

Les arbres fixateurs d'azote atmosphérique :  
sélection des plantes hôtes et multiplication végétative in vitro.

''''''''''''''''

E. DUHOUX

Laboratoire de Cytophysiologie, Département de Biologie  
végétale, Faculté des Sciences, DAKAR, SENEGAL.

Résumé : Les cultures in vitro permettent d'optimiser la productivité d'espèces ligneuses fixatrices d'azote atmosphérique. Après sélection de plantes hôtes performantes, on réalise leur multiplication par micropropagation. Les vitroplants obtenus sont ensuite transférés aseptiquement sur un substrat artificiel dépourvu d'azote et inoculés avec des souches pures du symbiote ( Rhizobium, Frankia ) Nous présentons ici les premiers résultats de cette biotechnologie concernant les espèces ligneuses fixatrices d'azote et en traçons les perspectives d'avenir.

Summary: Tissue cultures can optimize the productivity of nitrogen fixing trees. After the selection of performant host-plants their multiplication is obtained by micropropagation. Then, the vitroplants are transferred aseptically on an artificial carrier without nitrogen and inoculated with pure cultures of symbionts (Rhizobium, Frankia). We present here, the first results of this biotechnology concerning nitrogen fixing trees and point out perspectives for the future.

## LES ARBRES FIXATEURS D'AZOTE :

### sélection des plantes hôtes et multiplication végétative in vitro.

E. DUHOUX

Département de Biologie végétale

Faculté des Sciences, Dakar, Sénégal.

Beaucoup de légumineuses arborescentes tropicales ou d'espèces actinorhiziennes sont connues pour améliorer le sol et la croissance des espèces végétales environnantes. La raison des performances de ces plantes tient à l'efficacité de la symbiose entre un microorganisme (Rhizobium ou Frankia) et la plante hôte. Pour une association donnée, on sait que la potentialité de fixer l'azote est variable : elle dépend des facteurs de l'environnement et également de chacun des deux partenaires. Parmi ces derniers, on oublie généralement la nature génotypique de la plante. Or, l'existence, prouvée par les travaux sur le Pois (HOBBS et MABON, 1982), d'une variabilité génétique pour les caractères de fixation d'azote permet de penser à l'existence de génotypes très bons fixateurs. Chez d'autres plantes, comme Alnus cripa (TREMBLAY, NESME et LALONDE, 1984), on connaît, des génotypes non nodulants. Pour des considérations différentes, ces deux types de génotypes sont recherchés et, après avoir retenu l'individu sélectionné, se pose le problème de sa multiplication et de sa mise à disposition rapide. Pour des raisons d'hétérozygotie, les obtentions nécessaires ne peuvent être multipliées par voie sexuée (graines). Le forestier utilise alors la multiplication végétative, technique d'obtention de copies identiques des génotypes retenus et

source d'une grande homogénéité.

La multiplication végétative par culture in vitro a été choisie car elle présente plusieurs avantages sur les méthodes conventionnelles de propagation. Tout d'abord, cette technique a rendu possible le clonage, là où il n'existait pas dans la nature. Cette technique est utilisée pour une multiplication en masse puisqu'elle permet l'augmentation à l'infini du nombre de plantes génétiquement identiques reproduites à partir d'un seul plant mère. Ensuite, elle nécessite peu d'espace et peut être programmée indépendamment des saisons. Enfin, le clone est assaini (débarassé de viroses, de bactérioses) si la culture est démarrée à partir de méristèmes.

Nous présentons ici les techniques de multiplication et d'inoculation in vitro des arbres fixateurs d'azote en rapportant ce qui a été déjà réalisé et en traçant les énormes potentialités de la technique des cultures de tissu qu'il reste à développer chez les arbres.

## I - LES TECHNIQUES DE LA MICROPROPAGATION DES ARBRES

Le microbouturage passe nécessairement par plusieurs étapes :

### 1. La phase de rajeunissement

Chez les arbres, l'individu exceptionnel que l'on cherche à reproduire est un individu souvent âgé, ayant exprimé ses potentialités (rectitude du port, résistance aux maladies...). Mais à cet âge, la croissance de ses organes est souvent réduite, le port est devenu plagiotrope... Il faut alors procéder à la phase dite de "rajeunissement".

Parmi les techniques expérimentées (DUHOUX, 1986), il y a l'utilisation des nouveaux rameaux formés qui sortent de terre = drageons, ou les tailles de rajeunissement. C'est ainsi que par la technique du recépage annuel, des arbres âgés ou sénescents comme le Platane de Buffon (FRANCLET, 1980), le Sequoia sempervirens (de la GOUBLAYE 1980), le Tilleul de Murten (SCHMID, 1975) ont vu leur vigueur progressivement améliorée jusqu'à restauration d'une morphologie comparable à celle d'un clone juvénile. Le rajeunissement par les greffes en cascades (FRANCLET, 1979) constitue également un traitement efficace pour préparer le matériel végétal avant l'explantation.

## 2. Choix de l'explant

Chez les arbres âgés, les voies les plus généralement suivies consistent à provoquer le développement des bourgeons terminaux ou axillaires et l'embryogénèse somatique.

Une portion terminale de la tige, un bourgeon ou un méristème ne développe en principe qu'un seul axe. Mais la composition du milieu nutritif peut agir de telle sorte que tous les axillaires potentiellement présents se développent en autant de petites tiges feuillées. Le même développement végétatif peut être provoqué à partir d'inflorescences immatures possédant encore des bourgeons axillaires végétatifs. Dans le cas du bourgeonnement adventif (initiation de bourgeons induits sur un organe qui ne les produit généralement pas) le potentiel de multiplication est souvent plus élevé que celui du bourgeonnement axillaire mais la conformité des plantes n'est pas toujours garantie.

L'efficacité maximale de la multiplication clonale est obtenue dans l'embryogénèse somatique où théoriquement une seule cellule isolée peut reproduire un embryon

d'abord, une plante complète ensuite. Les plantes régénérées à partir de ces embryons provenant d'une seule cellule sont en principe génétiquement uniformes. La culture d'explants foliaires de caféiers, de palmiers à huile conduisent directement à la régénération d'embryons. Ces embryons se développent en plantes qui sont actuellement produites en de millions d'exemplaires par an par le groupe Unilever en Indonésie (RAJNCHAPPEL-MESSAI et GUERCHE, 1985).

Chez les jeunes sujets, le bouturage est plus facile et des techniques très performantes de propagation ont été expérimentées chez Pseudotsuga menziesii (MAPES et al 1981), Eucalyptus camaldulensis (DIALLO et DUHOUX, 1984), Acacia albida (DUHOUX et DAVIES, 1985) à partir de bourgeons cotylédonaire de plantules issues de jeunes semis. Tout en présentant un intérêt certain, en particulier pour la connaissance de la réactivité de la plante aux conditions de culture, cette voie est limitée à la propagation végétative de jeunes plantes provenant de graines issues d'une pollinisation contrôlée.

### 3. La phase de multiplication

Le but recherché est de produire le nombre maximum de plantules utilisables à chaque subculture. La composition du milieu nutritif est alors déterminante : à la solution minérale de base qu'il convient de choisir parmi les solutions déjà expérimentées, et d'adapter à l'essence choisie, il s'avère nécessaire d'ajouter des régulateurs de croissance. La nature et la dose de cytokinine (Kinétine, BAP, Zip) et d'auxine (AIA, ANA, IBA) doivent être convenablement adaptés à l'essence étudiée. Chez les espèces ligneuses, le charbon de bois est parfois ajouté ; il est supposé absorber les substances toxiques relâchées par les explants (MISSON et al, 1983).

#### 4. La phase d'élongation

Assez souvent, il suffit de laisser grandir suffisamment les bourgeons sur leur milieu de multiplication, avant de passer à la phase de l'enracinement. Cependant, si ce n'est pas le cas, on favorise leur allongement en les cultivant sur un milieu dépourvu de régulateurs de croissance ou additionné de gibbérellines.

#### 5. L'enracinement

L'enracinement n'est pas toujours immédiat. Certaines modifications apportées au milieu permettent de parvenir souvent au but recherché : apport d'une auxine, dilution des sels minéraux, addition de sucre...

#### 6. Le sevrage et l'acclimatation

C'est une série d'opérations qui doit habituer le vitroplant à une vie autonome dans des conditions naturelles. on y parvient en utilisant une technologie particulièrement avancée : substrats naturels ou artificiels adaptés, maintien d'un niveau hydrique interne convenable pour les plantes (brouillard, film plastique), combinaisons de la température et de la lumière pour la régénération et le développement des racines.

## II - BIOTECHNOLOGIE DES SYMBIOSES FIXATRICES D'AZOTE :

### RESULTATS

L'exploitation optimale de ces symbioses ne peut se concevoir que si l'on parvient à maîtriser l'association de la plante hôte avec le microorganisme. Cette maîtrise requiert,

entre autres, la biotechnologie correspondant d'abord à la plante, ensuite au microorganisme et enfin, à l'association.

#### A - La micropropagation

La micropropagation des arbres fixateurs d'azote concerne les Légumineuses et les non-Légumineuses (Tableau 1). Les explants proviennent de plantules, de jeunes plantes, rarement d'arbres âgés. La régénération et la multiplication sont assurées à partir de bourgeons cotylédonaire, axillaires ou terminaux, de parties végétatives ou de bourgeons axillaires d'inflorescences immatures (Tableau 1).

Pour la différenciation des tiges et leur multiplication, différentes solutions minérales sont utilisées parmi lesquelles celle de MURASHIGE et SKOOG (1962), celle de NAGATA et TAKEBE (1971), celle de BLAYES (in CONGER, 1981) et le "Woody Plant Medium" (LLOYD and Mc COWN, 1980). Toutes les solutions minérales sont additionnées de cytokinines, d'auxines, de sucres et de vitamines.

Les cultures sont placées dans une salle climatisée à une température de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  et exposées à une lumière artificielle de 3.000 à 5.000 lux, sous une photopériode de 11-14 h/jour.

#### B - Cultures pures des symbioses

Depuis de nombreuses années, des souches de Rhizobium ont été sélectionnées par les microbiologistes et, les techniques de culture, de conservation et d'inoculation des plantes du groupe des Légumineuses sont parfaitement bien établies. Les bactéries peuvent être isolées à partir d'extraits de nodules frais ou conservés et cultivés en conditions aseptiques dans des milieux contenant de l'extrait de levure de bière et de mannitol.

Les techniques de culture des actinomycètes du groupe des Frankia n'ont été mises au point que récemment. Le premier isolement d'une souche de Frankia a été réalisé à partir de nodules de Comptonia peregrina (CALLAHAM, TREDICI et TORREY, 1978). Ont suivi les cultures de Frankia provenant d'Alnus sp. (BERRY et TORREY, 1979) et la première souche de Frankia infective de Casuarina a été obtenue à Dakar par DIEM, GAUTHIER et DOMMERGUES (1982). Les nodules sont récoltés sur les racines, lavés et immergés dans une solution hautement toxique de tétroxyde d'osmium (OSO<sub>4</sub>) pendant quelques minutes. Après rinçage, des petits morceaux de nodules sont utilisés pour la culture sur un milieu de QMOD (LALONDE et CALVERT, 1979) d'abord gélosé et ensuite liquide. Les colonies sont ensuite repiquées périodiquement.

#### C - Inoculation des vitroplants

Après quelques semaines sur le milieu d'enracinement, les vitroplants sont lavés et transférés sur des substrats artificiels (vermiculite, tourbe, sable...) de façon à induire massivement la prolifération de poils absorbants, principale porte d'entrée des Rhizobium. Pendant 2 semaines environ, les plantes sont arrosées avec la solution minérale de Crone (in LALONDE et CALVERT, 1979) dépourvue d'azote combiné.

Les résultats obtenus portent principalement sur les différentes espèces d'Aulnes et l'Eleagnus angustifolia (Tableau 1). Après 3 semaines d'acclimatation dans leur nouveau substrat, le système racinaire des plantes est inoculé avec les souches de Frankia préalablement cultivés. Quelques plantes non inoculées de chaque clone servent de témoins. La nodulation, c'est-à-dire la formation de nodules est



vérifiée 3 à 4 semaines après l'inoculation. La fixation d'azote est confirmée par l'aspect verdoyant du feuillage comparé à sa couleur jaunâtre chez les plantes servant de témoins.

### III - PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

La physiologie de la fixation symbiotique d'azote a été et est encore principalement étudiée du seul point de vue du microorganisme symbiote négligeant ainsi le partenaire végétal. Pourtant, la seule nature génotypique de la plante hôte peut être responsable de très grandes variations dans la quantité d'azote fixée par l'association (HARDARSON et ZAPATA, 1984). Or on peut souhaiter exploiter une telle variabilité qui existe dans les conditions naturelles et sélectionner des individus à croissance rapide ou à grand pouvoir fixateur et les multiplier pour en faire des copies. Par ailleurs, une telle variabilité est à éviter quand on souhaite expérimenter au laboratoire sur du matériel homogène pour tester, par exemple, l'efficacité d'une souche de microorganisme. Nous avons vu que la multiplication végétative in vitro, par sa puissance (son coefficient de multiplication élevé et la rapidité des cycles végétatifs) constitue un outil très efficace. Ces techniques sont maintenant fiables, y compris pour les espèces ligneuses. Elles offrent la possibilité, comme chez les Aulnes (TREMBLAY et LALONDE, 1984), d'une production à grande échelle de clones performants chez les arbres tropicaux fixateurs d'azote.

Par ailleurs, les cultures des cellules végétales de la plante hôte offrent de larges possibilités dans le domaine de l'amélioration des plantes car elles permettent de manipuler de grandes populations cellulaires. En effet, toute cel-

Tableau 1 : Micropropagation et inoculation in vitro  
des espèces ligneuses fixatrices d'azote.

Espèces	Références	Micropropagation inoculation	Age de la plante mère	Origine de l'explant	
I	<u>Prosopis cineraria</u>	Goyal et Arya 1984	M	arbre adulte	b. axillaires
	<u>Prosopis tamarugo</u>	Jordan et Balboa 1985	M		
	<u>Prosopis chilensis</u>				
	<u>Acacia albida</u>	Duhoux et Davies 1985	M	plantules	b. cotylédonaire
	<u>Acacia nilotica</u>	Chandra 1983	M		noeuds
	<u>Leucaena leucocephala</u>	Detta 1985	M		
II	<u>Eleagnus angustifolia</u>	Bertrand et Lalonde 1985	M + N	plantules	b. terminal
	<u>Alnus glutinosa</u>	Périnet et Lalonde 1983	M + N	plantules	b. cotylédonaire
		Simon, Stein, Coté, Lalonde 1985	M + N		
	<u>Alnus crispa</u> , <u>A. japonica</u> , <u>A. glutinosa</u> , <u>A. incana</u>	Tremblay et Lalonde 1984	M + N	2 ans	b. terminal
	<u>Casuarina equisetifolia</u>	Duhoux, Sougoufara, Domergues 1986	M +	arbre adulte	inflorescences femelles

I - Légumineuses arborescentes  
II - Plantes actinorhiziales

lule isolée portant une mutation spontanée (variabilité génétique induite par les cultures in vitro) ou induite (mutagenèse artificielle), donne une colonie de cellules mutées qu'il est théoriquement possible de cultiver sans risque avec des cellules "sauvages" jusqu'à lui faire produire une plante fertile qui pourra transmettre la mutation par voie sexuée. Cette méthode est encore plus efficace si on expérimente sur des cellules haploïdes (BOURGIN, 1983). L'amélioration génétique de la plante hôte peut donc porter, en plus de sa productivité dans la fixation de l'azote, sur des sélections vis à vis de certains stress physiologiques (salinité, sécheresse) ou métabolites (résistance à des toxines fongiques ou bactériennes).

La technique des fusions des protoplastes des végétaux supérieurs devient également l'outil d'une nouvelle méthodologie en génétique fondamentale et en génétique appliquée à l'amélioration des plantes. En effet, on sait actuellement réaliser des hybridations cytoplasmiques qui conduisent à des plantes dont les phénotypes nouveaux sont maintenus au travers des cycles de reproduction sexuée (PELLETIER et CHUPEAU, 1984 et PELLETIER, 1986). Le perfectionnement des méthodes a déjà permis d'obtenir des associations génétiques nouvelles, irréalisables par reproduction sexuée, mais ces techniques ne sont à ce jour, applicables qu'aux plantes herbacées et n'ont pas encore connu un grand développement chez les arbres.

On assiste donc actuellement à une mise au point d'une technologie très avancée dans l'amélioration et la propagation des végétaux supérieurs qui ne peut être que profitable ou développement des recherches sur les symbioses fixatrices d'azote. L'isolement et la culture séparée des deux symbiotes

ont déjà permis l'approfondissement de nos connaissances fondamentales dans ce domaine. Le perfectionnement de ces acquis et la maîtrise du contrôle de ces symbioses, par la culture clonale des deux partenaires devraient permettre, dans un proche avenir, d'ouvrir la voie à des découvertes susceptibles de favoriser l'agrosylviculture et la foresterie tropicales.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BERRY, A. & TORREY, J.G. (1979). - Isolation and characterization *in vivo* and *in vitro* of an actinomycetous endophyte from *Alnus rubra* Bong. In symbiotic nitrogen fixation in management of temperate forests. GORDON, J.C., WHEELER, C.T. & PERRY, D.A. ed. Oregon State University, Corvallis, O.R., 69-83.
- BERTRAND, L.J. & LALONDE, M. (1985). - *In vitro* propagation and nodulation by *Frankia* of actinorhizal Russian olive (*Elaeagnus angustifolia* L.) Plant and Soil 87, 143-152.
- BOURGIN, J.P. (1983). - Protoplasts and the isolation of plant mutants. In Protoplasts POTRYKUS, I., HARMS, C.T., HINNEN, A., HUTTER, R., KING, P.J. & SHILLITO, R.D. ed., Birkhäuser Verlag, Basel., 43-50.
- CALLAHAM, D., DEL TREDICI, P. & TORREY, J.G. (1978). - Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia* Science (WASHINGTON D.C.) 199, 899-902.
- CHANDRA INDU MATHUR, N. (1983). - Induced regeneration in stem explants of *Acacia nilotica* Curr. Sci. 52, 18, 882-883.
- CONGER, B.V. (1981). - Agronomic crops In: Conger, B.V., ed. Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques, CRC Press, Boca-Raton, 165-215.
- KARABI DATTA DATTA, S.K. (1985). - Auxin + KNO<sub>3</sub>. Induced regeneration of Leguminous tree *Leucaena leucocephala* through tissue culture. Current Sci. 54, 5, 248-250.
- DIEM, H.G., GAUTHIER, D. & DOMMERGUES, Y.R. (1982). - Isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina equisetifolia* Can. J. Microbiol. 28, 526-530.
- DIALLO, N. & DUHOUX, E. (1984). - Organogénèse et multiplication *in vitro* chez l'*Eucalyptus camaldulensis*. J. Plant Physiol. 115, 177-182.
- DUHOUX, E. (1986). - Organogénèse et multiplication végétative *in vitro* chez les arbres In Cultures *in vitro* chez les végétaux : méthodes et applications. ZRYD, J.P., ed. Presses Polytechniques Romandes (sous presse).
- DUHOUX, E. & DAVIES, D. (1985). - Caulogénèse à partir de bourgeons cotylédonaire d'*Acacia albida* et influence du saccharose sur la rhizogénèse J. Plant Physiol 121, 175-180.
- DUHOUX, E., SOUGOUFARA, B. & DOMMERGUES, Y. (1986). - Propagation of *Casuarina equisetifolia* through axillary buds of immature female inflorescences in culture *in vitro* Plant Cell Rep. (sous presse).
- FRANCKET, A. (1979). - Rajeunissement des arbres adultes en vue de leur propagation végétative. In "Micropropagation des arbres forestiers" AFOCEL n° 12-8/79, Etudes et Recherches, 3-18.
- FRANCKET, A. (1980). - Rajeunissement et propagation végétative des ligneux. Ann. AFOCEL, 11-40.
- de la GOUBLAYE de NANTOIS, H. (1980). - Rajeunissement chez le Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) en vue de la propagation végétative. Etudes sur la plagiotropie des parties aériennes et racinaires. D.E.A., Université Paris 6.

- GOYAL, Y. & ARYA, H.C. (1984). - Tissue culture of desert trees : *In* Clonal multiplication of *Prosopis cineraria* by bud culture. *J. Plant Physiol* 115, 183-189.
- HARDARSON, G. & ZAPATA, F. (1984). - Effect of plant genotype and nitrogen fertilizer on symbiotic nitrogen fixation by soybean cultivars. *Plant and Soil* 82, 397-405.
- HOBBS, S.L.A. & MABON, J.D. (1982). - *Crop. Sci.*, 22, 773.
- JORDAN, M. & BALBAO, O. (1985). - *In vitro* regeneration of *Prosopis tamarugo* Phil. and *Prosopis chilensis* (Moi) Stuntz from nodal sections. *Gartenbauwissenschaft* 50, 3, 138-141.
- LALONDE, M. & CALVERT, H.E. (1979). - Production of *Frankia* hyphae and spores as an infective inoculant for *Alnus* species. *In* Symbiotic nitrogen fixation in management of temperate forests. GORDON, J.C. WHEELER, C.T. & PERRY, D.A. ed. Oregon state University Corvallis, OR, 95-110.
- LYOYD, G. & Mc COWN, B. (1980). - Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc. Intl Plant Prop. Soc.* 30, 421-427.
- MAPES, M.O., YOUNG, P.M. & ZAERR, J.B. (1981). - Multiplication *in vitro* du Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) par induction précoce d'un bourgeonnement adventif et axillaire in "Colloque international sur la culture *in vitro* des essences forestières, IUFRO, Fontainebleau, AFOCEL ed. 363 p.
- MISSON, J.P., BOXUS, P.H., COUMANS, M., GIOT-WIRGOT, P. & GASPAR, T.H. (1983). - Rôle du charbon de bois dans les milieux de culture de tissus végétaux. *Med. Fac. Landbouwn Rijksuniv Gent* 48/4 : 1151-1157.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962). - A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- NAGATA, T. & TAKEBE, I. (1971). - Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium *Planta* 99, 12-20.
- PELLETIER, G. (1986). - Fusion et hybridation somatique. *In* culture *in vitro* chez les végétaux : méthodes et applications ZRYD, J.P. ed. Presses Polytechniques Romandes (sous presse).
- PELLETIER, G. & CHUPEAU, Y. (1984). - Plant protoplast fusion and somatic plant cell genetics. *Physiol. Vég.* 22, 3, 377-399.
- PERINET, P. & LALONDE, M. (1983). - *In vitro* propagation and nodulation of the actinorhizal host plant *Alnus glutinosa* (L) Gaertn. *Plant Sci. Lett.* 29, 9-17.
- RAJNCHAPEL-MESSAI, J. & GUERCHE, P.H. (1985). - Méthodes *in vitro* et production végétales. *Biofutur* 39, 31-45.
- SCHMID, A. (1975). - Die Fortpflanzung der Murtenlinde. *Bull. Soc. Frib. Sc. Nat.* 64 (1), 41-45.
- TREMBLAY, F.M. & LALONDE, M. (1984). - Requirements for *in vitro* propagation of seven nitrogen fixing *Alnus* species. *Plant cell Tissue Organ culture.* 3, 189-199.
- TREMBLAY, F.M., NESME, X. & LALONDE, M. (1984). - Selection and micropropagation of nodulating and non-nodulating clones of *Alnus crispa*(Ait.).Pursh. *Plant and Soil* 78, 71-180.