

Comment accroître
la fixation symbiotique de l'azote
par les arbres en milieu tropical?

Y. R. DOMMERGUES

Laboratoire de Biotechnologie
des Systèmes Symbiotiques Forestiers Tropicaux
(CTFT/ORSTOM/CNRS)
94736 Nogent sur Marne Cedex
France

Les arbres fixateurs d'azote sont appelés à jouer un rôle de plus en plus grand sous les tropiques, non seulement en tant que producteurs de bois et de biomasse, mais aussi en tant qu'auxiliaires ou même parfois composants majeurs des systèmes de production agricole. C'est ce rôle spécifique que nous tenterons d'illustrer par quelques exemples dans la première partie de notre communication.

En fait, l'intérêt des arbres fixateurs d'azote est en grande partie fonction de leur activité fixatrice d'azote réelle au champ. Or cette activité dépend d'une part de leur potentiel fixateur d'azote intrinsèque, d'autre part de leur tolérance aux contraintes de l'environnement. Pour accroître la fixation d'azote *in situ*, il est donc indispensable de chercher à améliorer ces deux caractéristiques. Depuis une quinzaine d'années, les progrès remarquables de nos connaissances sur le processus de fixation biologique de l'azote, non seulement au niveau moléculaire ou cellulaire, mais aussi à l'échelle des systèmes entiers et des écosystèmes, ont fait naître l'espoir que l'on parviendrait assez rapidement à des résultats applicables au champ. En fait, le transfert de nos connaissances fondamentales à l'application a été plus long qu'on ne pouvait le prévoir. Toutefois, certaines des recherches de base effectuées récemment ont déjà eu des retombées importantes. Celles-ci se sont concrétisées par la mise au point de technologies nouvelles que nous présenterons dans la deuxième partie de notre communication.

Enfin, dans la troisième partie, nous exposerons les perspectives qui ouvrent devant nous la voie à des applications à court ou à moyen terme. Pour terminer cette introduction, nous souhaiterions faire remarquer que par arbres nous entendons ici non seulement les espèces végétales de grande taille, mais aussi les espèces ligneuses pérennes de dimensions plus modestes, désignées habituellement par sous les termes d'arbustes ou buissons.

1. RAPPEL DU ROLE DES ARBRES FIXATEURS D'AZOTE EN MILIEU TROPICAL

Rappelons tout d'abord que, chez les plantes ligneuses, on peut distinguer deux types de symbioses:

- les symbioses avec *Rhizobium*, bactérie associée à un grand nombre d'espèces appartenant à la vaste famille des Légumineuses et également, ainsi qu'on l'a découvert récemment, à quelques espèces appartenant au genre *Parasponia* (Ulmacées) (Trinick, 1976; Becking, 1982).

- les symbioses avec *Frankia*, bactérie classée dans le groupe des actinomycètes, associée à environ 200 espèces de plantes, pour la plupart ligneuses, réparties dans huit familles; du fait de leur association avec un actinomycète, ces plantes sont désormais désignées sous le nom de *plantes actinorhiziennes* (Torrey et Tjepkema, 1978).

Dans les deux types de symbiose, l'infection de la plante hôte par la bactérie a lieu au niveau des racines, provoquant une prolifération des cellules de la plante hôte pour former un nodule (ou nodosité). A notre connaissance, il existe seulement une espèce de Légumineuse ligneuse qui, en plus des nodules racinaires caractéristiques de toutes les Légumineuses fixatrices d'azote, est dotée de nodules caulinaires: il s'agit d'*Aeschynomene elaphroxylon* (Dreyfus, communication personnelle). A côté de l'immense groupe des Légumineuses fixatrices d'azote, les plantes actinorhiziennes occupent une place plus beaucoup modeste sur le plan numérique. Pourtant il s'agit là de systèmes fixateurs qui, comme on le verra ultérieurement, présentent un intérêt exceptionnel aussi bien sur le plan fondamental que sur celui des applications.

Les espèces ligneuses fixatrices d'azote sont appelées à jouer un rôle de plus en plus important dans les régions tropicales pour les raisons suivantes.

(i) Ce sont, sauf exception (par ex. *Leucaena leucocephala*), des plantes frugales capables de pousser sur des sols très pauvres ou même totalement dépourvus en azote. Il en résulte que ces arbres peuvent croître normalement dans les sols infertiles, inutilisables par l'agriculture ou les sols dégradés par l'homme par suite de surexploitation ou d'erreurs d'aménagement. Même dans des conditions défavorables pour d'autres végétaux, ces arbres peuvent donc contribuer à fournir aux populations du bois d'œuvre, du bois de feu, différents produits dits accessoires, tels que fruits et gommés ou produits médicinaux, et aussi du fourrage. On oublie trop souvent que certaines Légumineuses ligneuses fixatrices d'azote sont d'excellentes plantes fourragères, notamment dans les régions à faible pluviométrie. A titre d'exemple, citons le cas de deux Légumineuses ligneuses, *Medicago arborea* (ou luzerne arborescente) et *Acacia cyanophylla*, qui, introduites par le Service des Eaux et Forêts de Tunisie, dans les pâturages très dégradés de la région d'Enfidha ont permis de multiplier par quatre la charge de bétail.

(ii) Les arbres qui ont un bon pouvoir fixateur d'azote peuvent contribuer puissamment à régénérer les sols dégradés en reconstituant leur stock de matière organique, permettant ainsi l'installation de cultures annuelles dans le cadre de rotations, comme c'est le cas de *Casuarina oligodon* en Papouasie Nouvelle Guinée (Thiagalingam, 1983), ou de cultures intercalaires dans le cadre de systèmes agroforestiers (Huxley, 1983). Bien souvent aussi, l'emploi de certaines espèces s'impose en raison de leur aptitude à coloniser le sol et à le protéger contre l'érosion éolienne ou pluviale. Sur le plan de la production forestière proprement dite, il pourrait être judicieux, dans certaines conditions environnementales, de

développer l'établissement de peuplements mixtes constitués par des mélanges d'espèces fixatrices et non fixatrices d'azote, reproduisant artificiellement des associations qui existent parfois spontanément dans les formations naturelles, telles que les associations *Eucalyptus-Casuarina* ou *Eucalyptus-Acacia* en Australie (Sprent, 1983). Il est bien évident que ce sont les arbres dont le potentiel fixateur d'azote est le plus élevé soit qui présentent le plus d'intérêt pour les applications forestières ou agroforestières évoquées ci-dessus. On verra ultérieurement que le potentiel fixateur d'azote peut varier dans de larges proportions d'une espèce à l'autre et qu'il peut être amélioré, parfois considérablement. Ce potentiel fixateur d'azote peut s'exprimer spontanément ou requérir l'inoculation préalable avec la bactérie spécifique.

2. LES TECHNOLOGIES NOUVELLES ACTUELLEMENT DISPONIBLES

Dans le cadre des recherches récentes sur la génétique des *Rhizobium*, on a identifié les principaux gènes impliqués dans la symbiose. Cette étape est actuellement dépassée puisqu'on a entrepris l'analyse détaillée du rôle des différents gènes et de leurs interactions (Ditta, 1985). De tels travaux ouvrent des perspectives particulièrement prometteuses, mais il n'ont pas encore débouché sur des applications pratiques.

En revanche, les recherches conduites depuis peu dans les domaines de la physiologie et de l'écologie ont ouvert la voie à des progrès technologiques marquants, notamment en ce qui concerne la préparation des inoculums, l'inoculation à grande échelle des plantes actinorhiziennes et l'obtention de clones d'arbres sélectionnés pour une meilleure aptitude à fixer l'azote.

2.1. Production d'inoculum par le procédé des bactéries incluses

Rappelons que les biologistes du sol utilisent le terme d'*inoculation* pour désigner l'opération qui consiste à infecter les racines des plantes fixatrices d'azote avec une culture de la bactérie symbiotique spécifique. Pour en faciliter l'utilisation, cette culture est adsorbée sur un support solide, très généralement de la tourbe stérile neutralisée (pH 7,0). Ce type d'inoculum n'avait pratiquement pas évolué depuis plus d'un demi-siècle. Mais on a proposé, il y a quelques années, un nouveau procédé fondé sur l'inclusion des bactéries dans un gel de polymère (Dommergues et al., 1979). Ce procédé est applicable aussi bien aux bactéries fixatrices d'azote qu'aux champignons endomycorhiziens (Ganry et al., 1982, 1985). Après avoir subi des améliorations importantes, ce procédé est actuellement en cours d'industrialisation. Bien entendu, pour la fabrication des inoculums modernes, on utilisera non seulement des souches sauvages, mais aussi de nouvelles souches obtenues par manipulation génétique.

2.2. Inoculation à grande échelle des plantes actinorhiziennes

Les symbioses actinorhiziennes sont connues depuis très longtemps, puisque, dès 1866, un microbiologiste russe publiait une étude sur ces symbioses dans les Mémoires de l'Académie Impériale des Sciences de Saint-Petersbourg (Voronin, 1866). Mais, curieusement, il a fallu que plus d'un siècle s'écoule avant que l'on parvienne à isoler et cultiver le microorganisme symbiotique, l'actinomycète *Frankia*. C'est à un groupe de l'Université Harvard au Massachusetts que revient le mérite d'avoir réalisé le premier isolement de *Frankia* à partir de nodules de *Comptonia peregrina*, plante

colonisatrice des sols dégradés, très répandue au nord des Etats-Unis et au Canada (Callahan et al., 1978). Cette brillante percée a été à l'origine d'une floraison de recherches fondamentales sur l'écologie, la physiologie et, depuis peu de temps, sur la génétique de *Frankia*.

Les premières retombées de ces travaux de base se sont manifestées rapidement puisque, dès 1979, les chercheurs de l'Université Laval au Québec mettaient sur pied un programme d'inoculation portant sur 7 millions de plants de différentes espèces actinorhiziennes, essentiellement des aunes, en vue de la revégétation, comme disent nos collègues canadiens, d'une vaste zone au nord Québec, dont la couverture végétale avait été littéralement dévastée au cours de l'installation du complexe des barrages hydroélectriques de la Baie James. Le succès des plantations a été total (Périnet et al., 1985).

Sensiblement au même moment, une série d'opérations de fixation des dunes vives du littoral sénégalais par reforestation avec *Casuarina equisetifolia* (filao) a pu être menée à bien grâce à l'inoculation systématique des jeunes plants en pépinière. Dans ce cas, les travaux sur le terrain ont été conduits par la Direction des Eaux et Forêts du Sénégal avec l'aide de la FAO et l'appui scientifique de l'ORSTOM. L'inoculation des plants en pépinière a été d'abord réalisée par aspersion des jeunes semis avec une suspension de nodules (Andeque-Lingui et Dommergues, 1983). Bien que les résultats obtenus grâce à cette méthode simple aient été jusqu'à présent satisfaisants, cette pratique doit être évitée, non seulement en raison du danger d'introduction de pathogènes, mais aussi en raison du fait que l'on ignore l'effectivité des souches apportées avec les nodules. Il est bien préférable de recourir à l'inoculation avec des cultures pures de *Frankia*. C'est désormais possible, puisque nous avons déjà pratiqué avec succès l'inoculation à moyenne échelle de *Casuarina equisetifolia* avec une souche effective (ORS021001). Il est intéressant de noter, à ce propos, que l'inoculation avec une telle souche est nettement plus bénéfique que l'apport d'engrais azoté (Tableau 1).

Etant donné que la croissance de *Frankia* de *Casuarina* est lente ou très lente, le problème qui se pose désormais est de savoir produire *Frankia* de *Casuarina* en quantité suffisante pour réaliser des inoculations à grande échelle. Fort heureusement, dans notre laboratoire, nous sommes parvenus depuis peu à améliorer la méthode de culture de ce microorganisme, ce qui nous permettra d'effectuer prochainement des inoculations de type industriel.

Grâce au développement des collections de *Frankia* (par ex. Université Laval, Québec; Rutgers University, New Jersey; BSSFT, Nogent sur Marne), nous disposons désormais d'un assez grand choix de souches spécifiques, dont certaines peuvent présenter un intérêt forestier de tout premier plan. C'est ainsi que l'isolement, effectué récemment, d'une souche de *Frankia* capable de noduler effectivement *Allocasuarina decaisneana* (Diem et Sougoufara, communication personnelle) pourrait faciliter l'introduction de cette espèce très résistante à la sécheresse dans certaines régions où, jusqu'à présent, il n'avait pas été possible de la faire pousser, faute de disposer de la souche spécifique.

Il convient de souligner ici que la Chine attache une importance toute particulière aux plantes actinorhiziennes puisque, pour protéger la région côtière du sud, on a installé au cours des dernières années une ceinture protectrice de plus d'un million d'hectares de *Casuarina equisetifolia* (Turnbull, 1983). Des projets impliquant une aide internationale importante sont en cours d'élaboration pour étendre encore davantage en Chine

l'utilisation des plantes actinorhiziennes, notamment *Casuarina* et *Hippophae rhamnoides*. Les progrès de nos connaissances fondamentales sur les symbioses actinorhiziennes trouveront dans ce vaste pays un champ d'application à la mesure de l'extraordinaire moisson de résultats fondamentaux qui s'accumulent actuellement sur les *Frankia*.

2.3. Sélection des plantes hôtes en fonction de leur aptitude à fixer l'azote en symbiose et multiplication végétative

Il est désormais clair qu'il existe entre les espèces de grandes différences en ce qui concerne leur potentiel fixateur d'azote. C'est ainsi qu'*Acacia auriculiformis* (Domingo, 1983), *A. wearnsl* (Orchard et Darby, 1956), *Leucaena leucocephala* (National Research Council, 1977) ou *Casuarina equisetifolia* (Gauthier et al., 1985) peuvent être considérés comme d'excellents systèmes fixateurs d'azote, alors qu'*Acacia holosericea* est caractérisé par un pouvoir fixateur d'azote plutôt faible (Cornet et al., 1985). On ignore encore trop souvent l'existence de cette variabilité interspécifique, dont la connaissance est pourtant indispensable et doit servir de base à tout programme de développement forestier.

Il n'y a pas de règle générale permettant de prévoir l'aptitude à la nodulation chez les légumineuses, pas plus d'ailleurs que chez les plantes actinorhiziennes. On sait seulement que (i) la majorité des espèces de la sous-famille des Mimosacées nodulent, bien qu'il existe des exceptions, telles que *Parkia biglobosa*, (ii) presque toutes les Papilionacées nodulent, (iii) les Césalpiniacées nodulent rarement: c'est ainsi que *Cassia siamea* ne nodule pas; il y a toutefois des exceptions à cette dernière règle, par exemple *Cordeauxia edulis*, Légumineuse du désert de l'Ogaden bien connue pour sa résistance remarquable à l'aridité (National Research Council, 1979). Pour de plus amples informations sur l'aptitude à la nodulation des Légumineuses ligneuses, on pourra consulter des listes, encore provisoires, établies par différents auteurs (voir par ex. Allen and Allen, 1981; Halliday, 1984; Felker, 1984).

En réalité, ce qui nous intéresse plus particulièrement ici n'est pas tant la variabilité interspécifique que nous avons évoquée plus haut, mais la variabilité intraspécifique. Cette dernière est généralement très marquée chez les arbres, où la fécondation croisée est fréquente, alors que, chez de très nombreuses plantes annuelles cultivées, c'est l'autofécondation qui est largement répandue (Pickersgill, 1983). La variabilité intraspécifique peut porter sur un grand nombre de caractères, dont les plus importants, en dehors de l'aptitude à fixer l'azote en symbiose, sont la vitesse de croissance, la résistance aux pathogènes, la tolérance à l'aridité ou à la salinité du sol. En ce qui concerne plus particulièrement la vitesse de croissance, la sélection a porté jusqu'à présent sur *Leucaena leucocephala* (Brewbaker, 1983) et *Prosopis spp.* (Felker et al., 1981).

Quant à la sélection de la plante hôte en fonction de son aptitude à fixer l'azote en symbiose, elle a été proposée depuis longtemps pour les plantes annuelles (Caldwell et Vest, 1977), mais c'est seulement depuis peu que les recherches se développent dans cette direction (voir par ex. Gresshoff et al., 1985). Dans le cas des arbres, une telle stratégie devrait pouvoir être adoptée facilement pour deux raisons: la première est que les arbres présentent une variabilité spontanée souvent très importante; la deuxième raison, qui est de nature économique, est que les plantes pérennes peuvent être multipliées par voie végétative, ce qui ne peut se concevoir, en général, pour les plantes annuelles, dont la densité à l'hectare est de l'ordre de 100 000 plants, contre 2 000 à 5 000 pour les arbres.

La possibilité d'exploiter la variabilité intraspécifique pour accroître la fixation d'azote est illustrée par le Tableau 2, qui rapporte les résultats préliminaires d'expériences conduites au centre ORSTOM de Dakar, Sénégal. Deux clones de *Casuarina equisetifolia* (α et β) caractérisés par des potentiels fixateurs d'azote différents ont été cultivés dans un sol sableux (95% de sable) déficient en azote (teneur en azote total: 0,02%). Une moitié des plantes n'a pas été inoculée, l'autre a été inoculée avec la souche de *Frankia* ORS021001 (Diem et al., 1983). En l'absence d'inoculation, la croissance des deux clones a été également médiocre. Lorsqu'il y a eu inoculation, la biomasse du clone β (exprimée en poids sec et en azote total des parties aériennes) a été 2,6 fois plus élevée que celle du clone α , ce que l'on peut expliquer par le fait que le poids des nodules, et la fixation d'azote (mesurée par la réduction de l'acétylène) chez le clone β étaient 1,6 fois plus élevés que chez le clone α . Sans pouvoir être considéré comme hypernodulant, le clone β apparaît nettement plus performant que le clone α ; c'est pourquoi nous avons entrepris une étude comparative au champ du pouvoir fixateur d'azote de ces deux clones en faisant appel à la méthode isotopique. Il est intéressant de noter que, dans l'expérience que nous venons de rapporter, l'activité réductrice d'acétylène spécifique ou ARAS (exprimée en fonction du poids sec des nodules) n'était pas significativement différente pour les deux clones, ce qui peut s'expliquer facilement si l'on admet que l'ARAS serait sous la dépendance de la souche de *Frankia* et non sous celle de la plante hôte. Les recherches sur la sélection de clones performants impliquent parallèlement la mise au point de méthodes fiables de multiplication végétative. C'est effectivement ce qui a été réalisé pour *Casuarina equisetifolia*. Etant donné que le bouturage classique présentait l'inconvénient de donner des plants plagiotropes ou à fructification anormalement précoce, on a recherché une méthode ne présentant pas cet inconvénient. Duhoux et al. (1986) ont trouvé une solution originale à ce problème en proposant l'utilisation d'explants constitués par des inflorescences immatures.

Ce dernier résultat montre le bénéfice que les recherches sur la fixation d'azote peuvent tirer des progrès réalisés au cours des dernières années dans le domaine des cultures de tissus végétaux. À ce propos, notons que, dans différents laboratoires, on commence à étudier la multiplication végétative de certaines Légumineuses ligneuses, par ex. *Acacia koa* (Skolman, 1986), *A. albida* (Duhoux et Davies, 1985), *Albizia falcataria* (National Research Council, 1979). De telles recherches constituent un préalable à la multiplication des clones sélectionnés pour leur potentiel fixateur d'azote.

3. PERSPECTIVES D'AVENIR

Il est très probable qu'on pourra, à l'avenir, améliorer encore la fixation d'azote en ayant recours aux approches qui ont été définies ci-dessus, et aussi en adoptant d'autres stratégies de recherche que nous présenterons ci-après sommairement.

3.1. Accroissement du potentiel fixateur d'azote des systèmes existant déjà
Ainsi qu'on l'a souligné antérieurement on peut tenter d'intervenir sur l'une et/ou l'autre des composantes de la symbiose.

En ce qui concerne la bactérie, on sait que l'on peut désormais faire appel aux techniques de génie génétique pour créer de nouvelles souches plus

performantes que les souches actuellement utilisées (Beringer et al., 1980). C'est ainsi que l'on peut imaginer que le potentiel fixateur d'azote remarquable de la souche de souche de *Rhizobium* ORS571 (souche spécifique de *Sesbania rostrata*) pourra être transféré à des souches nodulant d'autres légumineuses, dans le but de leur conférer un potentiel fixateur d'azote accru.

Quant à la plante hôte, on a déjà indiqué plus haut, à propos de *Casuarina equisetifolia*, qu'en exploitant sa variabilité génétique spontanée, il était possible d'obtenir des individus plus performants sur le plan de la fixation d'azote. Les perspectives ouvertes dans ce domaine sont vastes, puisqu'il existe maintenant des méthodes permettant d'accroître artificiellement la variabilité du matériel végétal en faisant agir des substances (par ex. N-méthyl-N-nitrosoguanidine) ou des radiations (par ex. irradiation UV ou X) mutagènes sur des populations de cellules végétales cultivées *in vitro*. Après le traitement mutagène, on procède à la sélection des lignées de cellules en utilisant des procédures plus ou moins complexes (voir par ex. Bourgin, 1983; Kirby, 1985).

3.2. Amélioration de la tolérance des systèmes existants aux contraintes de l'environnement

Rien ne sert de disposer de systèmes fixateurs d'azote hautement performants s'ils ne sont pas tolérants à certaines contraintes de l'environnement, notamment salinité ou aridité, excès ou carence de certains éléments, ou présence de pathogènes. La première solution qui vient à l'esprit consiste à éliminer le ou les facteurs limitants en faisant appel à des pratiques culturales appropriées, telles que la stérilisation du sol ou l'apport d'engrais. Mais ces pratiques ne sont pas toujours techniquement ou économiquement applicables. L'autre solution consiste à sélectionner ou créer des systèmes fixateurs insensibles ou peu sensibles à l'impact des facteurs limitants. Cette deuxième approche peut être envisagée, puisque nous commençons désormais à maîtriser les techniques qui permettent de conférer le caractère de tolérance souhaité, aussi bien à la bactérie qu'à la plante hôte. On a vu au paragraphe précédent qu'en exploitant la variabilité induite par différents procédés l'on pouvait espérer obtenir des plantes résistant à un environnement défavorable. Le problème de la tolérance des systèmes symbiotiques fixateurs d'azote aux facteurs limitants est complexe. Le cas de *Leucaena leucocephala* illustre bien ce fait. Cet arbre est considéré, à juste titre, comme un arbre miracle dans nombre de pays, notamment en Asie du Sud Est et en Amérique Centrale, où son pouvoir fixateur d'azote, sans atteindre les estimations exagérées souvent publiées (Guevarra et al., 1978; Halliday et Somasegaran, 1982), est cependant très honorable, puisque, d'après les calculs de Högberg et Kvarnström (1982), il correspondrait à 100 kg de N₂ fixé ha⁻¹an⁻¹. Alors que l'inoculation de *Leucaena leucocephala* planté dans des sols non acides et dépourvus des *Rhizobium* spécifiques donne des résultats spectaculaires (Diatloff, 1973), l'inoculation de cet arbre est sans effet si les sols sont acides. Pour la mise en valeur de ces derniers sols, on s'est donc orienté vers l'utilisation de souches de *Rhizobium* tolérant l'acidité. Les résultats ont été décevants puisque, malgré une nodulation satisfaisante, l'inoculation n'a eu aucun effet sur la croissance des arbres (Halliday, 1985). Tout récemment, on a pu identifier des génotypes de *Leucaena leucocephala* tolérant l'acidité du sol (Hutton, 1985). De tels génotypes pourraient prospérer dans des sols acides et y fixer l'azote à

condition d'être inoculés avec des souches effectives de *Rhizobium* tolérant également l'acidité.

Un facteur limitant fréquent est la salinité du sol, ce facteur affectant en principe davantage la plante hôte que la bactérie symbiotique. On sait maintenant obtenir des variants de plantes résistant au sel en exploitant la variation somaclonale. Cette approche est fondée sur le fait que, dans un cal cultivé dans des milieux enrichis en sel, on peut détecter des lignées de cellules présentant une bonne tolérance au sel (Naborg et al., 1980). L'étape suivante, qui parfois présente de grandes difficultés, consiste à régénérer la plante à partir des cals.

Il est bien connu l'azote combiné du sol peut réduire ou même inhiber la nodulation et réprimer la fixation d'azote une fois les nodules formés. Lorsque les forêts constituées d'espèces fixatrices d'azote vieillissent, il y a progressivement accumulation d'azote combiné dans le sol, d'où possibilité d'inhibition de la fixation d'azote, ce qui peut être particulièrement préjudiciable si les arbres sont très sensibles à la présence d'azote combiné dans le sol.

Deux approches classiques ont été suggérées pour remédier à cette situation: (i) sélection de souches de bactéries symbiotiques tolérantes à l'azote combiné, (ii) obtention de plantes capables de fixer simultanément l'azote atmosphérique et d'utiliser l'azote du sol. La deuxième approche a été utilisée avec succès dans le cas du soja (Gresshoff et al., 1985).

Une troisième approche, fondée sur le fait que les légumineuses à nodules caulinaires sont capables de fixer activement l'azote même en présence de fortes teneurs d'azote combiné dans le sol (Dreyfus et Domergues, 1980; D. Alazard, communication personnelle), consisterait à transmettre leur caractère de nodulation caulinaire à des arbres, tels que *Sesbania grandiflora*.

3.3. Extension de l'aptitude à fixer l'azote à des plantes non-fixatrices

Grâce aux progrès du génie génétique et de la culture de tissus végétaux *in vitro*, on peut désormais imaginer des manipulations dont nous donnons ci-dessous les grandes lignes; ces manipulations impliquent ou non le transfert de l'aptitude à noduler.

3.3.1. Transfert de l'aptitude à fixer l'azote à la plante elle-même (sans transfert de l'aptitude à noduler)

Si le transfert de gènes clonés de bactéries fixatrices d'azote à des cellules végétales a été envisagé, il y a déjà plusieurs années (Hollaender, 1977), il ne peut s'agir là que d'un projet à long terme, car nous ne savons pas si l'ensemble des gènes nécessaires à la fixation d'azote seront incorporés, exprimés et transmis par la plante entière après leur introduction dans les cellules végétales (National Research Council, 1982). Toutefois, si l'on tient compte du développement récent des découvertes en biologie moléculaire, on ne peut ignorer les possibilités que présente cette stratégie.

3.3.2. Transfert de l'aptitude à noduler par hybridation de plantes nodulantes et non-nodulantes

Partant de l'idée que l'association avec les *Rhizobium* n'est pas limitée aux seules espèces de la famille des Légumineuses (on a vu précédemment que certaines espèces du genre *Parasponia* pouvaient fixer l'azote en symbiose avec *Rhizobium*) et que *Frankia* pouvait infecter des plantes appartenant à des familles éloignées taxonomiquement les unes des autres, on peut

envisager avec optimisme la possibilité de transférer l'aptitude à noduler à des plantes non-nodulantes. Pour atteindre cet objectif, on pourrait recourir non seulement aux méthodes classiques d'hybridation, mais aussi aux méthodes d'hybridation somatique (Kirby, 1985); ces dernières pourraient être particulièrement utiles dans les cas d'incompatibilité interspécifique.

3.3.3. Micro-greffage d'une plante non-nodulante sur une plante nodulante
Dès à présent, un groupe de l'Université de Corvallis, Oregón, vient de d'aborder l'étude du microgreffage d'une espèce de Rosacée non fixatrice d'azote sur une autre Rosacée actinorhizienne (Kyle et Righetti, 1985). A l'Université Laval, on envisage très sérieusement le microgreffage du bouleau jaune (dont le bois est excellent) sur l'aune. D'autres techniques plus sophistiquées, telles que les techniques de génie génétique, pourront aussi prochainement concourir à atteindre l'objectif que nous venons de décrire.

3.3.4. Transfert indirect de l'aptitude à fixer l'azote par l'intermédiaire de champignons mycorhiziens
Il est probablement plus facile de transférer l'ensemble de gènes requis pour fixer l'azote à un champignon qu'à une plante. C'est pourquoi il est assez séduisant de prendre en considération cette démarche. Cependant on risque de se heurter à certaines difficultés, dont une, en particulier, n'a pas encore été résolue: c'est l'impossibilité où l'on se trouve actuellement de cultiver *in vitro* les champignons endomycorhiziens.

4. CONCLUSION

En guise de conclusion, nous formulerons deux remarques, l'une concernant l'orientation des recherches, l'autre précisant les domaines d'application de la fixation biologique de l'azote.

(i) On a rappelé, au début de cet exposé, que l'objectif essentiel était d'obtenir des systèmes caractérisés à la fois par un potentiel fixateur d'azote élevé et par une bonne tolérance aux contraintes de l'environnement. Les recherches correspondantes impliquent donc le recours à des disciplines aussi diverses que la biologie moléculaire, la physiologie et l'écologie. Il est, dans ces conditions, indispensable que les spécialistes de ces différentes disciplines conjuguent leurs efforts pour préparer le transfert de leurs découvertes aux utilisateurs. D'autre part, il ne faut pas oublier le fait qu'une symbiose est, par définition, l'association de deux partenaires et que, par conséquent, les recherches correspondantes doivent porter non seulement sur le microsymbiote, comme c'est le cas général, mais aussi sur la plante hôte. Cette double approche est aussi celle préconisée par le groupe de l'Université Laval (Lalonde et Simon, 1985; Tremblay et al., 1986).

(ii) Il est désormais évident que le processus de fixation biologique de l'azote peut contribuer puissamment à accroître la production végétale. Mais c'est surtout dans les régions tropicales, et plus particulièrement dans le cas des plantes pérennes, que l'exploitation de la fixation biologique de l'azote est appelée à se développer. En effet, sous les tropiques, l'utilisation des engrais azotés se heurte non seulement à leur prix excessif, mais aussi au fait que le rendement de ces engrais est souvent beaucoup plus faible que dans les régions tempérées, en raison de l'intensité des processus de lessivage et de dénitrification. Toutefois il

faut être bien conscient du fait que, dans le cas d'une agriculture intensive, l'azote fixé par voie biologique ne pourra, en général, pas remplacer totalement les engrais azotés, qui, malgré des inconvénients déjà signalés et aussi leur effet polluant sur les nappes phréatiques, continueront d'être indispensables à nombre de productions végétales annuelles ou à certaines cultures perennes particulières. Dans ces deux derniers cas, l'idéal consisterait à développer une agriculture fondée sur l'utilisation intégrée de l'azote industriel et de l'azote d'origine biologique. En revanche, pour les plantations forestières ou agroforestières, la seule solution rationnelle consiste à exploiter à fond la fixation biologique de l'azote.

REFERENCES

- Ackermans ADL, Houvers A 1983 *In* Biological nitrogen fixation in forest ecosystems: foundations and applications. Eds. JC Gordon, CT Wheeler. Nijhoff/Junk, The Hague, 7-53.
- Allen ON, Allen EK 1981 *The Leguminosae. A source book of characteristics, uses, and nodulation.* The University of Wisconsin Press, Madison, 812 p.
- Andeke-Lengui MA, Dommergues YR 1983 *In* Casuarina ecology, management and utilisation. Eds. SJ Midgley, JW Turnbull, RD Johnston. CSIRO, Melbourne, 158-166.
- Becking JH 1982 *In* Microbiology of tropical soils and plant productivity. Eds. YR Dommergues, HG Diem. Nijhoff/Junk, The Hague, 109-146.
- Berlinger JE, Brewin NJ, Johnston AVB 1980 *Heredity* 45, 161-186.
- Bourgin JP 1983 *In* Genetic engineering in eucaryotes. Eds. PF Lurquin, A Kleinhofs. Plenum Press, New York, 195-214.
- Brewbaker JL 1983 *In* Leucaena research in the Asian-Pacific region. IDRC, Ottawa, 17-32.
- Caldwell BE, Vest HG 1977 *In* A treatise on dinitrogen fixation. Eds. RWF Hardy, VS Silver. Wiley and sons, New York, 557-576.
- Callahan D, Del Tredici P, Torrey JG 1978 *Science*, 199, 4331, 899-902.
- Cornet F, Otto C, Rinaudo G, Diem HG, Dommergues Y 1985 *Oecol. Plant.* 6, 211-218.
- Diatloff A 1973 *Qld Agric. J.* 642-644.
- Diem HG, Gauthier D, Dommergues Y 1983 *Can. J. Bot.* 2815-2821.
- Ditta GS 1985 *In* Nitrogen fixation research progress. Eds. HJ Evans, PJ Bottomley, WE Newton. Nijhoff/Junk, The Hague, 155-156.
- Domingo I 1983 *In* Biological nitrogen fixation in forest ecosystems: foundations and applications. Eds. JC Gordon, CT Wheeler. Nijhoff/Junk, The Hague, 295-315.
- Dommergues YR, Diem HG, Divies C 1979 *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 779-781.
- Dreyfus B, Dommergues YR 1980 *C. R. Acad. Sci. Paris D* 291, 767-770.
- Duhoux E, Daviès D 1985 *J. Plant Physiol.* 121, 175-180.
- Duhoux E, Sougoufara B, Dommergues Y 1986 *Plant Cell Reports* (in press).
- Felker P 1984 *Pesq. Agropec. Bras. Brasilia* 19 s/n 47-59.

- Felker P, Clark PR, Llag AE, Pratt PF 1981 Plant Soil 61,311-317.
- Ganry F, Diem HG, Dommergues YR 1982 Plant Soil 68, 321-329.
- Ganry F, Diem HG, Wey J, Dommergues YR 1985 Biol. Fert. Soils 1, 15-23.
- Gauthier D, Diem HG, Dommergues YR, Ganry F 1985 Soil Biol. Biochem. 17, 375-380.
- Gresshoff PM, Day DA, Delves AC, Mathews AP, Olsson JE, Price GD 1985 In Nitrogen fixation research progress. Eds. HJ Evans, PJ Bottomley, WE Newton. Nijhoff/Junk, The Hague, 19-25.
- Guevarra AB, Whitney AS, Thompson JR 1978 Agronomy J. 70, 1033-1037.
- Halliday J 1984 Pesq. Agropec. Bras. Brasilia 19 s/n 91-117.
- Halliday J 1985 In Nitrogen fixation research progress. Eds HJ Evans, PJ Bottomley, WE Newton. Nijhoff/Junk, The Hague, 675-681.
- Halliday J, Somasegaran P 1982 In Leucaena research in the Asian-Pacific region. IDRC, Ottawa 27-32.
- Högberg P, Kvarnström M 1982 Plant Soil 66, 21-28.
- Hollaender A 1977 Genetic engineering for nitrogen fixation. Plenum Press, New York, 538 p.
- Huxley PA 1983 Plant research and agroforestry. ICRAF, Nairobi, 615 p.
- Hutton EM 1984 Pesq. agropec. brasil, Brasilia, 19 s/N 263-274.
- Kirby EG 1985 In Tissue culture in forestry. Eds. JM Bonga, DJ Durzan. Nijhoff/Junk, Dordrecht, 369-386.
- Kyle NE, Righetti TL 1985 In Nitrogen fixation research progress. Eds. HJ Evans, PJ Bottomley, WE Newton. Nijhoff/Junk, The Hague, 364.
- Lalonde M, Simon L 1985 In Nitrogen fixation research progress. Eds. HJ Evans, PJ Bottomley, WE Newton. Nijhoff/Junk, The Hague, 667.
- Nabors MW, Gibbs SE, Bernstein CS, Meis ME 1980 Z. Pflanzenphysiol. 97, S, 13-17.
- National Research Council 1977 *Leucaena*: promising forage and tree crop for the tropics. National Academy of Sciences, Washington DC, 115 p.
- National Research Council 1979 Tropical legumes. National Academy of Sciences, Washington DC, 331 p.
- National Research Council 1982 Priorities in biotechnology research for international development. National Academy of Sciences, Washington DC, 261 p.
- Orchard ER, Darby GD 1956 C. R. 6ème Congr. Intern. Sci. Sol D,305-310.

- Périnet P, Brouillette JG, Fortin JA, Lalonde M 1985 *Plant Soil* 87, 175-183.
- Pickersgill B 1983 *In Plant research and agroforestry*. Ed. PA Huxley. ICRAF, Nairobi, 309-321.
- Rinaudo G, Dreyfus B, Dommergues Y 1983 *Soil Biol Biochem.* 15, 111-113.
- Skolmen RG 1986 *In Biotechnology in agriculture and forestry 1*. Ed. YPS Bajaj. Springer-Verlag, Berlin, 375-384.
- Sprent J 1983 *In Biological nitrogen fixation in forest ecosystems: foundations and applications*. Eds. JC Gordon, CT Wheeler. Nijhoff/Junk, The Hague, 213-232.
- Thiagalingam K 1983 *In Casuarina ecology, management and utilization*. Eds. SJ Midgley, JW Turnbull, RD Johnston. CSIRO, Melbourne, 175-179.
- Torrey JG, Tjepkema JD 1979 *Bot. Gaz.* 140 (suppl), 1-11.
- Tremblay FM, Périnet P, Lalonde M 1986 *In Biotechnology in agriculture and forestry 1*. Ed. YPS Bajaj. Springer-Verlag, Berlin, 87-100.
- Trinick MJ 1976 *In Proc. first Intern. Symp. on nitrogen fixation*. Eds. WE Newton, CJ Nyman. Washington State University Press, 2, 507-517.
- Turnbull JW 1983 *In Casuarina ecology, management and utilization*. Eds. SJ Midgley, JW Turnbull, RD Johnston. CSIRO, Melbourne, 55-57.
- Voronin M 1866 *Mem. Acad. Imp. Sci. St-Petersbourg*, 10, 7, 1-13.

Tableau 1

INFLUENCE DE L'INOCULATION AVEC LA SOUCHE DE FRANKIA ORS021001 SUR LA HAUTEUR,
LE POIDS SEC ET LA FIXATION D'AZOTE DE PLANTS DE CASUARINA EQUISETIFOLIA
AGES DE 11 MOIS (D'APRÈS GAUTHIER ET AL., 1985)

<u>Traitements</u>		<u>Hauteur</u> (cm)	<u>Poids sec</u> (g/arbre)	<u>Azote fixé</u>	
<u>Inoculation</u>	<u>Apport d'azote</u> (g/arbre)			<u>% Ndfa</u>	<u>g N₂/arbre</u>
0	0,5	170 a	295 a	0	0
0	2,5	192 b	409 a	0	0
+	0,5	216 b	525 b	39-53 ⁽¹⁾	3,3-2,3 ⁽¹⁾

Les chiffres dans les mêmes colonnes suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement P = 0,05 (test de Duncan).

(1) Le premier chiffre est calculé à partir de la méthode directe de dilution isotopique, le deuxième à partir de la méthode de la valeur A.

Tableau 2

COMPARAISON DE DEUX CLONES DE CASUARINA EQUISETIFOLIA AGES DE 7 MOIS
(Sougoufara, résultats non publiés)

	<u>non inoculés</u>		<u>inoculés avec Frankia</u>	
	<u>clone α</u>	<u>clone β</u>	<u>clone α</u>	<u>clone β</u>
Poids sec des parties (mg/plante)	0,13	0,09	660	1730
N % des parties aériennes	0,73	1,02	1,71	2,02
N total des parties aériennes (mg/plante)	0,001	0,001	1,26	3,38
Poids sec des nodules (mg/plante)	0	0	54	88
ARA ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$)	0	0	2,88	4,58
ARA spécifique ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{h/g nodule}$)	0	0	54	56