beaucoup plus faible que celle obtenue avec la souche SM-2 (63,8 mg/plante).

Ainsi, la souche arctique N₃₁ affecte à la fois la masse nodulaire et la forme des bactéroïdes des nodules du sainfoin comparativement à la souche homologue au sainfoin SM-2. De telles différences morphologiques entre les bactéroïdes de souches de *Rhizobium* d'origine différente avec une même légumineuse n'ont jamais été rapportées à notre connaissance, car il est admis que cette caractéristique est dépendante de la plante-hôte (Dart 1977). La nature exacte de l'interaction de la bactérie avec la plante-hôte n'est pas connue, mais on peut supposer que ces différences se reflètent aussi sur le métabolisme relié à la réaction de la fixation d'azote. Des mesures de l'activité de la nitrogénase avec les bactéroïdes de la souche N₃₁ et de la souche SM-2 permettraient de vérifier si les conditions intranodulaires sont responsables de l'activité plus élevée de la nitrogénase de la souche N₃₁ à basses températures, telle que mesurée dans des travaux antérieurs (Prévost *et al.* 1987b). En effet, il a déjà été établi que les différences observées dans le taux de fixation d'azote d'une même souche sur deux hôtes différents seraient reliées aux différences anatomiques intracellulaires, telles que la structure et l'arrangement des bactéroïdes, puisque les bactéroïdes isolés des deux légumineuses ont montré une activité semblable (Sen *et al.* 1986; Sen et Weaver 1984).

Présence de globules lipidiques

Comme il a été mentionné précédemment, les nodules des légumineuses arctiques récoltés sur le terrain contiennent des globules lipidiques (Newcomb et Wood 1986). Dans notre travail, l'identité de ces lipides a été confirmée par une coloration au noir Soudan B, où ils apparaissent noirs, et par des observa-

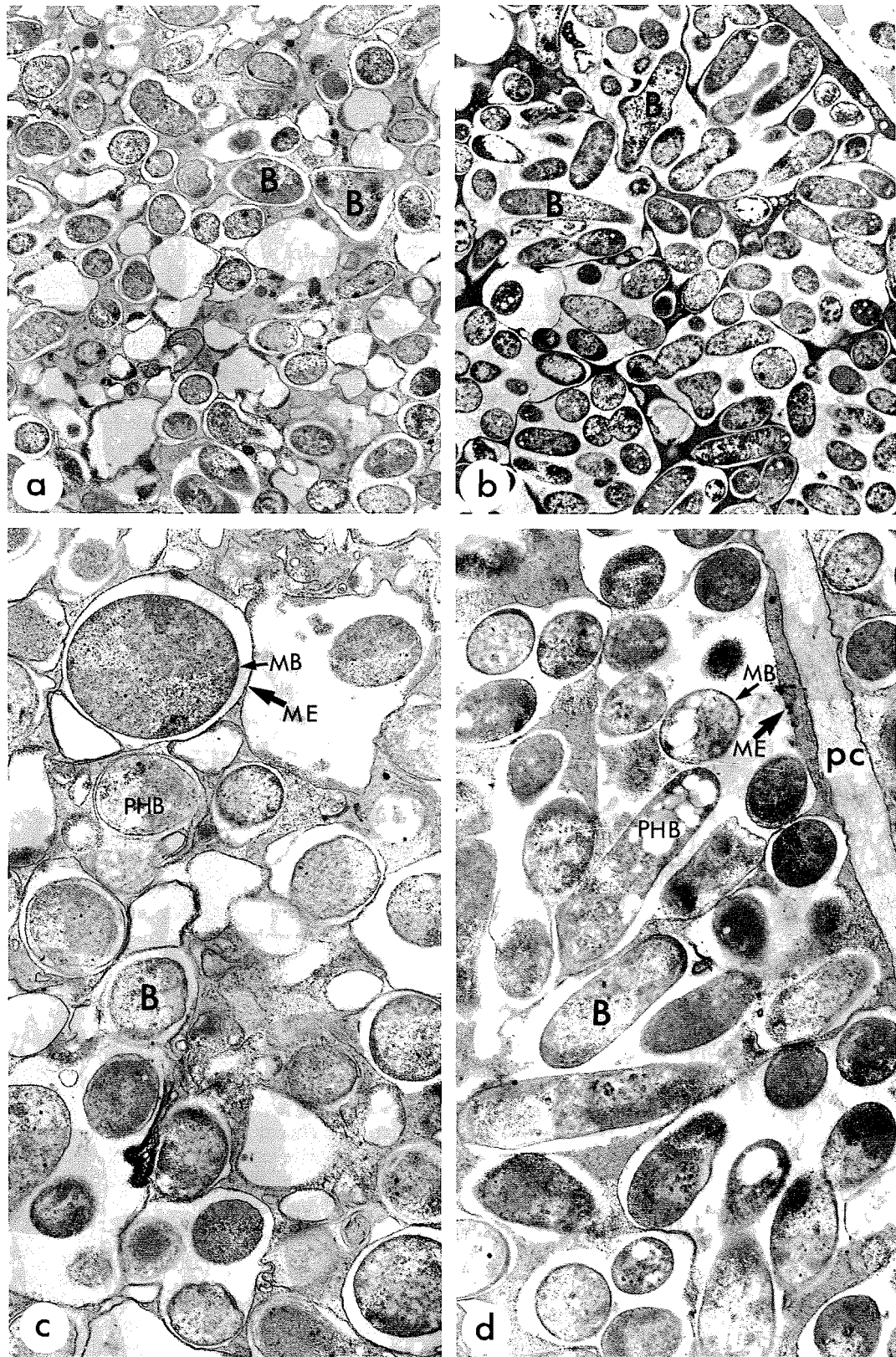


FIG. 1. Cellules infectées matures de nodules de sainfoin âgés de 70 jours, formés avec la souche N₃₁ (a et c) et la souche SM-2 (b et d). Les bactéroïdes (B) de la souche N₃₁ (a et c) sont pléiomorphiques ou sphériques. Ils possèdent de petites inclusions transparentes aux électrons ressemblant à des inclusions de polyhydroxybutyrate (PHB). Chaque membrane enveloppante (ME) contient de un à trois bactéroïdes. Les bactéroïdes (B) de la souche SM-2 (b et d) sont en général allongés, et contiennent des inclusions de PHB. Ils sont groupés en nombre de 3 à 12 dans chaque membrane enveloppante (ME). On peut aussi distinguer la membrane des bactéroïdes (MB), et la paroi cellulaire (PC) de la cellule infectée. Microscopie électronique. Figures 1a et 1b, $\times 5600$; 1c et 1d, $\times 15\ 000$.

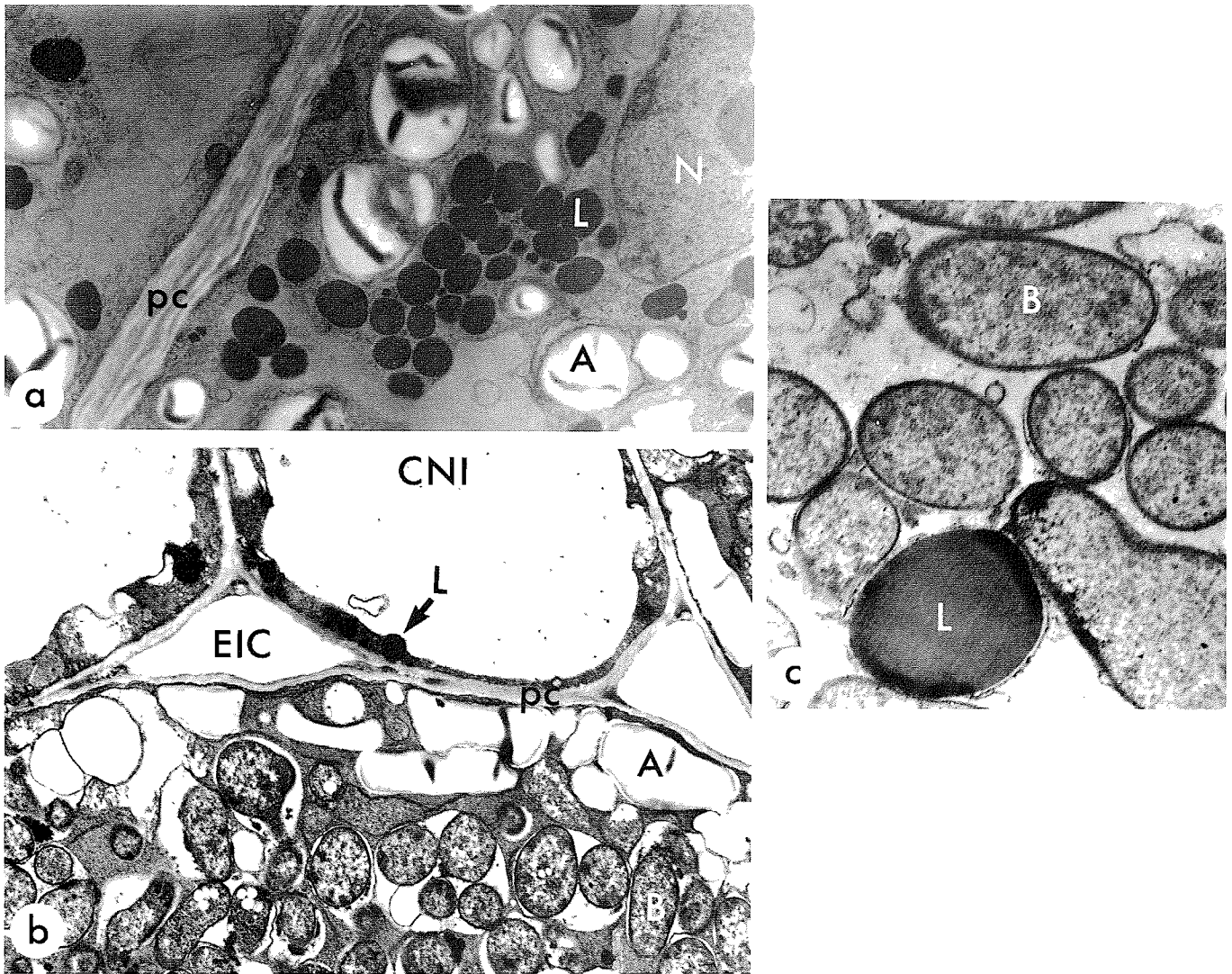


FIG. 2. Observation des globules lipidiques dans les nodules de légumineuses arctiques âgés de 70 jours, par la microscopie électronique. Fig. 2a. Cellule du cortex nodulaire d'*O. maydelliana* montrant les amyloplastes remplis d'amidon (A) et les gouttelettes lipidiques (L). On peut voir le noyau de la cellule (N) et la paroi cellulaire (pc). $\times 15\,000$. Fig. 2b. Portion de la zone symbiotique naissante d'*A. alpinus* montrant des cellules non infectées (CNI) qui contiennent des gouttelettes lipidiques (L), et une cellule adjacente infectée contenant des bactéroïdes (B) et des granules d'amidon (A). EIC, espace intercellulaire. $\times 5600$. Fig. 2c. Portion d'une cellule infectée d'*A. alpinus* montrant une gouttelette lipidique (L) parmi les bactéroïdes (B). $\times 15\,000$.

tions au microscope électronique, où ils apparaissent comme des structures arrondies opaques aux électrons.

Dans les nodules des trois espèces de légumineuses arctiques formés par la souche arctique N₃₁ et dans ceux formés par la souche SM-2 (pouvant noduler l'*O. arctobia* et l'*A. alpinus*), nous avons observé de nombreux globules lipidiques dans les cellules du méristème et du cortex (fig. 2). Ils étaient moins nombreux dans les cellules non infectées adjacentes aux cellules infectées, et plus rarement observés dans les cellules infectées. Les nodules de sainfoin, formés par la souche N₃₁ ou la souche SM-2, ne contenaient pas de globules lipidiques.

Ainsi, nous pouvons supposer que les globules lipidiques sont un caractère génétique acquis par l'évolution des légumineuses arctiques dans leur habitat naturel puisqu'ils sont aussi présents chez ces plantes développées dans les conditions tempérées optimales (15 et 20°C) de croissance. On ne peut

toutefois pas établir s'il existe une relation entre la quantité de ces lipides et la température de croissance ou le stade de développement de la plante. De plus, l'origine de la souche ne joue aucun rôle pour induire leur présence. Ces lipides pourraient être utilisés comme source d'énergie pour la fixation d'azote ou pour le métabolisme intranodulaire, tout comme il a été rapporté que les réserves lipidiques sont impliquées dans les mécanismes de tolérance et d'adaptation au froid des plantes arctiques (McCown 1975; Tieszen *et al.* 1981). Ces lipides pourraient être des triglycérides, car leur structure est similaire à celle observée dans les graines des plantes oléagineuses et de quelques autres espèces végétales (Gurr 1980). À cause de leur présence dans les nodules arctiques, la symbiose résultant d'une association entre les *Rhizobium* arctiques et une légumineuse arctique est probablement mieux adaptée aux basses températures que la symbiose *Rhizobium* arctique —

sainfoin. D'autres études sont requises pour vérifier si ces lipides sont reliés à l'expression de la nitrogénase et si les *Rhizobium* peuvent les métaboliser.

Remerciements

Nous remercions Dr W. Newcomb pour ses conseils et M. Claude Baillargeon pour son aide technique.

- CORBY, H. D. L. 1981. The systematic value of leguminous root nodule. *Dans* Advances in legume systematics. *Éditeurs* : R. M. Polhill et P. H. Raven. Royal Botanical Gardens, Kew. p. 657–669.
- DART, P. J. 1977. Infection and development of leguminous root nodules. *Dans* A treatise on dinitrogen fixation. Section III. *Éditeurs* : R. W. F. Hardy et W. S. Silver. John Wiley and Sons, New York. p. 367–472.
- GURR, M. I. 1980. The biosynthesis of triacylglycerols. *Dans* The biochemistry of plants. Vol. 4. Lipids: structure and function. *Éditeur* : P. K. Stumpf. Academic Press, New York. p. 205–249.
- KARAGATZIDES, J. D., LEWIS, M. C., et SCHULMAN, H. M. 1985. Nitrogen fixation in the high arctic tundra at Scarpa Lake, Northwest Territories. *J. Can. Bot.* **63** : 974–979.
- MCCOWN, B. H. 1975. Physiological responses of root systems to stress conditions. *Dans* Physiological adaptations to the environment. *Éditeur* : F. J. Vernberg. Intext Educational Publishers, New York. p. 225–234.
- MEYER, E. G. M. 1982. Development of leguminous root nodules. *Dans* Nitrogen fixation. Vol. 2. *Rhizobium*. *Éditeur* : W. J. Broughton. Clarendon Press, Oxford. p. 311–331.
- NEWCOMB, W. 1981. Nodule morphogenesis and differentiation. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* **13** : 247–298.
- NEWCOMB, W., et WOOD, S. M. 1984. Methods in transmission electron microscopy with special emphasis on plant cells. *Biology 305*, Laboratory manual, Queen's University, Kingston, Ontario.
- 1986. Fine structure of nitrogen-fixing leguminous root nodules from the Canadian Arctic. *Nord. J. Bot.* **6** : 609–626.
- O'BRIEN, T. P., et McCULLY, M. E. 1981. The study of plant structure: principles and selected methods. Termacarphi Pty Ltd., Melbourne, Australia.
- PRÉVOST, D., BORDELEAU, L. M., CAUDRY-REZNICK, S., SCHULMAN, H., et ANTOUN, H. 1987a. Characteristics of rhizobia isolated from three legumes indigenous to the Canadian high arctic: *Astragalus alpinus*, *Oxytropis maydelliana* and *Oxytropis arctobia*. *Plant Soil*, **98** : 313–324.
- PRÉVOST, D., ANTOUN, H., et BORDELEAU, L. M. 1987b. Effects of low temperatures on nitrogenase activity in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) nodulated by arctic rhizobia. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45** : 205–210.
- 1987c. Symbiotic effectiveness of indigenous arctic rhizobia on a temperate forage legume: sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Plant Soil*, **104** : 63–69.
- SCHULMAN, H. M., LEWIS, M. C., TIPPING, E. M., et BORDELEAU, L. M. 1988. Nitrogen fixation by three species of *Leguminosae* in the Canadian high arctic tundra. *Plant Cell Environ.* **11** : 721–728.
- SEN, D., et WEAVER, R. W. 1984. Nitrogenase (C₂H₂) activities of isolated peanut and cowpea bacteroids at optimal oxygen availability and comparison with whole nodule activities. *J. Exp. Bot.* **35** : 785–789.
- SEN, D., WEAVER, R. W., et BAL, A. K. 1986. Structure and organization of effective peanut and cowpea root nodules induced by rhizobial strain 32HI. *J. Exp. Bot.* **37** : 356–363.
- TIESZEN, L. L., LEWIS, M. C., MILLER, P. C., MAYO, J., CHAPIN, F. S., III, et OECHEL, W. 1981. An analysis of the processes of primary production in tundra growth forms. *Dans* Tundra ecosystems: a comparative analysis. *Éditeurs* : L. C. Bliss, O. W. Head et J. J. Moore. Cambridge University Press, Cambridge. p. 285–356.
- VINCENT, J. M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook No. 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.