

CONFERENCE-DEBAT DE L'ORSTOM

LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE: QUELLES POTENTIALITES POUR LE DEVELOPPEMENT ?

Jeudi 30 Mai 1996 à 17h00
Salle de conférence de l'ORSTOM
209-213, rue La Fayette - Paris X^e

Présentée et animée par :

Pierre ROGER

Directeur de recherche à l'ORSTOM - Marseille

Avec la participation de

Yvon DOMMERGUES

Directeur de recherche émérite au CNRS

Jacques BALANDREAU

Directeur de recherche au CNRS - Lyon

Bernard DREYFUS

Directeur de recherche à l'ORSTOM- Dakar

Bassirou SOUGOUFARA

Chargé de recherche aux Eaux et Forêts du Sénégal - Dakar

LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE: QUELLES POTENTIALITES POUR LE DEVELOPPEMENT ?

CONFERENCE-DEBAT DE L'ORSTOM

Présentée et animée par :

Pierre ROGER, Directeur de recherche à l'ORSTOM - Marseille

Yvon DOMMERGUES, Directeur de recherche émérite au CNRS

Jacques BALANDREAU, Directeur de recherche au CNRS - Lyon

Bernard DREYFUS, Directeur de recherche à l'ORSTOM- Dakar

Bassirou SOUGOUFARA, Chargé de recherche aux Eaux et Forêts du Sénégal – Dakar

Résumé

Introduction

L'azote est l'élément constitutif des végétaux le plus important après le carbone. Il est très fréquemment le facteur clé de la production agricole car la concentration des formes d'azote assimilables dans le sol (ammonium, nitrate, composés organiques simples) est souvent limitante pour la croissance des plantes. L'azote moléculaire (N_2), constituant majeur de l'atmosphère mais chimiquement inerte, ne peut être utilisé que par certains micro-organismes procaryotes appelés fixateurs de N_2 , qui sont soit libres, soit symbiotiques, c'est à dire associés à d'autres organismes.

La fixation biologique de N_2 est une activité microbienne aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont réintroduits annuellement dans le cycle de la vie par la fixation biologique. Pour comparaison, les engrais azotés utilisés en agriculture correspondent à environ 40 millions de tonnes d'azote par an. Dans les écosystèmes cultivés, la fixation de N_2 et les apports d'engrais azoté constituent les apports pouvant compenser les exportations par les récoltes et les pertes dues à des activités microbiennes (volatilisation et dénitrification). En absence de fertilisation, la fixation de N_2 est pratiquement la seule source d'azote permettant de maintenir la fertilité du sol.

Il y a plus de 150 ans que l'on a constaté que le sol contenait plus d'azote que la roche mère et qu'il existait donc une importante source d'azote inexplicée. Le rôle des micro-organismes dans ce phénomène a été reconnu en 1888 par Hellriegel et Wilfarth en constatant que des légumineuses non nodulées étaient incapables d'incorporer l'azote moléculaire. La découverte de la fixation de N_2 par les bactéries libres est due à Beijerinck, en 1901. Depuis, de nombreux genres et espèces bactériennes ont été reconnus comme fixateurs de N_2 . Ces organismes présentent pratiquement tous les types de comportements en ce qui concerne les relations plante-micro-organisme, les relations avec l'oxygène et les modes trophiques. Parmi les nombreux systèmes fixateurs de N_2 connus, les micro-organismes libres et les symbioses qui possèdent des potentialités démontrées pour une utilisation agronomique sont:

- les bactéries hétérotrophes dans le sol et la rhizosphère des plantes,
- les cyanobactéries libres ou en symbiose avec *Azolla*, utilisées principalement en riziculture
- les légumineuses annuelles ou pérennes utilisées comme engrais vert ou pour la régénération des sols sous jachère,
- les arbres fixateurs de N_2 utilisés en foresterie ou pour la revégétalisation de sols dégradés.

Les bactéries hétérotrophes fixatrices de N_2 sont abondantes dans la rhizosphère (masse racinaire) de certaines graminées, en particulier le riz (première céréale mondiale pour l'alimentation humaine) ou elles peuvent représenter jusqu'à 80% de la microflore totale. Les premiers essais d'utilisation de ces bactéries ont consisté en des expériences d'inoculation avec des souches (*Azotobacter* et plus récemment *Azospirillum*) sélectionnées au laboratoire en fonction de leur activité fixatrice de N_2 en culture pure. Ces expériences n'ont pas produit de résultats convaincants.

Les études récentes ont montré que, plus que l'abondance, c'est la diversité des fixateurs de N_2 associés qui constitue le caractère le plus original de la rhizosphère du riz: du point de vue taxinomique, tous les grands groupes de bactéries y ont été reconnus, dans l'un ou l'autre des sols

étudiés. L'activité fixatrice de N_2 dans la rhizosphère du riz, peut donc être associée à des métabolismes très divers, suivant le taxon considéré. Cela se traduit par des rendements également très divers des systèmes fixateurs de N_2 , surtout si l'on étudie l'efficacité non pas sur souche pure en milieu synthétique mais sur l'association plante-souche fixatrice de N_2 .

Une étude récente a sélectionné des souches qui ont été ensuite utilisées pour des essais au champ dans diverses localités du delta du Nil et au Viêt-nam. Les résultats ont montré que l'inoculation n'avait d'effet que si l'azote était effectivement le facteur limitant la récolte, et ceci quel que soit le niveau de fertilité azotée. Dans ce cas, on a observé des gains de récolte allant jusqu'à +15% en Egypte et 20% au Viêt-nam.

Ces résultats montrent qu'il est possible d'utiliser la diversité existante du peuplement bactérien fixateur de N_2 dans la rhizosphère des céréales. En sélectionnant la plus efficace des bactéries présentes, on peut, par inoculation des semences, augmenter le rendement de la culture lorsque l'azote est le facteur limitant de la culture. Inoculer consiste alors à remplacer une diversité spontanée incontrôlée, par une souche possédant une fixation de N_2 efficace. Il semble alors possible de remplacer une partie des engrais azotés par l'inoculation bactérienne sans diminution de rendement.

Les cyanobactéries libres des rizières sont des micro-organismes photosynthétiques qui, morphologiquement, se rapprochent des micro-algues. Elles peuvent fixer de 10 à 30 kg de N_2 par hectare et par cycle cultural. Les recherches récentes ont montré que ces organismes sont présents naturellement dans tous les sols de rizière et que leur développement y est limité (1) par le manque de phosphore dans les sols, (2) la présence d'organismes prédateurs tels que des micro-crustacés ou des larves d'insectes, et surtout (3) par l'épandage d'engrais azoté dans l'eau de la rizière qui entraîne tout une série de modifications de l'écosystème causant l'inhibition des cyanobactéries. Dans l'état actuel des connaissances, il apparaît que le potentiel agronomique des cyanobactéries est nettement mieux utilisé par des techniques de gestion intégrée destinées à favoriser les cyanobactéries fixatrices de N_2 autochtones que par de l'inoculation de souches sélectionnées au laboratoire. En particulier, les études *in situ* démontrent qu'il est possible de tirer parti de la flore indigène en enfouissant l'engrais azoté et que cette pratique, recommandable dans la majorité des sols de rizière, présente un triple avantage :

- elle permet l'expression de la fixation de N_2 par les cyanobactéries indigènes et d'obtenir à peu de frais un apport supplémentaire de 5-30 kg d'azote
- elle diminue considérablement les pertes d'azote due à la volatilisation de l'ammoniac
- elle évite la prolifération de larves de moustique dans l'eau de la rizière.

Azolla est une symbiose entre une fougère aquatique et une cyanobactérie fixatrice de N_2 . Elle a été utilisée comme engrais vert pendant des siècles dans les rizières des zones rizicoles tempérées de Chine et du Viêt-nam. Elle présente les avantages de croître en sol submergé en même temps que le riz, d'être plus facile à incorporer que les légumineuses et d'avoir un potentiel azoté, en milieu paysan, de 30 à 60 kg d'azote par hectare et par cycle cultural. Depuis la redécouverte d'*Azolla* par les agronomes des pays rizicoles autres que la Chine et le Viêt-nam, aux alentours de 1980, des recherches ont été entreprises pour étendre cette technologie à d'autres pays rizicoles. Des progrès importants ont été faits dans l'identification de méthodes permettant de contourner les facteurs limitants technologiques et dans l'amélioration des souches. Dans le même temps l'utilisation d'*Azolla* a pratiquement disparu des pays où elle était traditionnelle et ne s'est pas développée dans les pays qui ont testé les technologies disponibles ou tenté d'en développer d'autres. Les raisons sont principalement socio-économiques. Les rizières présentant des conditions environnementales qui permettent le développement d'*Azolla* sans pratiques culturales additionnelles après l'inoculation représentent une infime fraction des surfaces cultivées. Dans les autres rizières, l'utilisation d'*Azolla* est limitée par le coût de production. De plus, en conditions de semis direct, *Azolla* devient une adventice préjudiciable par ses effets mécaniques sur les plantules de riz. L'évolution de la riziculture du repiquage vers le semis direct est un facteur négatif pour son adoption. A moins de changements économiques importants (taxation des engrais azotés et éventuellement subvention de la fertilisation organique), il est peu probable que l'utilisation d'*Azolla* se développe dans un pourcentage significatif des rizières. Par contre l'identification d'*Azolla* comme un biofertilisant à usages multiples (aliment du bétail, producteur primaire dans des systèmes culturaux complexes riz-*Azolla*-poisson) est susceptible de relancer l'intérêt de son utilisation agronomique.

Les légumineuses tropicales spontanées, longtemps considérées comme des mauvaises herbes, jouent un rôle très important dans le maintien et l'amélioration de la fertilité des sols, comme fourrage pour les animaux et dans la protection de l'environnement. En Afrique sub-saharienne, l'agriculture traditionnelle a longtemps fait alterner la mise en culture des sols avec une jachère de longue durée. Aujourd'hui, la pression démographique et le besoin en terres de culture ont considérablement

raccourci les temps de jachère, et celle-ci, lorsqu'elle n'a pas totalement disparu, ne peut plus reconstituer la fertilité des sols. Une des solutions durables pour inverser cette tendance est d'améliorer l'efficacité des jachères courtes en les enrichissant en légumineuses fixatrices d'azote.

Des prospections au Sénégal ont permis de récolter 18 genres (58 espèces) de légumineuses de jachère à partir desquelles environ 400 souches de rhizobiums ont été isolés. Un quart de ces souches étaient de nouvelles espèces à croissance rapide qui présentaient une grande spécificité d'hôte. Cette découverte est importante car on pensait jusqu'à présent que la nodulation des légumineuses annuelles tropicales n'étant pas spécifique, il était inutile de les inoculer, des rhizobiums à large spectre d'hôte étant naturellement présents dans les sols. Des études *in situ* ont confirmé que pour certaines espèces l'inoculation permettait d'améliorer les rendements des légumineuses de jachère et que ces dernières augmentaient déjà significativement la teneur de l'azote du sol après un an de culture.

Les légumineuses "aquatiques" (Sesbania, Aeschynomene, Neptunia et Discolobium) qui se développent dans les terres inondées tropicales possèdent généralement des nodules fixateurs de N₂ sur les racines et les tiges, qui leur confèrent une capacité de fixation de N₂ supérieure à celle des légumineuses à nodules racinaires ou d'Azolla utilisées traditionnellement comme engrais vert en riziculture. Leurs bactéries symbiotiques présentent des propriétés et des positions taxinomiques très originales. Ainsi, les Azorhizobium seraient des bactéries aquatiques ayant reçu par conjugaison avec des rhizobiums du sol des gènes de nodulation, et qui seraient devenus spécifiques de la nodulation de tige de la légumineuse aquatique Sesbania rostrata.

La découverte des légumineuses à nodules de tige comme *Sesbania rostrata* ou *Aeschynomene afraspera* qui ont une capacité de fixation d'azote supérieure à celle des légumineuses utilisées traditionnellement a donc suscité de grands espoirs en Asie. Leur potentiel pour augmenter très significativement les rendements en riz a été largement démontré. Toutefois, pour des raisons socio-économiques l'utilisation des engrais verts a diminué de façon constante en Asie et le potentiel de ces nouveaux engrais vert ne suffit pas à raviver l'intérêt des agriculteurs pour cette technique.

En Afrique de l'Ouest, où la consommation d'engrais chimiques est très faible, et où il n'existe aucune tradition d'utilisation des engrais verts en riziculture, l'ORSTOM conduit en collaboration avec une ONG (ENDA tiers monde) et l'Université de Dakar, des opérations de développement sur l'utilisation de *Sesbania rostrata* comme engrais vert. Cette dernière permet un apport d'environ 100 kg d'azote par hectare et un effet nématicide qui se traduisent par des rendements qui passent de 1,5 t à 4 t par hectare en riziculture traditionnelle inondée. ENDA tiers monde a lancé un programme de diffusion de la technique des engrais verts à travers un réseau de groupements villageois de Casamance et de Guinée Bissau. Les prochaines années devraient permettre de savoir si *Sesbania rostrata* peut être adopté dans le développement de la riziculture en Afrique de l'Ouest.

Des rhizobiums tropicaux directement associés au riz ? Parvenir à conférer aux céréales, et en particulier au riz, la capacité de fixer l'azote représenterait un enjeu considérable pour les pays tropicaux. Plusieurs laboratoires ont commencé à étudier les possibilités d'association entre les céréales et les rhizobiums. Récemment, au Sénégal, nous avons isolé pour la première fois à partir de racines désinfectées de deux riz sauvage plusieurs souches de rhizobiums capables de noduler *Sesbania rostrata*, *Aeschynomene sensitiva* ou *A. indica*. Ces légumineuses cohabitent avec les riz sauvages dans les mares temporaires sahélienne. Notre objectif actuel est d'étudier les associations naturelles entre les espèces de riz sauvage et les rhizobiums qui nodulent *Sesbania* et *Aeschynomene*, afin de rendre ces associations plus efficaces pour une augmentation de la production rizicole.

Les arbres fixateurs d'azote et l'aménagement des écosystèmes tropicaux: un bilan

Dans les régions tropicales la végétation ligneuse joue un rôle beaucoup plus important que dans les autres parties du monde car elle constitue: (1) la source majeure de matériaux de construction et de fabrication d'objets à usage domestique, (2) la principale source d'énergie calorifique dans les campagnes et les villes, (3) une source de fourrage, et (4) un élément de protection et de régénération des sols, permettant ainsi la stabilisation ou le redressement de la production agricole. Pour reconstituer la végétation arborée, notamment dans les écosystèmes dégradés, il est recommandé de faire appel aux arbres fixateurs de N₂ en raison de leur indépendance vis-à-vis de cet élément.

Au cours des dix dernières années des progrès substantiels ont été accomplis dans la connaissance des arbres fixateurs de N₂ aussi bien sur le plan fondamental (nodulation caulinaire, infection chez les arbres, transformation d'espèces actinorhiziennes fixatrices de N₂, phylogénie des plantes actinorhiziennes, diversité et phylogénie des microflores rhizobiennes et actinorhiziennes, physiologie des *Frankia*, évaluation de la fixation de N₂ *in situ*) que sur le plan technologique (microbouturage et micro-propagation d'individus ayant de grandes potentialités fixatrices de N₂; sélection de

rhizobiums *Acacia*-compatibles; préparation d'inoculum de rhizobium et *Frankia* fiables et pratiques; identification de meilleures combinaisons "clone de l'arbre x souche fixatrice de N₂".

Le transfert des technologies d'inoculation a été réalisé avec succès, mais sur une échelle modeste, dans le Pacifique et en Afrique (Côte d'Ivoire, Cameroun, Egypte). Mais jusqu'à présent les plantations clonales sont restées à l'état de projet. Des efforts ont été déployés pour intégrer les arbres fixateurs de N₂ dans différents systèmes d'aménagement. En foresterie, des succès ont été obtenus dans le cadre des plantations forestières monospécifiques mais pas dans celui des plantations d'arbres fixateurs et non fixateurs. En agro-foresterie, la culture en couloirs (cultures annuelles entre des haies d'arbres) n'est applicable que dans des cas particuliers, alors que la jachère forestière semble pouvoir être généralisée à différentes conditions climatiques. La plantation d'arbres fourragers est prometteuse en zone semi-aride et sur les plateaux d'altitude. Les arbres fixateurs de N₂ sont une composante majeure, parfois exclusive, des forêts de protection, (brise-vent, arbres d'ombrage, fixation des dunes) et sont particulièrement efficaces pour réhabiliter les terres dévastées par l'homme (sites miniers, sols salinisés, terres surexploitées, sols pollués) à condition de réduire au minimum les contraintes environnementales limitant l'établissement et le fonctionnement du processus symbiotique.

Pour qu'ils soient plus intégrés dans les systèmes culturaux, les arbres fixateurs de N₂ devraient être plus tolérants aux contraintes de l'environnement et pouvoir procurer, en plus du combustible et du fourrage, des graines ou fruits comestibles présentant un attrait supplémentaire pour le paysan, caractéristiques que l'on pourrait développer par les méthodes de biologie moléculaire.

Les arbres fixateurs d'azote et l'aménagement des écosystèmes tropicaux: deux cas pratiques au Sénégal

Utilisation de *Acacia mangium* et *A. auriculiformis* dans les jachères de Casamance. Par son climat soudano-guinéen (pluviométrie 1000-1600 mm par an) la Casamance est une zone à fort potentiel agricole. Des rendements modestes y ont été longtemps maintenus par la pratique de la jachère. Récemment le raccourcissement des temps de jachère y a entraîné un fléchissement rapide de la productivité. La Direction des Eaux, Forêts, Chasses et de la Conservation des Sols et le laboratoire de Microbiologie des Sols du Centre ORSTOM de Dakar se sont associés pour mettre au point et tester un itinéraire technique fondé sur le remplacement de la jachère herbacée par une jachère forestière à base d'*A. mangium* et *A. auriculiformis* en vue de maintenir et/ou de reconstituer la fertilité des sols en Casamance. Des essais ont été mis en place pour tester l'effet de l'inoculation par des micro-organismes sélectionnés sur la fixation de N₂ de ces arbres et la capacité de ces espèces à relever ou à maintenir le niveau de fertilité du sol. Les résultats obtenus 30 mois après la mise en place des arbres montrent une croissance exceptionnelle des arbres. L'inoculation par *Bradyrhizobium* sp. A permis une amélioration significative, variable d'un site à l'autre, de la hauteur des arbres, de la teneur en azote des feuilles et de la survie. L'inoculation d'*Acacia auriculiformis* par *Pisolithus* sp. a permis une amélioration de la teneur en azote des feuilles, mais pas de la taille.

Utilisation de *Causuarina equisetifolia* pour la fixation des dunes maritimes. L'objectif était le freinage de la migration des dunes et la stabilisation de leur partie interne par la création de boisements littoraux avec *C. equisetifolia*. L'opération, qui a débuté en 1950, a permis de distinguer trois cas :

(i) Stabilisation réussie à l'origine et maintenue (*C. equisetifolia* a atteint un développement optimal avec une densité de 2500 pieds/ha).

(ii) Stabilisation réussie à l'origine mais vouée à l'échec sous l'effet des pressions anthropiques.

(iii) Stabilisation défectueuse dès l'origine. Les arbres n'ont pas réussi à s'installer pour différentes raisons: déchaussement ou envahissement par le sable; croissance irrégulière.

En 1994, un essai au champ avec comme objectifs (1) de déterminer la réponse de *C. equisetifolia* à l'inoculation avec une souche de *Frankia* incluse dans l'alginat et (2) d'estimer le pourcentage d'azote fixé par la méthode de différence et le traçage isotopique naturel.

Conclusions

La fixation biologique de l'azote spontanée a permis une production modeste, mais constante à long terme, dans les systèmes agricoles traditionnels à faible productivité. Son utilisation volontaire pour la fertilisation azotée des systèmes agricoles à forte productivité se heurte à de nombreux problèmes technologiques et socio-économiques. Par contre, certaines symbioses fixatrices d'azote offrent déjà des possibilités d'application, qui peuvent être encore améliorées, pour la régénération de la fertilité des sols par les systèmes de jachère, la revégétalisation de sols dégradés et la foresterie.

1. INTRODUCTION

L'azote est l'élément constitutif de la plante le plus important après le carbone. Il constitue très fréquemment le facteur limitant principal pour la production végétale agricole.

La réserve principale d'azote terrestre est la lithosphère (98% de l'azote total) et non l'atmosphère. Cependant la concentration des formes assimilables dans le sol (ammonium, nitrate, composés organiques simples) est souvent limitante pour la croissance de la majorité des êtres vivants. L'azote moléculaire, constituant majeur de l'atmosphère mais chimiquement inerte, ne peut être utilisé que par certains micro-organismes procaryotes appelés fixateurs d'azote, qui peuvent être libres ou symbiotiques.

Il y a plus de 150 ans que l'on a constaté que le sol contenait plus d'azote que la roche mère et qu'il existait donc une importante source d'azote inexplicquée. Le rôle des micro-organismes dans ce phénomène a été reconnu en 1888 par Hellriegel et Wilfart en constatant que des légumineuses non nodulées étaient incapables d'incorporer l'azote moléculaire.

La découverte de la fixation de l'azote par les bactéries libres est due à Beijerinck, en 1901. Depuis, de nombreux genres bactériens ont été reconnus comme fixateurs. Ces genres représentent pratiquement tous les types de comportements en ce qui concerne les relations plante-microorganisme, les relations avec l'oxygène et les modes trophiques (Tableau 1.1).

Tableau 1.1. Exemples des différents types de micro-organismes fixateurs d'azote

Micro-organismes libres

• Aérobie	
• Hétérotrophes	<i>Azotobacter spp.</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Beijerinckia indica</i> ; <i>Azospirillum lipoferum</i>
• Phototrophes: Cyanobactéries	
• Hétérocystées	<i>Nostoc</i> ; <i>Anabaena</i> ; <i>Calothrix</i> ; <i>Tolypothrix</i>
• Homocystées	<i>Trichodesmium</i> ; <i>Oscillatoria</i>
• Unicellulaires	<i>Gloeotheca</i> ; <i>Gloeocapsa</i>
• Anaérobies	
• Hétérotrophes	<i>Clostridium pasteurianum</i> ; <i>Desulfovibrio vulgaris</i> ; <i>Desulfotomaculum spp.</i> ; <i>Methanobacterium spp.</i>
• Phototrophes	<i>Rhodospirillum rubrum</i> ; <i>Rhodobacter capsulata</i> ; <i>Chromatium vinosum</i>

Microorganismes symbiotiques

• Légumineuses	
• à nodules racinaires	<i>Rhizobium meliloti</i> ; <i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>Bradyrhizobium japonicum</i> ; <i>Sinorhizobium fredii</i>
• à nodules caulinaires	<i>Azorhizobium caulinodans</i>
• Symbioses actinorhiziennes	<i>Frankia</i>
• Symbioses à cyanobactéries	
• <i>Azolla</i>	<i>Anabaena azollae</i>
• Cycas	<i>Anabaena cycadeae</i>
• Lichens	<i>Nostoc</i>
• Mousses et hépatiques	<i>Nostoc</i>

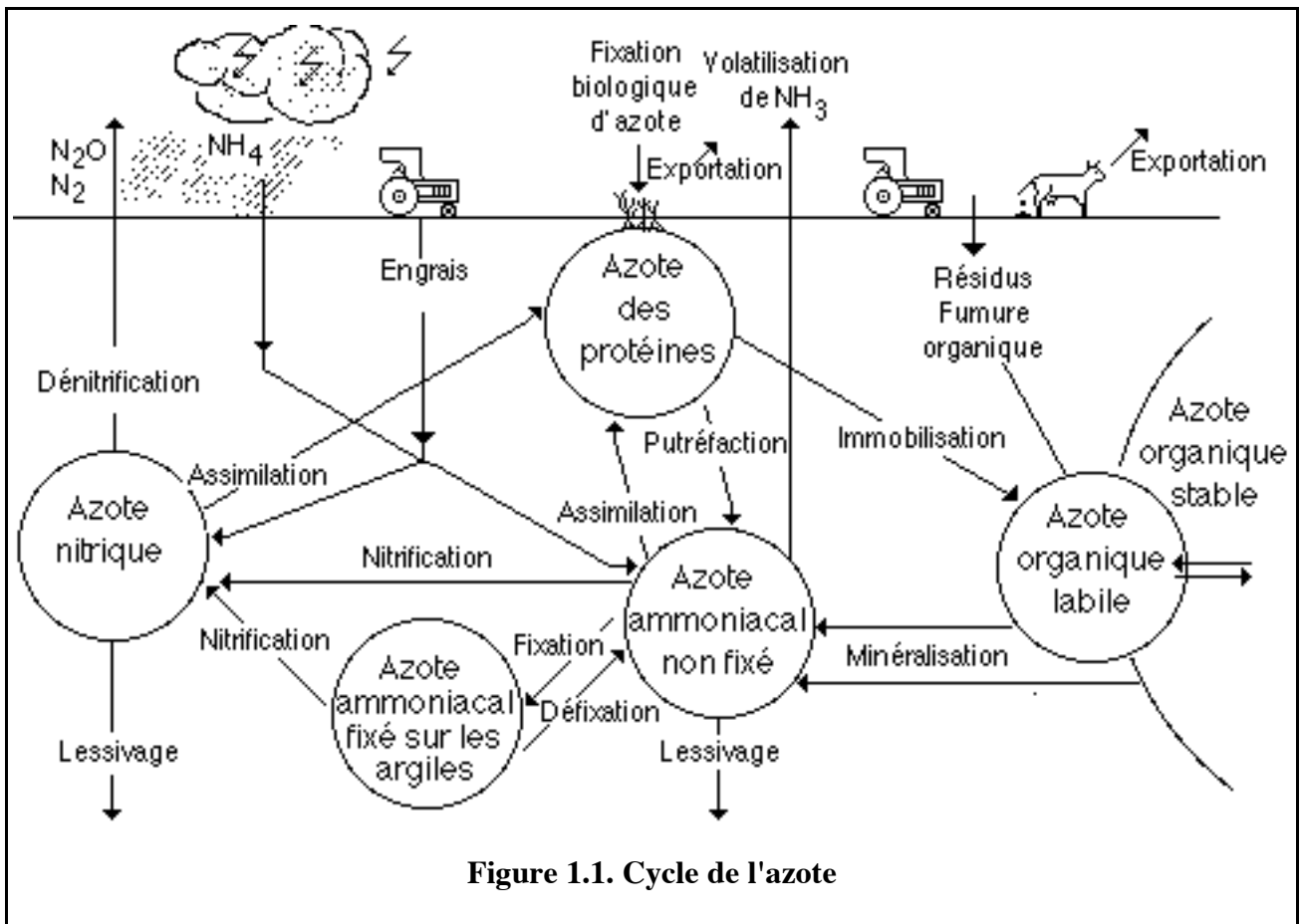


Figure 1.1. Cycle de l'azote

Dans le cycle de l'azote (Figure 1.1), les transformations microbiennes des composés azotés les plus importantes pour la production végétale concernent :

- l'équilibre entre formes assimilables et formes non assimilables par la plante (minéralisation de l'azote organique, immobilisation de l'azote minéral);
- les apports d'azote par fixation biologique d'azote moléculaire; et
- les exportations ou pertes par nitrification-dénitrification et volatilisation de l'ammoniaque.

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est une activité microbienne aussi importante pour le maintien de la vie sur le globe terrestre que la photosynthèse par les organismes photosynthétiques. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont réintroduits annuellement dans le cycle de la vie par la fixation biologique. Pour comparaison, les engrais azotés utilisés en agriculture correspondent à environ 40 millions de tonnes d'azote par an

Dans les écosystèmes cultivés, la fixation de l'azote et les apports d'engrais azoté constituent les apports pouvant compenser les exportations par les récoltes et les pertes par volatilisation et dénitrification. En absence de fertilisation, la fixation d'azote est pratiquement la seule source d'azote permettant de maintenir la fertilité du sol. La fixation biologique de l'azote spontanée a permis une production modeste, mais constante à long terme, dans les systèmes agricoles traditionnels à faible productivité. Son utilisation volontaire pour la fertilisation azotée des systèmes agricoles à forte productivité se heurte à de nombreux problèmes technologiques et socio-économiques. Par contre, les symbioses fixatrices d'azote offrent des potentialités certaines, qui peuvent être encore améliorées, pour la régénération de la fertilité des sols par les systèmes de jachère, la revégétalisation de sols dégradés et la foresterie.

La conférence se propose de faire un bilan sur les aspects pratiques de l'utilisation en agriculture et en foresterie tropicale des groupes d'organismes fixateurs d'azote suivants :

- les bactéries hétérotrophes dans la rhizosphère des plantes, en prenant le riz comme exemple.
- les cyanobactéries libres ou en symbiose avec *Azolla*, utilisées principalement en riziculture
- les légumineuses annuelles ou pérennes utilisées comme engrais vert ou pour la régénération des sols sous jachère,
- les arbres fixateurs d'azote utilisés en foresterie ou pour la revégétalisation de sols dégradés.

2. FIXATEURS D'AZOTE LIBRES ET INOCULATION BACTERIENNE EN RIZICULTURE

Jacques BALANDREAU
UMR5557
Laboratoire d'Ecologie Microbienne des Sols
Université Claude Bernard-Lyon I
43 Boulevard du 11 Novembre 1918
69622 Villeurbanne cedex

Des études de bilan d'azote (Watanabe et Lee 1977, App et al 1980, Wetselaar 1981) ont démontré depuis longtemps l'importance du rôle des micro-organismes fixateurs d'azote en riziculture irriguée traditionnelle. La fixation d'azote peut y être élevée (Roger et Ladha 1992) et représenter une proportion non négligeable des besoins en azote de la plante. Plusieurs types de micro-organismes sont impliqués et, parmi eux, les bactéries fixatrices d'azote hétérotrophes de la rhizosphère du riz : sur et dans les racines du riz, en effet, les diazotrophes sont extrêmement abondants (Roussos et al 1980 ; Thomas-Bauzon et al 1982, Ladha et al 1987, Omar 1987, Rahman 1987) et peuvent représenter jusqu'à 80% de la microflore totale (Watanabe et Barraquio 1979, Barraquio et Watanabe 1981).

2.1. LA DIVERSITE EXISTANTE

Plus que leur abondance, c'est la diversité des fixateurs d'azote associés à la rhizosphère du riz qui constitue le caractère le plus original de cette niche écologique très particulière ; du point de vue taxinomique, tous les grands groupes de bactéries y ont été reconnus, dans l'un ou l'autre des sols étudiés (Tableau 2.1):

**Tableau 2.1. Bactéries fixatrices libres de la rhizosphère du riz
(d'après Heulin & Berge 1992)**

Espèces	Groupe phylogénétique (Woese, 1987)	Références
Protéobactéries		
Subdivision		
<i>Azospirillum brasilense</i>	α	Tarrand et al 1978, Omar et al 1989
<i>A. irakense</i>	α	Khammas et al 1989
<i>A. lipoferum</i>	α	Bally et al 1983; Ladha et al 1987, Omar et al 1989
<i>Azospirillum sp.</i>	α	Lakshmi-Kumari et al 1976, Nayak & Rao 1977, Watanabe et al 1979
<i>[Pseudomonas] diazotrophicus</i>	α	Watanabe et al 1987
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	α	Bally et al 1983
<i>Alcaligenes faecalis</i>	β	Qiu et al 1980, Jia et al 1989, You et al 1991
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	β	Gillis et al 1995
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	β	Baldani et al 1986
<i>Citrobacter freundii</i>	γ	Omar et al 1989
<i>Enterobacter cloacae</i>	γ	Qiu et al 1980, Bally et al 1983, Omar et al 1989
<i>Klebsiella oxytoca</i>	γ	Bally et al 1983, Yoo et al 1986
<i>K. planticola</i>	γ	Omar et al 1989
<i>Pantoea agglomerans</i>	γ	Omar et al 1989, Berge et al 1991b
Firmibactéries :		
<i>Paenibacillus polymyxa</i>		Rasolomanana & Balandreau 1987
<i>Bacillus sp.</i>		Rao et al 1978

Tableau 2.2. Efficiences des souches comparées à celle de la souche de référence (*Enterobacter cloacae* NO13)

Nom	Effizienz comparée	Intervalle de confiance (p=0,05)
<i>A. brasilense</i> NO40	3,4	2,1-5,5
<i>A. lipoferum</i> 4B	2,5	1,5-4,1
<i>E. cloacae</i> NO23	0,4	0,2-0,7
<i>A. brasilense</i> NO44	0,10	0,05-0,25
<i>Alcaligenes faecalis</i> A15	0,02	0,01-0,06
17 souches <i>E. cloacae</i>	1	

Parmi les proches parents des *Rhizobium*, il faut citer diverses protéobactéries de la classe α telles que *Sphingomonas* et, surtout, *Azospirillum* ; dans la classe β on trouve des *Alcaligenes*, des *Herbaspirillum* et des *Burkholderia* ; la classe γ est représentée par diverses entérobactéries.

L'activité fixatrice d'azote (activité nitrogénasique), dans la rhizosphère du riz, peut donc être associée à des métabolismes très divers, suivant le taxon considéré.

2.2. LA COMPARAISON DES EFFICIENCES

Cette diversité du fond métabolique porte sur le rendement énergétique de la génération d'ATP et/ou sur la diversité des sources de Carbone utilisables ; cela se traduit par des rendements très divers des systèmes fixateurs d'azote, surtout si l'on étudie l'efficacité non pas sur souche pure en milieu synthétique mais sur l'association plante-souche fixatrice. En condition de laboratoire, on peut utiliser une semence en germination, associée à une souche bactérienne, dans ce que l'on a appelé le "modèle spermosphère" : en présence d'acétylène, la nitrogénase forme de l'éthylène que l'on sait détecter avec une extraordinaire sensibilité. C'est en comparant les intensités de dégagement d'éthylène que l'on peut mettre en évidence des différences significatives dans l'efficacité des différentes espèces et souches bactériennes.

Un financement CEE a permis à Nabil OMAR de réaliser une telle comparaison d'efficacité sur un ensemble de 23 souches de bactéries représentatives de la microflore fixatrice d'azote dominante dans la station agronomique de Moshtohor, située dans le Delta du Nil (Omar et al 1989). La mesure de l'efficacité, associée à un traitement statistique des résultats a permis de montrer que la souche NO40 d'*Azospirillum brasilense* avait une efficacité (3,1 micromoles d'éthylène par plante et par jour) significativement supérieure (p=0,05) à celle (en moyenne 1 micromole) de 14 souches d'*Enterobacter cloacae* (Heulin et al 1989) (Tableau 2.2).

2.3. L'UTILISATION DES ESPECES ET SOUCHES LES PLUS EFFICIENTES

La souche NO40 d'*Azospirillum brasilense* a été utilisée pour inoculer le riz au semis et au repiquage par trempage des semences et des jeunes plantes dans une culture dense de bactéries. Ces essais ont été réalisés au champ, dans diverses localités du delta du Nil, dans des dispositifs expérimentaux factoriels randomisés, où le facteur inoculation était croisé avec le facteur fertilisation azotée. Des gains de récolte importants (jusqu'à +15%) et significatifs (p<0,1) ont été obtenus après inoculation dans la plupart des cas (Omar et al 1992) (Fig. 2.1). Une expérience similaire conduite avec une souche d'*Azospirillum* efficace mais non adaptée au riz (isolée de *Digitaria*) a donné un effet dépressif sur la récolte en grain. Par contre un effet bénéfique a été obtenu même à Moshtohor, la localité d'origine de la souche NO40 (Tran et al 1994).

Récolte (T/ha)

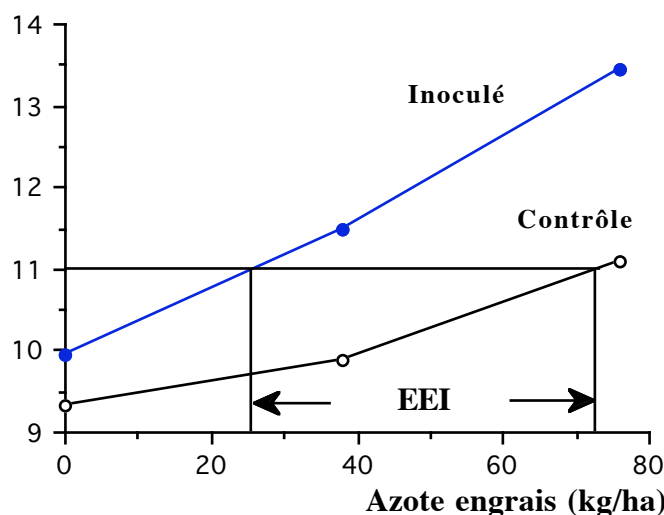


Fig. 2.1 Inoculation du riz Giza172 par *Azospirillum brasilense* NO40. Gemmeiza (Egypte)

Un rendement de 11T/ha peut être assuré en apportant 73 kg d'azote engrais à l'hectare. On obtient le même rendement après inoculation, avec seulement 25 kg d'azote engrais à l'hectare. L'équivalent engrais de l'inoculation (EEI) est donc de 48 kg d'azote engrais à l'hectare.

2.4. ESSAIS *IN SITU* ET FACTEURS LIMITANTS

A Sakha, cependant les expériences de 1985, 1986, 1988 à 1990 ont donné un effet moyen non significatif de l'inoculation (Tableau 2.3). Une analyse plus détaillée des résultats a montré que pour les deux années où les témoins non inoculés ne montraient pas d'effet azote (1988 et 1989), l'inoculation n'avait pas d'effet significatif, tandis que pour les trois expériences restantes, l'azote engrais avait un effet significatif ainsi que l'inoculation. Ce résultat montre que l'inoculation n'a d'effet que si l'azote est effectivement le facteur limitant la récolte, et ceci quel que soit le niveau de fertilité azotée. Quand l'azote engrais n'a pas d'effet sur la récolte, il apparaît inutile d'inoculer.

Des expériences analogue ont été conduites au Viêt-nam par Tran Van Van. Une étude de la diversité des bactéries fixatrices présentes a été réalisée dans un sol sulfaté acide des environs d'Ho Chi Minh Ville, et leurs efficacités comparées en modèle spermosphère. La souche la plus efficace est un *Burkholderia vietnamiensis*. Son inoculation, dans sept expériences, 3 en pots et 4 au champ, s'est toujours traduite par des gains de récolte de l'ordre de 20% (Tran et al 1994).

Tableau 2.3. Inoculation du riz, variété Giza 172, par *Azospirillum brasilense* souche NO40, à Sakha (Egypte)

Expériences prises en compte :	Récolte (t ha ⁻¹)	Effet des facteurs : valeurs de H (test de Kruskal-Wallis)	
		Engrais	Inoculation
Toutes (5)	7,3	6,5 (p<5%)	1,0 (non significatif)
1985, 1987, 1990	7,6	16,5 (p<0,5%)	3,6 (p=5,6%)

Expériences prises en compte	Récolte médiane (t ha ⁻¹)				
	azote engrais			Inoculation	
	0	1/2	1	-	+
Toutes (5)	6,5	7,2	8,1	7,03	7,49
1985, 1987, 1990	6,5	7,5	8,8	7,16	8,04

2.5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans le cas des fixateurs libres, il semble possible d'utiliser la diversité existante du peuplement bactérien fixateur d'azote dans la rhizosphère des céréales. En sélectionnant la plus efficiente parmi les bactéries présentes, on peut, par inoculation des semences, augmenter le rendement de la plante, au moins dans les conditions où l'azote est effectivement le facteur limitant de la culture. Inoculer consiste alors à remplacer une diversité spontanée incontrôlée, par une souche possédant un caractère utile, ici une fixation d'azote efficiente. Il semble alors possible de remplacer une partie des engrais azotés par l'inoculation bactérienne sans diminution de rendement.

Remerciements : les résultats présentés ont été obtenus par : O Berge, T Heulin, N Omar, S N Shalaan, Tran Van Van, P Weinhard.

Références bibliographiques

- App A A, Watanabe I, Alexander M, Ventura W, Daez C, Santiago T, De Datta S K (1980) Nonsymbiotic nitrogen fixation associated with the rice plant in flooded soils. *Soil Sci.*, 130, 5, 283-289.
- Barraquio W L, Watanabe I (1981) Occurrence of aerobic nitrogen fixing bacteria in wetland and dryland plants. *Soil Sci. Plant. Nutr.*, 27, 1, 121-125.
- Bashan Y, Levanony H (1990) Current status of *Azospirillum* inoculation technology : *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can J Microbiol*, 36, , 591-608.
- Heulin T, Omar N, Rahman M, Balandreau J (1989) Some principles for inoculation of rice by nitrogen fixing bacteria under field conditions. International Symposium and Workshop On Biological Nitrogen Fixation associated With Rice Production Dec 28 - Jan 1 89 CRRRI Cuttack India.
- Ladha J K, So R B, Watanabe I (1987) Composition of *Azospirillum* species associated with wetland rice plant grown in different soils. *Plant Soil* 102, 127-129
- Omar AMN, Richard C, Weinhard P, Balandreau J (1989) Using the spermosphere model technique to describe the dominant nitrogen-fixing microflora associated with wetland rice in two Egyptian soils. *Biol Fertil Soils* 7, 158-163
- Omar N, Berge O, Shalaan SN, Hubert JL, Heulin T, Balandreau J (1992) Inoculation of rice with *Azospirillum brasilense* in Egypt. Results of five different trials between 1985 and 1990. *Symbiosis* 13, 281-289
- Omar AMN (1987) Fixation de l'azote dans la rhizosphère du riz : selection d'une souche in vitro et effet de son inoculation dans trois rizières d'Egypte. Thèse Univ. Nancy I, 106p
- Rahman M (1987) Amélioration de la fixation d'azote dans la rhizosphère du riz cultivé sur différents sols du Bangladesh. Thèse Doct. Univ. Nancy I: 158p.
- Roger PA, Ladha JK (1992) Biological N₂ fixation in wetland rice fields : Estimation and contribution to nitrogen balance. *Plant and Soil* 141, 41-55
- Roussos S, Garcia JL, Rinaudo G, Gauthier D (1980) Distribution de la microflore hétérotrophe aérobie et en particulier des bactéries dénitrifiantes et fixatrices d'azote libres dans la rhizosphère du riz. *Ann. Microbiol (Inst. Pasteur)*, 131A, 197-207
- Thomas-Bauzon D, Weinhard P, Villecourt P, Balandreau J (1982) The spermosphere model. I. Its use in growing, counting, and isolating N₂-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. *Can J Microbiol* 28, 922-928
- Trân Van V, Mavingui P, Berge O, Balandreau J, Heulin T (1994) Promotion de croissance du riz inoculé par une bactérie fixatrice d'azote, *Burkholderia vietnamiensis*, isolée d'un sol sulfaté acide du Viêt-nam *agronomie* 14, 697-707
- Tran Van V, Omar N, Heulin T, Berge O, Balandreau J (1994) Selection of bacteria for enhanced plant growth and results of field tests. In : *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*. Proc. 3rd Intern. Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, Adelaide, South Australia, March 7-11, 1994. MH Ryder, PM Stephens and GD Bowen, eds. CSIRO pub., 14-17.
- Watanabe I, Barraquio WL (1979) Low levels of fixed nitrogen required for isolation of free-living N₂-fixing organisms from rice roots. *Nature (London)* 277, 565-566
- Watanabe I, Lee KK (1977) Non symbiotic nitrogen fixation in rice and ricefields. In : *Biological N₂ fixation in farming systems of the tropics* (Ayanaba A, Dart PJ eds), Wiley & sons, 289-305.
- Wetselaar R (1981) Nitrogen inputs and outputs of an unfertilized paddy field. In : *Terrestrial Nitrogen Cycles*. *Ecol Bull Stockholm* 33, 573-583

3. UTILISATION DES CYANOBACTERIES LIBRES ET SYMBIOTIQUES EN RIZICULTURE

Pierre ROGER

Laboratoire ORSTOM de Microbiologie des Anaérobies, Marseille.

Dans les rizières, les cyanobactéries se rencontrent à la fois sous la forme libre (Roger et Kulasoorya 1980) et sous la forme d'une symbiose entre un genre unique (*Anabaena*) et différentes espèces de fougères aquatiques du genre *Azolla* (Lumpkin and Plucknett 1982). Les formes libres sont ubiquistes par contre la symbiose *Anabaena*-*Azolla* ne se rencontre spontanément que dans un faible pourcentage des rizières.

Le potentiel agronomique des cyanobactéries libres a été mis en lumière en 1939 par De qui a attribué la fertilité des sols de rizière à la fixation biologique de N_2 par ces organismes. Les recherches sur l'inoculation des rizières avec des cyanobactéries ont été initiées au Japon en 1951 par Watanabe et ses collaborateurs. Par contre l'utilisation d'*Azolla* remonte au 11ème siècle au Viêt-nam et au moins au 14^{ème} siècle en Chine. La nature symbiotique d'*Azolla* et l'identification du symbiote fixateur de N_2 remontent au 19ème siècle, par contre les progrès concernant l'amélioration des souches et en particulier l'hybridation sexuelle et la recombinaison sont récents (Wei et al 1986, Lin et al 1988).

3.1. CYANOBACTERIES LIBRES

Potentiel pour augmenter les rendements en riz

Les estimations de fixation de N_2 par les cyanobactéries dans les rizières s'échelonnent entre 0 et 80 kg N ha⁻¹ par cycle cultural avec une médiane inférieure à 25 kg N. Une étude présentant 190 estimations de la fixation de N_2 dans des parcelles soumises à différentes pratiques culturales (cf. Roger 1995) a montré des activités variant de 2 à 50 kg N ha⁻¹ par cycle (Fig. 3.1). Les valeurs moyennes étaient de 20 kgN ha⁻¹ dans les parcelles ne recevant pas de fertilisation azotée, de 8 kg lorsque l'engrais azoté avait été épandu dans l'eau de submersion et de 12 kg dans les parcelles où il avait été enfoui. L'activité fixatrice de N_2 était négligeable dans 3/4 des parcelles où l'azote avait été épandu dans l'eau de submersion. Ces valeurs sont en accord avec celles obtenues par des mesures de biomasse et indiquent un potentiel modéré comparé à celui d'*Azolla* ou des légumineuses

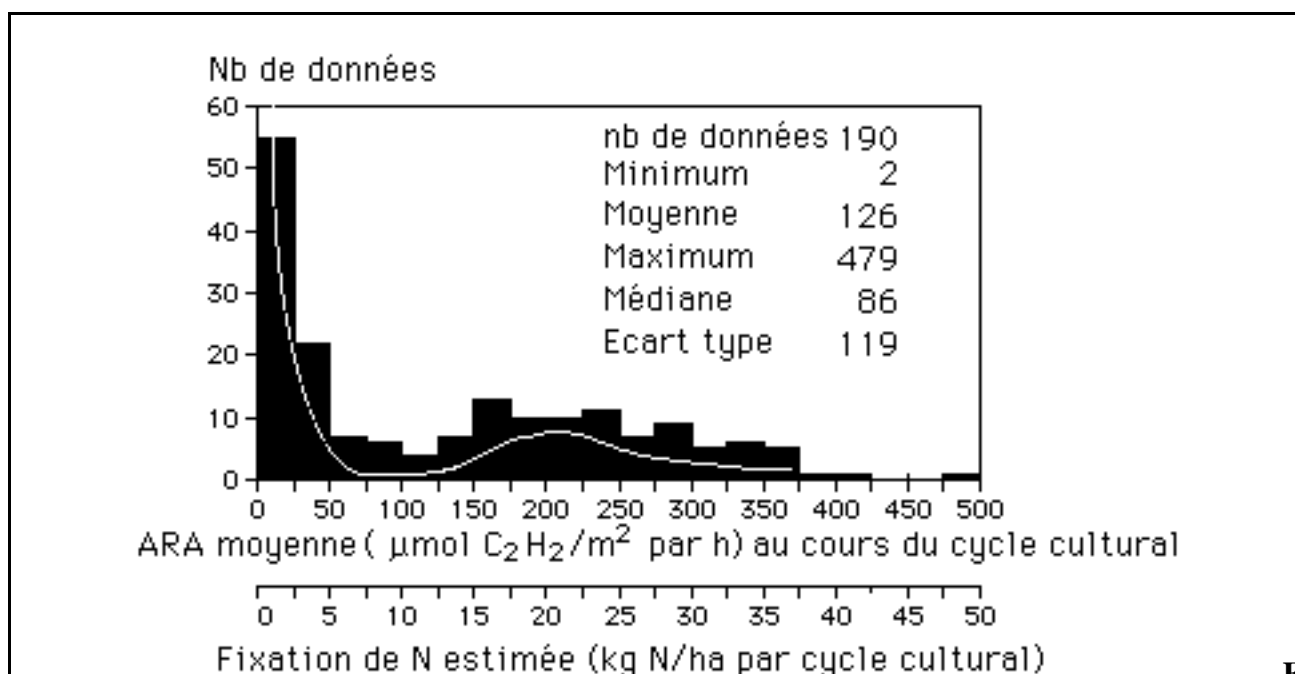


Figure 3.1. Distribution de 190 estimations de la valeur moyenne de l'ARA et de l'azote fixé par les cyanobactéries durant un cycle cultural dans des rizières soumises à 26 pratiques culturales différentes (Chaque valeur est la moyenne de 13 mesures au cours d'un cycle cultural, chaque mesure étant effectuée sur 13 carottes comprenant le premier centimètre de sol et l'eau de submersion. La partie gauche de l'histogramme correspond principalement à des parcelles avec épandage d'engrais azoté; la partie droite correspond principalement à des parcelles sans application d'azote ou avec enfouissement de l'azote).

Les effets favorables pour le riz autres que l'apport d'azote attribués aux cyanobactéries comprennent:

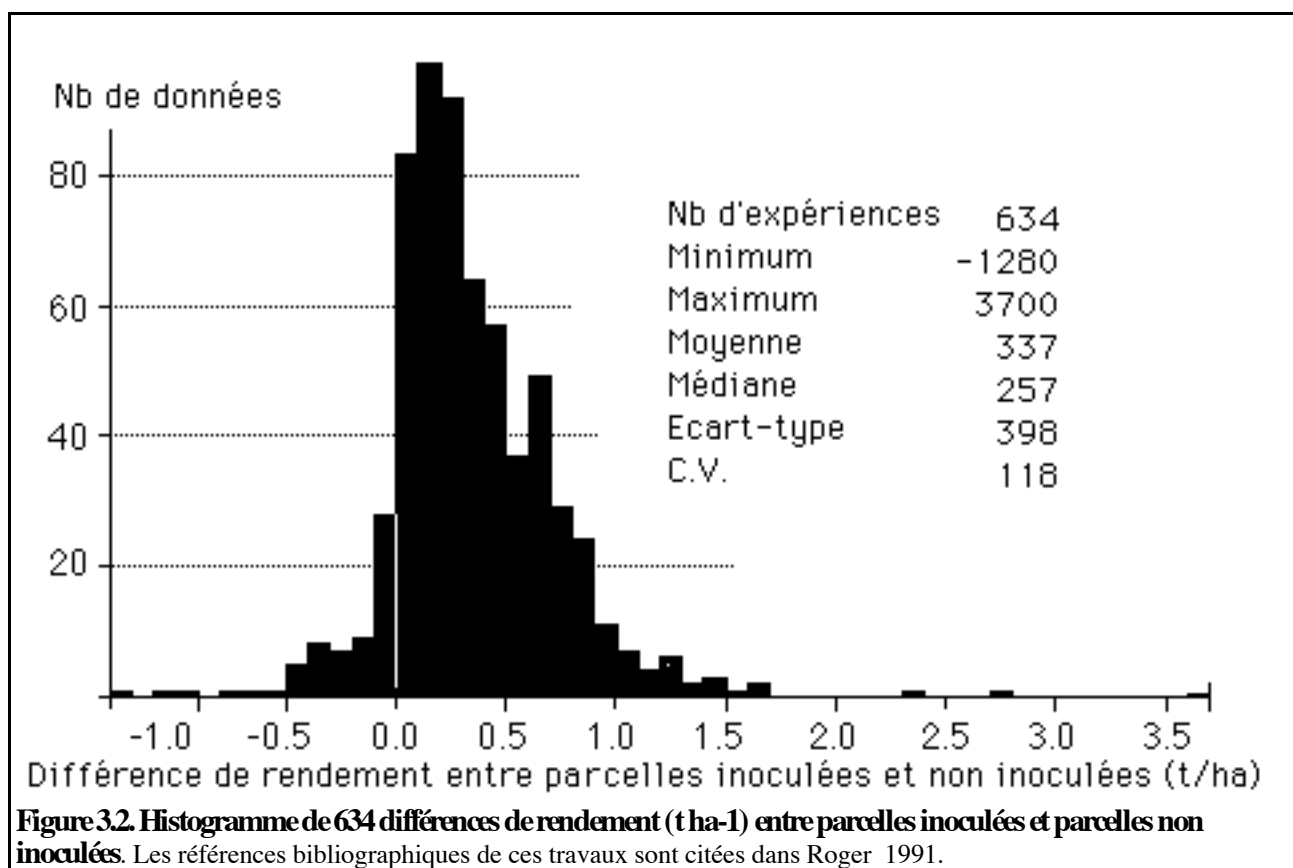
- un effet malherbicide dû à l'occupation de la surface de l'eau et la compétition,
- l'augmentation de la teneur en matière organique du sol et de l'agrégation du sol,
- l'excrétion d'acides organiques qui solubilisent le P du sol et augmentent sa disponibilité pour le riz,
- la diminution des effets de sulfato-réduction néfastes pour le riz par oxygénation du milieu et augmentation de la résistance de la plante,
- l'augmentation de la température de l'eau qui favorise le tallage et
- la production de substances de croissance (ce dernier point demande toutefois à être démontré).

Effet de l'inoculation de rizières avec des cyanobactéries

Les recherches sur l'utilisation pratique des cyanobactéries en riziculture ont été orientées exclusivement sur l'inoculation jusqu'en 1980. Ces recherches ont été effectuées principalement en Inde où un projet spécial (All-India Coordinated Project on Algae) avait été établi en 1977. Des essais ont également été faits en Birmanie, en Egypte et en Chine. La technique recommandée en Inde (Venkataraman, 1981) utilise un inoculum composite produit à partir de cultures de laboratoire qui est propagé *in situ* dans des micro-parcelles avec 5-15 cm d'eau, 4 kg de sol m⁻², 100 g de superphosphate m⁻² et des insecticides. Le tapis algaire, qui se développe en 2-3 semaines, est séché et concassé pour être utilisé comme inoculum, épandu à raison de 10 kg ha⁻¹.

L'analyse de 634 expériences *in situ* publiées dans des revues scientifiques et dans les rapports de différents organismes de recherche montre une augmentation moyenne de rendement de 350 kg ha⁻¹ dans les traitements ne différant des contrôles que par l'apport d'inoculum (Roger 1991). Toutefois, l'histogramme des différences de rendement entre parcelles inoculées et non inoculées montre une dissymétrie marquée qui provient en grande partie de l'absence de données dans les classes négatives (Fig. 3.2). Cela indique que les expériences n'ayant pas montré d'effet positif n'ont généralement pas été publiées. La forme de l'histogramme suggère donc que le mode (200 kg ha⁻¹) est une valeur plus réaliste que la moyenne pour estimer le potentiel moyen de l'inoculation avec des cyanobactéries pour augmenter les rendements en riz. Les différences observées ne sont significatives que dans 17 % des cas.

Ces résultats indiquent que l'inoculation des rizières avec des cyanobactéries peut augmenter les rendements. Toutefois les résultats sont très variables et l'augmentation, très modeste, reste le plus souvent inférieure au seuil de détection statistique.



Le principe de l'inoculation des rizières avec des cyanobactéries est à reconsidérer

Les données quantitatives sur l'utilisation de l'inoculation algale en milieu paysan après plus de 15 ans d'essais de vulgarisation en Inde sont contradictoires. Toutefois, les estimations les plus optimistes indiquent que cette technique n'est utilisée que dans un faible pourcentage des rizières de quelque états de l'Inde (Tamil Nadu et Uttar Pradesh), de l'Égypte et peut-être de Birmanie. L'adoption très faible par les fermiers reflète les effets modestes et imprévisibles de l'inoculation sur les rendements en riz.

Le principe même de l'inoculation algale doit être reconsidéré en fonction des connaissances acquises au cours des dernières années (Roger 1991, 1995) à savoir:

- Les cyanobactéries fixatrices de N_2 sont ubiquistes dans les sols de rizières
- Les facteurs de l'environnement limitant leur développement sont un pH bas et une faible teneur en P du sol, et la prédation par des invertébrés aquatiques,
- L'épandage d'engrais azoté inhibe fortement la fixation de N_2 photodépendante. L'enfouissement de l'engrais diminue fortement cette inhibition.
- Les propagules de souches indigènes fixatrices de N_2 présentes dans les rizières sont généralement nettement plus nombreuses que les propagules contenues dans la quantité d'inoculum sec qu'il est recommandé d'appliquer.
- Les souches étrangères inoculées dans un sol ne s'y établissent généralement.

Des expériences *in situ* confirment que l'apport de P, l'absence de fertilisation azotée ou l'enfouissement de l'engrais azoté et le contrôle des prédateurs des algues permettent généralement un développement conséquent de la flore autochtone fixatrice de N_2 (ces pratiques culturales seraient également un préalable à l'établissement de souches étrangères inoculées). Toutefois, leur coût est généralement supérieur au bénéfice obtenu et ne peut être justifié que si elles ne sont pas uniquement destinées à permettre le développement des cyanobactéries mais qu'elles bénéficient directement à la production de riz ou à la protection de l'environnement.

Ces résultats indiquent également que l'inoculation des rizières avec des cyanobactéries n'est justifiée que si les conditions de milieu leur sont favorables et permettent un développement de la biomasse fixatrice de N_2 plus rapide que le développement spontané à partir des propagules présentes dans le sol. Ceci peut avoir lieu lorsque les conditions suivantes sont réunies:

- niveau bas de propagules de souches indigènes présentes à la surface du sol au moment de la mise en eau, (en particulier après une longue jachère sèche ou une culture en sol exondé qui diminuent la viabilité des propagules de cyanobactéries)
- sols alcalins avec un niveau de phosphore assimilable élevé,
- ensoleillement suffisant en début de cycle cultural,
- fertilisation azotée non utilisée, enfouie, ou retardée au cours du cycle cultural,
- utilisation d'un inoculum (1) frais, (2) produit *in situ* à partir du sol de la parcelle destinée à être inoculée, (3) enrichi en P et (4) ne contenant pas de prédateurs ou de pathogènes.

Les propriétés du sol, le climat, et les pratiques culturales à réunir pour obtenir ces conditions limitent toutefois le potentiel d'utilisation de l'inoculation à un faible pourcentage des rizières.

Des progrès importants ont été faits en génétique moléculaire des cyanobactéries et il est tentant de spéculer sur les possibilités de sélectionner ou de créer par manipulation génétique des souches ayant des performances améliorées. Probablement, des 'super souches' ayant un potentiel fixateur de N_2 *in vitro* élevé pourront être sélectionnées ou construites, toutefois les caractéristiques qui leur permettraient de coloniser un sol et d'y produire une biomasse agronomiquement significative sont encore inconnues.

Conclusion

Dans l'état actuel des connaissances, il apparaît que le potentiel agronomique des cyanobactéries est nettement mieux utilisé par des techniques de gestion intégrée destinées à favoriser la flore autochtone que par de l'inoculation algale. Les résultats d'études agronomiques et écologiques dans les rizières indiquent clairement qu'il est possible de tirer parti de la flore indigène en enfouissant l'engrais azoté et que cette pratique, recommandable dans la majorité des sols de rizière, présente un triple avantage :

- elle permet l'expression de la fixation d'azote par la flore indigène et d'obtenir à peu de frais un apport de 10 - 30 kg d'azote
- elle diminue considérablement les pertes d'azote due à la volatilisation de l'ammoniac
- elle évite la prolifération de larves de moustique dans l'eau de la rizière.

3.2. AZOLLA

Azolla est une fougère aquatique de petite taille qui héberge une cyanobactérie symbiotique fixatrice de N_2 . Azolla a été traditionnellement utilisée comme engrais vert au Viêt-nam et en Chine. Bien qu'étant indigène dans la majorité des pays rizicoles (Lumpkin & Plucknett 1982, IRRI 1987), son développement spontané est rare et elle doit être inoculée dans les rizières avant chaque cycle cultural.

Potentiel pour augmenter les rendements en riz

Les essais en parcelles expérimentales montrent qu'en conditions optimisées Azolla peut fixer jusqu'à 300 kg N ha^{-1} . Un essai international en vraie grandeur conduit pendant 4 ans dans 37 sites et 10 pays (Watanabe 1987) a montré que la biomasses d'Azolla cultivée avant et après repiquage du riz variait entre 5 et 25 t ha^{-1} poids frais (moyenne 15 t) soit $10\text{-}50 \text{ kg N ha}^{-1}$ (moyenne 30 kg N). Ces mêmes essais ont montré, qu'en moyenne, l'incorporation d'une culture d'Azolla avant ou après le repiquage du riz était équivalente à l'épandage de 30 kg d'azote et augmentait les rendements d'environ $0,6 \text{ t ha}^{-1}$. L'incorporation de deux cultures d'Azolla avant et après le repiquage était équivalente à l'épandage de 60 kg d'azote et augmentait les rendements d'environ 1 t ha^{-1} (Tableau 3.1).

Tableau 3.1. Résultats d'essais internationaux (INSFFER 1979-1980) de l'utilisation d'Azolla dans 37 sites de 10 pays rizicoles (d'après Watanabe 1987)

Traitement	Rendement	
	(t/ha)	% du contrôle
Contrôle sans azote	3.00	100 c
30 kg N/ha en 3 applications	3.65	121 b
60 kg N/ha en 3 applications	4.24	141 a
Azolla incorporée avant repiquage	3.73	124 b
Azolla incorporée après repiquage	3.67	122 b
Azolla inoculée après repiquage mais non incorporée	3.61	120 b
Combinaison des traitements 2 et 4	4.15	138 a
Combinaison des traitements 2 et 5	4.07	135 a
Azolla incorporée avant et après repiquage	4.09	136 a

Les effets favorables autres que l'apport d'azote attribués à Azolla comprennent: un effet malherbicide par compétition,

- l'amélioration de l'utilisation du P appliqué sous forme d'engrais minéral,
- la concentration du K présent dans l'eau de submersion à des teneurs (1-5 ppm) inférieures au seuil d'absorption par le riz (8 ppm). Le seuil d'absorption est d'environ 0.85 ppm pour Azolla,
- la diminution des pertes d'eau par évapotranspiration et
- la diminution du pH de l'eau de submersion et, par suite, des pertes d'azote par volatilisation.

Utilisation actuelle, facteurs limitants et perspectives

Après une utilisation sur plusieurs millions d'hectares de rizières en Chine et au Viêt-nam, l'emploi d'Azolla a constamment diminué au cours des dix dernières années et cette technique ne s'est pas répandue dans les pays qui ont testé son utilisation. Le tableau 3.2 résume cette évolution.

Les facteurs qui ont empêché l'adoption par les pays rizicoles des techniques utilisées en Chine et au Viêt-nam sont à la fois technologiques et socio-économiques. Les différents facteurs limitant l'utilisation d'Azolla sont résumés ci-après, ainsi que les méthodes possibles pour les surmonter.

Azolla ne résistant pas au dessèchement, demande la présence d'eau pendant la totalité de son cycle cultural. Elle est multipliée de façon végétative et doit être conservée dans des pépinières. L'utilisation d'Azolla requiert donc l'existence de réseaux d'irrigation et de réseaux de conservation et distribution de l'inoculum. Son adoption par les riziculteurs dépend de décisions politiques pour l'établissement de tels réseaux (Roger & Watanabe 1986). La conservation d'Azolla sous forme de sporocarpes utilisés ensuite pour inoculer les rizières n'a, pour le moment, pas donné de résultats satisfaisants.

Tableau 32. Importance de l'utilisation d'Azolla en riziculture (d'après Roger 1995)

• Pays où Azolla est ou a été utilisée de façon significative:

Chine:	avant 1978:	> 6.5 million ha	(F.A.O. 1978)
	avant 1979:	1.34 million ha	(Liu Chung Chu 1979)
	avant 1980 :	0.7 million ha	(Lumpkin & Plucknett 1982)
	depuis 1987:	diminution de l'utilisation comme engrais vert, recherches pour l'utilisation comme aliment du bétail (Liu Chung Chu 1987)	
Viêt-nam:	en 1980:	environ 500 000 ha	(Roger & Watanabe 1986)
	depuis 1980:	l'utilisation a continuellement diminué	
Philippines:	en 1981:	adoption sur 5,000 ha (Kikuchi et al. 1984)	
	en 1986:	84,000 ha	(Azolla Workshop , IRRI 1987)
	depuis 1986:	l'utilisation a constamment diminué	

• Pays où les possibilités d'utilisation d'Azolla ont été ou sont en cours d'étude:

Brésil, Inde, Italie, Pakistan, Sénégal, Sri Lanka, Thaïlande.

• En 1990 l'utilisation d'Azolla concerne moins de 1% des surfaces cultivées en riz.

Le phosphore est un facteur clé de la croissance d'Azolla et son addition est requise dans la majorité des sols. Pour être économiquement rentable, l'apport de phosphore doit avoir une efficacité azotée (N fixé/P épandu) supérieure à 3. Cette valeur n'est pas atteinte pour une application unique en début de culture. Le fractionnement de la fertilisation permet d'obtenir une efficacité de 5 à 10 (Watanabe et al. 1980) mais augmente le coût de l'application. Des espèces présentant des besoins en P réduits ont été identifiées (Watanabe, communication personnelle).

Une trentaine d'insectes, 2 arachnoïdes, et 9 mollusques peuvent diminuer la productivité d'Azolla de 10 à 60% . Des maladies fongiques qui se développent sur les blessures causées par les insectes augmentent l'effet de ces derniers. Des méthodes de lutte ont été identifiées mais l'application de pesticides n'est pas économiquement rentable dans les rizières. Elle doit être limitée aux parcelles de production d'inoculum (Mochida 1987).

La température optimale pour le développement de la majorité des espèces (20-30 °C) est inférieure à la température moyenne de la zone tropicale. Un climat tempéré explique le succès d'Azolla en Chine et au Viêt-nam. Il est possible de sélectionner des souches résistantes à des températures élevées (Lumpkin 1987). Toutefois les effets négatifs des températures tropicales sur la productivité d'Azolla ne sont pas uniquement des effets physiologiques directs mais également des effets indirects, en particulier une température élevée en climat tropical humide favorise le développement des parasites et pathogènes d'Azolla.

Les principaux facteurs qui limitent l'utilisation d'Azolla sont socio-économiques. Les méthodes traditionnelles utilisées au Viêt-nam et en Chine demandent énormément de travail. Les études de Kikuchi et al. (1984) aux Philippines, dans une région où la teneur exceptionnellement élevée des sols en P assimilable permet le développement spontané de l'Azolla sans apport de P, ont montré un bénéfice de \$35 ha⁻¹. Ces auteurs ont cependant conclu que le seuil de rentabilité était dépassé lorsque le coût de la journée de travail était supérieur à deux dollars ou lorsqu'il fallait appliquer des insecticides pour contrôler les parasites d'Azolla. Une étude dans une région moins favorable (Rosegrant et al. 1985) a conclu que le coût de l'utilisation d'Azolla était supérieur à celui de l'application d'urée et que son adoption était peu probable lorsque de l'engrais azoté était disponible. Ces études ne prennent pas en compte les effets à long terme d'Azolla sur la fertilité des sols.

Au cours des dernières années, les études de la recombinaison de différents partenaires (fougère et cyanobactérie) (Lin et al. 1988) et de l'hybridation interspécifique (Wei et al. 1986) ont montré qu'il est possible d'améliorer les propriétés des souches en combinant, par exemple, le potentiel fixateur de N₂ élevé d'*A. filiculoides* avec la résistance à la chaleur d'*A. microphylla* (Tableau 10).

Le potentiel agronomique d'*Azolla* n'est pas limité à l'utilisation comme engrais vert. *Azolla* peut être également utilisée comme aliment du bétail pour les porcs et les poulets et en pisciculture, ainsi que dans des systèmes culturels complexes. Liu Chung Chu (F.A.O. 1988) a présenté un système combinant la culture du riz et d'*Azolla* avec la pisciculture. Dans ce système, le rendement en riz augmentait de 8% par rapport au système riz-*Azolla*, le développement des adventices et des parasites du riz était significativement réduit, la surface du sol était enrichie en N et en P, et les pertes de l'azote d'*Azolla* étaient de 21% contre 39% dans le système riz-*Azolla*.

Conclusions

Azolla est un engrais vert qui a un potentiel azoté du même ordre de grandeur que celui des légumineuses. Elle présente l'avantage de croître en sol submergé en même temps que le riz et elle est plus facile à incorporer que les légumineuses. Depuis la redécouverte d'*Azolla* par les agronomes des pays rizicoles autres que la Chine et le Viêt-nam, aux alentours de 1980, de nombreux travaux de recherche ont été entrepris pour étendre cette technologie à d'autres pays rizicoles. Des progrès importants ont été faits dans l'identification de méthodes permettant de contourner les facteurs limitants technologiques et dans l'amélioration des souches. Dans le même temps l'utilisation d'*Azolla* a pratiquement disparue des pays où elle était traditionnelle et ne s'est pas développée dans les pays qui ont testé les technologies disponibles ou tenté d'en développer d'autres. Les raisons sont principalement socio-économiques. Les écosystèmes favorables qui permettent le développement d'*Azolla* sans pratiques culturelles additionnelles après l'inoculation représentent une infime fraction des surfaces cultivées. Dans les autres écosystèmes, l'utilisation d'*Azolla* est limitée par le coût de production. De plus, en conditions de semis direct, *Azolla* devient une adventice préjudiciable par ses effets mécaniques sur les jeunes plantules de riz. L'évolution actuelle de la riziculture du repiquage vers le semis direct est un facteur négatif pour son adoption. A moins de changements économiques importants (taxation des engrais azotés et éventuellement subvention de la fertilisation organique), il est peu probable que l'utilisation d'*Azolla* se développe dans un pourcentage significatif des surfaces cultivées en riz. Par contre l'identification d'*Azolla* comme un biofertilisant à usages multiples (aliment du bétail, producteur primaire dans des systèmes culturels complexes riz-*Azolla*-poisson) est susceptible de relancer l'intérêt de son utilisation agronomique.

Références bibliographiques

- De PK (1939) The role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice fields. Proc. R. Soc. Lond. 127 B: 121-139.
- FAO (1988) The Rice-*Azolla*-Fish system. RAPA Bulletin Vol. 4, 37 pp
- IRRI (1987) *Azolla* utilization, IRRI PO Box 933, Manila, Philippines.
- Kikuchi M, Watanabe I, Haws LD (1984) Economic evaluation of *Azolla* in rice production. pp. 569-592 in Organic matter and rice. IRRI, PO Box 933, Manila, Philippines.
- Lin Chang, Liu Chung-Chu, Zeng De-Yin, Tang Long-Fei, Watanabe I (1988) Reestablishment of symbiosis to *Anabaena*-free *Azolla*. *Zhونغguo Kexue* 30B (7) 700-708.
- Lumpkin TA, Plucknett DL (1982) *Azolla* as a green manure. Westview Tropical Agriculture Series, Westview Press, Boulder Co, USA. 230 p.
- Mochida O (1987) Pests of *Azolla* and control practices. Text book for the training course on *Azolla* use. Fujian Acad Agric Sci and IRRI, Fuzhou, PRC, June 1987. 60 p.
- Roger PA (1991) Reconsidering the utilization of blue-green algae in wetland rice cultivation. pp 119-141 in Biological N₂ fixation associated with rice production, S.K Dutta and C. Sloger eds., Oxford & IBH Pub., New Delhi.
- Roger PA (1996) Biology and management of the floodwater ecosystem in wetland ricefields. International Rice Research Institute, PoBox 933, Manila, Philippines; ORSTOM, 214 rue La Fayette, Paris, France. 250 pp.
- Roger PA, Kulasooriya SA (1980) Blue-green algae and rice. IRRI, POBox 933, Manila, Philippines. 112 p.
- Roger PA, Watanabe I (1986) Technologies for utilizing biological nitrogen fixation in wetland rice: potentialities, current usage, and limiting factors. *Fert. Res.* 9: 39-77.
- Rosegrant MW, Roumasset JA, Balisacan A. (1985) Biological technology and agricultural policy: an assessment of *Azolla* in Philippine rice production. *Amer. J. Agric. Econ.* 67: 726-732.
- Venkataraman GS (1981) Blue-green algae for rice production. A manual for its promotion. FAO Soil Bull. n° 46. 102 p.
- Watanabe A, Nishigaki S, Konishi C (1951) Effect of nitrogen fixing blue green algae on the growth

- of rice plant. *Nature (London)* 168: 748-749.
- Watanabe I (1987) Summary report of the Azolla program of the International Network on Soil Fertility and Fertilizer Evaluation for Rice. pp. 197-205 *in* Azolla utilization. IRRI, PO Box 933, Manila, Philippines. 296 p.
- Watanabe I, Berja NS, Del Rosario DC (1980) Growth of Azolla in paddy fields as affected by phosphorus fertilizer. *Soil Sci. Plant Nutr.* 26: 301-307.
- Wei Wen-Xiong, Jin Gui-Ying, Zhang Ning (1986) Preliminary report on Azolla hybridization studies (in Chinese). *Bull Fujian Acad. Agric. Sci.* 1: 73-79.

4. DES LEGUMINEUSES ANNUELLES UTILISEES POUR REGENERER LES SOLS DE JACHERE OU COMME ENGRAIS VERTS EN RIZICULTURE

Bernard Dreyfus
Laboratoire de Microbiologie, ORSTOM, Dakar, Sénégal.

4.1. INTRODUCTION

Les légumineuses tropicales spontanées, annuelles ou pérennes ont longtemps été considérées par les agriculteurs comme de simples mauvaises herbes. Grâce à leurs symbioses avec les rhizobiums qui forment des nodules fixateurs d'azote sur leurs racines et parfois sur leurs tiges, elles jouent cependant un rôle très important dans le maintien et l'amélioration de la fertilité des sols, comme fourrage pour les animaux ou, plus généralement, dans la protection de l'environnement. Ce n'est que récemment qu'on a commencé à étudier de façon approfondie la nodulation et la fixation d'azote de ces petites légumineuses, dont plusieurs sont des espèces menacées par le surpâturage ou la désertification. L'objectif de cette publication est donc de présenter l'état des connaissances sur les légumineuses annuelles ou pérennes et le rôle qu'elles peuvent jouer dans le développement durable de l'agriculture tropicale, en prenant comme exemples l'amélioration des sols de jachères et l'utilisation des engrais verts dans la riziculture traditionnelle en Afrique sub-saharienne.

4.2. LES LEGUMINEUSES DE JACHERE

En Afrique sub-saharienne, l'agriculture traditionnelle a longtemps été caractérisée par l'alternance d'une mise en culture des sols, suivie d'un abandon cultural après la baisse des rendements. Cette seconde phase permettait la remontée de la fertilité des sols grâce à une jachère de longue durée qui favorisait un retour vers une savane arbustive ou arborée (Serpantié *et al.*, 1994). Ce système de cycles culture-jachère longue a parfaitement fonctionné jusqu'à une époque récente. Aujourd'hui, la pression démographique et le besoin important en terres de culture ont considérablement raccourci les temps de jachère, et celle-ci, lorsqu'elle n'a pas totalement disparu, ne joue plus que partiellement son rôle de reconstitution de la fertilité des sols. Or, le coût élevé des engrais chimiques, ainsi que la faible disponibilité en fumier et matière organique ne permettent pas aux paysans africains de compenser l'épuisement prématuré des sols du au raccourcissement de la jachère. Une des solutions durables pour inverser cette tendance passe donc par une amélioration de l'efficacité de cette jachère courte dans le maintien de la fertilité des sols au niveau des terroirs villageois, notamment en favorisant un enrichissement des jachères en légumineuses.

La jachère: une réserve de biodiversité pour les légumineuses annuelles ou pérennes

Les jachères tropicales que nous avons étudiées sont caractérisées par une grande richesse en légumineuses spontanées. Celles-ci sont présentes pour la plupart dès la première année d'abandon des cultures, confirmant ainsi leur rôle de plantes pionnières. Afin d'étudier et exploiter cette importante diversité, nous avons tout d'abord entrepris un vaste programme de prospections dans les jachères du Nord (zone sahélienne) et du Sud (zone soudanienne) du Sénégal pour identifier les espèces de légumineuses, récolter leurs graines et leurs nodules afin d'isoler au laboratoire leurs rhizobiums spécifiques.

Nous avons ainsi récolté et identifié 18 genres de légumineuses annuelles ou pérennes comprenant 58 espèces. Ces espèces appartiennent aux genres *Abrus* (2 espèces), *Alysicarpus* (3 espèces), *Bryaspis* (1 espèce), *Canavalia* (1 espèce), *Chamaecrista* (3 espèces), *Crotalaria* (12 espèces), *Cyamopsis* (1 espèce), *Dalbergia* (1 espèce), *Desmodium* (2 espèces), *Eriosema* (1 espèce), *Indigofera* (18 espèces), *Moghania* (1 espèce), *Piliostigma* (1 espèce), *Rhynchosia* (1 espèce), *Stylosanthes* (2 espèces), *Tephrosia* (5 espèces), *Vigna* (3 espèces), *Zornia* (1 espèce).

Diversité des "rhizobiums de jachère"

A partir des nodules récoltés sur le terrain sur chacune des 58 espèces de légumineuses de jachère, nous avons isolé une ou plusieurs souches de rhizobiums. La collection bactérienne ainsi constituée comprend environ 400 souches de "rhizobiums de jachère". L'étude de leurs propriétés symbiotiques (spectre d'hôte), ainsi qu'une caractérisation taxinomique de ces souches par électrophorèse en gel de

polyacrylamide (SDS-PAGE), ont permis de montrer que la majorité de ces souches est capable de noduler la plupart des légumineuses testées et appartiennent au grand "groupe" des *Bradyrhizobium* à croissance lente. Les résultats obtenus montrent cependant une grande diversité parmi ces souches de *Bradyrhizobium*.

Les autres souches, environ une centaine, présentent une croissance rapide et se retrouvent dans quatre groupes taxinomiquement différents de tous les autres groupes connus et constituent de nouvelles espèces bactériennes. Contrairement aux *Bradyrhizobium*, la plupart de ces souches à croissance rapide présentent une grande spécificité de nodulation et ne nodulent qu'un petit nombre de légumineuses. La comparaison du spectre d'hôte des *Bradyrhizobium* et des souches à croissance rapide montre cependant une grande continuité dans la spécificité de nodulation allant des souches de *Bradyrhizobium* les moins spécifiques vers les souches à croissance rapide les plus spécifiques (Tableau 4.1).

La découverte de souches de rhizobiums spécifiques est importante car on pensait jusqu'à présent que la nodulation des légumineuses annuelles tropicales ne présentaient aucun caractère de spécificité, et qu'il était donc inutile d'inoculer ces légumineuses, des rhizobiums à large spectre d'hôte étant naturellement présents dans les sols. De plus, nous avons mis en évidence de grandes différences de spécificité de nodulation entre légumineuses appartenant au même genre botanique. Ainsi, en examinant la nodulation et la fixation d'azote de 12 espèces différentes de Crotalaires nous avons pu montrer pour la première fois qu'il existait deux groupes de spécificité bien distincts dans le genre *Crotalaria* :

- Le groupe I, qui comprend les espèces *C. glaucoïdes*, *C. perrottetii*, *C. podocarpa*, et *C. spherocarpa*, est nodulé uniquement par des souches à croissance rapide très spécifiques.

- Le groupe II qui comprend les espèces *C. comosa*, *C. cylindrocarpa*, *C. goreensis*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroïdes*, *C. ochroleuca*, et *C. retusa*, *C. senegalensis* n'est pas ou peu spécifique, et nodule avec un grand nombre de souches de *Bradyrhizobium*.

Des souches très effectives de rhizobiums ont pu être isolées à partir de chacun des deux groupes de Crotalaires. Ces souches sélectionnées ont servi d'inoculum pour les expériences au champs, et les premiers résultats montrent que les espèces spécifiques du groupe I répondent mieux à l'inoculation que les espèces du groupe II. Or plusieurs espèces de Crotalaires pourraient jouer un rôle important dans l'amélioration des sols de jachère, car non seulement elles fixent des quantités importante d'azote (environ 50 Kg d'azote par hectare et par an) mais sont d'excellentes plantes pièges pour les nématodes phytoparasites du genre Meloidogyne. Ces propriétés font que certaines espèces de Crotalaires qui poussent naturellement dans les jachères sont actuellement aussi plantées dans les périmètres maraîchers villageois et utilisées pour éliminer les nématodes et comme engrais vert pour enrichir le sol en azote.

Tableau 4.1. Spécificité de nodulation des légumineuses de jachère.

PLANTES HOTES	SOUCHES									
	<i>Bradyrhizobium</i>					<i>Rhizobium</i>				
	29	938	937	1823	1836	17	1849	18	1822	1833
	B	B	B	B	B	R	B	B	R	R
<i>Indigofera stenophylla</i>	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
<i>Alysicarpus glumaceüs</i>	e	E	E	E	E	E	E	E	E	0
<i>Stylosanthes mucronata</i>	E	E	E	E	e	E	E	E	0	0
<i>Indigofera hirsuta</i>	E	E	E	E	E	E	E	0	0	0
<i>Indigofera senegalensis</i>	E	E	E	E	E	E	0	0	0	0
<i>Eriosema glomeratum</i>	e	e	E	e	E	0	0	0	e	0
<i>Crotalaria retusa</i>	e	e	E	E	0	0	0	E	0	0
<i>Alysicarpus rugosus</i>	E	E	E	0	0	0	0	E	0	0
<i>Crotalaria goreensis</i>	e	E	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Abrus stictosperma</i>	E	0	0	0	0	0	0	I	I	0
<i>Crotalaria glaucoïdes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Crotalaria perrottetii</i>	0	I	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 4.2. Effet de l'inoculation sur le rendement des légumineuses de jachère

ESPECES	Hauteur (cm)		Rendement poids frais (t ha ⁻¹)		Rendement poids sec (t ha ⁻¹)	
	Témoins	Inoculées	Témoins	Inoculées	Témoins	Inoculées
<i>Alysicarpus glumaceus</i>	75	89	6	10,8	1,8	3
<i>Tephrosia purpurea</i>	72	71	17,7	16,5	6,6	6
<i>Alysicarpus ovalifolius</i>	56	58	8,9	9	3	3

Parcelles expérimentales de 500 m². Densité: 30 plantes par m².

Souches inoculées : ORS 1830: *A. glumaceus*, ORS 1816: *T. purpurea* et ORS 1821: *A. ovalifolius*.

Essais d'utilisation des légumineuses pour l'enrichissement des jachères

Les 58 espèces de légumineuses spontanées de jachère ont été cultivées et inoculées par leurs rhizobiums spécifiques en parcelles expérimentales, puis sélectionnées en fonction de leur production de biomasse, de leur capacité fixatrice d'azote, et de leurs propriétés fourragères. C'est ainsi que nous avons choisi trois espèces particulièrement appréciées par les éleveurs pour leurs qualités fourragères et leur importante production de biomasse. Il s'agit d'*Alysicarpus ovalifolius*, d'*Alysicarpus glumaceus* et de *Tephrosia purpurea*.

Au cours de la saison des pluies, en Juillet 1995, dans le cadre du programme Jachère (coordination C. Floret), nous avons mis en place des essais avec ces trois espèces à Kolda sur des sols de jachère. L'inoculation a été faite avec des souches de rhizobiums préalablement testées au laboratoire et sélectionnées: ORS 1830 pour *Alysicarpus glumaceus*, ORS 1816 pour *Tephrosia purpurea* et ORS 1821 pour *Alysicarpus ovalifolius*. Les graines préalablement inoculées ont été semées dans la jachère à la volée. Les résultats au bout de trois mois de culture sont donnés au Tableau 2 et montrent une très bonne production de biomasse des trois espèces mais une réponse variable à l'inoculation. Ainsi, on observe un effet important de l'inoculation sur la croissance et la production de biomasse d'*Alysicarpus glumaceus* dont la hauteur augmente et dont la production de matière végétale fraîche ou sèche est pratiquement doublée (Tableau 4. 2). Par contre, aucun effet de l'inoculation n'est observé chez *Alysicarpus ovalifolius* et un effet légèrement négatif de l'inoculation est même noté dans le cas de *Tephrosia purpurea*. Ces résultats peuvent s'expliquer par une présence importante de populations natives de rhizobiums efficaces dans les sols, une abondante nodulation effective ayant été observées sur toutes les plantes des parcelles témoins non inoculées. Des analyses de sols faites après la première année de culture ont cependant montré une augmentation significative de l'azote du sol dans les parcelles cultivées avec ces trois légumineuses annuelles, la concentration de l'azote total du sol passant de 0.35/1000 dans les parcelles témoins à 0.6/1000 dans les parcelles cultivées avec les légumineuses. Cette augmentation reste cependant très faible par comparaison avec les sols agricoles européens dont la teneur moyenne en azote total est de 2/1000.

4.3. UTILISATION DES LEGUMINEUSES AQUATIQUES EN RIZICULTURE.

Propriétés originales des légumineuses "aquatiques"

Les légumineuses "aquatiques" poussent en saison des pluies dans les terres inondées des régions tropicales. La plupart d'entre elles présente une particularité remarquable qui les distingue des autres légumineuses, elles possèdent des nodules fixateurs d'azote non seulement sur leurs racines mais aussi sur leurs tiges (Dommergues *et al.*, 1985). Les nodules aériens apparaissent exclusivement au niveau de primordia racinaires présents sur toute la longueur de la tige et qui donnent naissance à des nodules après infection par les rhizobiums spécifiques. Ces légumineuses aquatiques à nodules de tige appartiennent à quatre genres différents, *Sesbania*, *Aeschynomene*, *Neptunia* et *Discolobium* et sont classées suivant leur aptitude à noduler sur la tige (Tableau 3). Grâce à cette double nodulation caulinaire et racinaire, certaines espèces comme *Sesbania rostrata* et *Aeschynomene afraspera* peuvent porter 5 fois plus de nodules que les autres légumineuses et présentent une croissance extrêmement

rapide, jusqu'à 10 cm par jour pour *Sesbania rostrata* en milieu inondée. La découverte de ces différentes propriétés a été le point de départ de l'utilisation des légumineuses aquatiques comme engrais vert dans les rizières tropicales, leur capacité de fixation d'azote étant supérieure à celle des légumineuses à nodules racinaires ou d'*Azolla* utilisées traditionnellement dans les rizières asiatiques.

Des bactéries aux propriétés uniques parmi les rhizobiums connus

L'originalité des légumineuses aquatiques se retrouve aussi dans les propriétés de leurs bactéries symbiotiques. Ainsi, la plupart des bactéries qui forment des nodules fixateurs d'azote à la fois sur les tiges et les racines de *Sesbania rostrata* est aussi capable de fixer l'azote atmosphérique en culture pure lorsque la concentration d'oxygène dans l'air est de 3%. Cette propriété originale parmi les rhizobiums connus nous a conduit à caractériser ces bactéries qui appartiennent à un nouveau genre que nous avons appelé *Azorhizobium* et qui ne contient jusqu'à présent qu'une seule espèce, *Azorhizobium caulinodans* dont la souche type est la souche ORS 571 (Dreyfus *et al.*, 1988). Curieusement, le genre *Azorhizobium* est taxinomiquement éloignés des genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, mais extrêmement proche des bactéries aquatiques appartenant aux genres *Xanthobacter* et *Aquabacter*. Ainsi, les *Azorhizobium* seraient des bactéries aquatiques ayant reçu par conjugaison avec des rhizobiums du sol des gènes de nodulation, et qui seraient devenus spécifiques de la nodulation de tige de la légumineuse aquatique *Sesbania rostrata*. En effet, contrairement aux bactéries du genre *Sinorhizobium* qui forment des nodules effectifs sur les racines de toutes les espèces de *Sesbania*, les *Azorhizobium* ne fixent l'azote qu'avec *Sesbania rostrata*.

Tableau 3. Origine géographique et classement des légumineuses à nodules de tige.

Légumineuses	Origine géographique	Groupe	Références
<i>Aeschynomene</i>			
<i>afraspera</i>	Afrique	I	Alazard 1985
<i>nilotica</i>	Afrique	I	Alazard 1985
<i>aspera</i>	Afrique, Sud Est Asiatique	II	Hagerup 1928,
<i>ciliata</i>	Afrique, Amérique de Sud	II	Alazard 1985
<i>cristata</i>	Afrique, Madagascar	II	Ladha et al 1992
<i>denticulata</i>	Amérique de Sud	II	Eaglesham & Slazay 1983
<i>evenia</i>	Amérique de Sud	II	Barrios & Gonzales 1971
<i>indica</i>	Pantropical	II	Arora 1954, Yatazawa & Yoshida 1979
<i>paniculata</i>	Amérique de Sud	II	von Suessenguth & Beyerle 1936
<i>pratensis</i>	Amérique de Sud	II	Eaglesham & Slazay 1983
<i>rudis</i>	Amérique de Sud	II	Eaglesham & Slazay 1983
<i>scabra</i>	Amérique de Sud	II	Eaglesham & Slazay 1983
<i>schimperi</i>	Afrique	II	Alazard 1985
<i>sensitiva</i>	Pantropical	II	Eaglesham & Slazay 1983, Alazard 1985
<i>tambacoundensis</i>	Afrique	II	Alazard 1985
<i>uniflora</i>	Afrique	II	Ladha et al 1992
<i>villosa</i>	Amérique de Sud	II	Barrios & Gonzales 1971
<i>fluminensis</i>	Amérique de Sud	II	Loureiro et al 1995
<i>virginica</i>	Amérique de Nord	II	Eaglesham and al 1990
<i>crassicaulis</i>	Afrique	III	Alazard 1985
<i>elaphroxylon</i>	Afrique	III	Jenik and Kubikova 1969
<i>pfundii</i>	Afrique	III	Alazard 1985
<i>Sesbania</i>			
<i>rostrata</i>	Afrique	I	Dreyfus et al 1988
<i>punctata</i>	Madagascar	I	Dreyfus unpublished
<i>speciosa</i>	Asie, Afrique	II	Ladha et al 1992
<i>pubescens</i>	Afrique	II	Dreyfus unpublished
<i>javanica</i>	Sud Est Asiatique	III	Ladha et al 1992
<i>Neptunia</i>			
<i>oleacera</i>	Pantropicale	III	Schaede 1940
<i>Discolobium</i>			
<i>pulchellum</i>	Amérique de Sud	III	Loureiro et al 1994

Dans le genre *Aeschynomene* qui comporte un grand nombre d'espèces à nodules de tiges (Tableau 4.3), les bactéries symbiotiques sont aussi atypiques car elles sont pour la plupart capables de synthétiser de la bactériochlorophylle a (Bchl a) et des caroténoïdes (Eaglesham *et al.*, 1990; Lorquin *et al.*, 1993). Ces rhizobiums photosynthétiques appartiennent au genre *Bradyrhizobium* mais, bien qu'aérobies stricts comme tous les rhizobiums, ils sont phylogénétiquement proches de *Rhodopseudomonas palustris*, une bactérie photosynthétique de la famille des *Rhodospirillaceae* capable en anaérobiose d'utiliser le CO₂ comme source de carbone grâce à la photosynthèse. Cependant, chez les *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene*, le rôle de la photosynthèse, en particulier dans la symbiose, reste jusqu'à présent inconnu.

Les espèces sont groupées en fonction de leur capacité de nodulation sur la tige: I, nodulation aérienne possible sur toute la tige; II, nodulation aérienne limitée à la base de la tige; III, nodulation exclusivement sur la partie immergée de la tige.

Les engrais verts dans la riziculture tropicale, potentiel et limitation

L'utilisation des légumineuses comme engrais vert afin d'améliorer les rendements des rizières est une pratique ancienne en Asie. La découverte des légumineuses à nodules de tige comme *Sesbania rostrata* ou *Aeschynomene afraspera* qui ont une capacité de fixation d'azote supérieure à celle des légumineuses utilisées traditionnellement a donc suscité de grands espoirs en Asie. Les nombreux essais menés par l'IRRI ces dernières années aux Philippines et en Inde ont permis de montrer qu'il était agronomiquement possible de doubler les rendements en riz en utilisant ces plantes comme engrais verts (Ladha *et al.*, 1992). Cependant, sauf en Birmanie où plusieurs milliers d'hectares de *Sesbania rostrata* sont plantés chaque année pour le riz, l'utilisation de ces nouveaux engrais verts reste assez limitée dans ce continent que la croissance économique rend de plus en plus consommateur d'engrais chimiques.

Au contraire, en Afrique où la consommation d'engrais chimiques par les paysans est très faible, il n'existe aucune tradition d'utilisation des engrais verts dans la riziculture.

C'est pourquoi, depuis plusieurs années au Sénégal, l'ORSTOM conduit en collaboration avec ENDA tiers-monde, une organisation non gouvernementale (ONG), et l'Université de Dakar, des opérations de développement portant sur l'utilisation de *Sesbania rostrata* comme engrais vert dans la riziculture de Casamance, région de riziculture traditionnelle où les rizières présentent de graves pénuries en azote. Utilisée par les paysans, *Sesbania rostrata* a permis de doubler le rendement du riz en le faisant passer de 1,5 t à 4 t par hectare dans les conditions de riziculture traditionnelle inondée (Ndoye *et al.*, 1996). L'apport de l'engrais vert est équivalent à environ 100 kg d'engrais azoté chimique par hectare. De plus, la teneur en protéines du riz s'accroît de 50% par rapport aux teneurs habituelles. En outre, *Hirschmanniella*, qui est le genre de nématode parasite du riz irrigué le plus important en Afrique pénètre dans les racines de *Sesbania* où il est piégé, car incapable de s'y développer et de s'y reproduire. La multiplication d'*Hirschmanniella* sur le riz peut provoquer des baisses de rendement estimées à 30%. La disparition de ces parasites contribue donc à améliorer le rendement de la culture de riz pratiquée après l'engrais vert.

Cette pratique reste cependant limitée pour l'instant à un petit nombre de villages, et *Sesbania rostrata* devra être mieux intégrée dans les pratiques culturales paysannes pour être utilisée à grande échelle en riziculture africaine. Plusieurs problèmes demeurent, en particulier l'enfouissement de l'engrais vert qui demande un travail supplémentaire, ainsi que l'approvisionnement des paysans en graines. Le traitement de surfaces étendues ne pourra donc se faire que par la mise en place de moyens de mécanisation tractée ou attelée adaptés à l'enfouissement rapide de l'engrais vert dans les rizières. De même, pour répondre à une demande de plus en plus importante de graines de *Sesbania*, il semble nécessaire que certains villages se spécialisent dans la production de semences. Pour diffuser à grande échelle la technique des engrais verts, ENDA tiers monde a donc récemment lancé un programme de développement basé sur un réseau de groupements villageois de Casamance et de Guinée Bissau. Parallèlement, le gouvernement Sénégalais souhaite utiliser les engrais verts dans la riziculture irriguée de la vallée du fleuve Sénégal, une région où les rendements du riz sont en baisse. Alors que l'on assiste à une forte diminution de l'utilisation des engrais azotés devenus trop coûteux, les deux prochaines années devraient donc permettre de savoir si l'engrais vert *Sesbania rostrata* peut être utilisé à grande échelle dans le développement de la riziculture traditionnelle et irriguée en Afrique de l'Ouest.

Des rhizobiums tropicaux directement associés au riz ?

Parvenir à conférer aux céréales, et en particulier à la première d'entre elles, le riz, la capacité de fixer l'azote de l'air représenterait un enjeu considérable pour les pays tropicaux, premiers à souffrir de la pauvreté des sols en éléments minéraux et du coût trop élevé des engrais azotés. Récemment, plusieurs laboratoires ont commencé à étudier les possibilités d'association entre les céréales et les rhizobiums. Ainsi, des recherches initiées en Angleterre (Cocking, 1995) ont montré qu'il était possible d'induire artificiellement des structures méristématiques sur les racines de différentes céréales, blé et riz, après inoculation par la souche ORS571 d'*Azorhizobium* ou par des *Bradyrhizobium* photosynthétiques d'*Aeschynomene*. Ces bactéries peuvent être observées à l'intérieur des cellules situées à la base des racines secondaires. Il est intéressant de noter que ces résultats préliminaires ont tous été obtenus avec des souches isolées par le laboratoire de microbiologie de l'ORSTOM à Dakar à partir de nodules de tige de *Sesbania rostrata* ou d'*Aeschynomene*.

Très récemment au Sénégal, nous avons isolé pour la première fois à partir de racines désinfectées de deux espèces de riz sauvage, l'espèce annuelle *Oriza breviligulata*, et l'espèce pérenne *Oriza longistaminata*, plusieurs souches de rhizobiums qui se sont révélées capables de former des nodules fixateurs d'azote sur *Sesbania rostrata*, *Aeschynomene sensitiva* ou *A. indica*. Ces légumineuses aquatiques à nodules de tige cohabitent avec les riz sauvages dans les mares temporaires de la zone sahélienne. Plusieurs des souches isolées dans les racines de riz sont photosynthétiques. Notre objectif actuel est donc d'étudier de façon approfondie les associations naturelles entre les espèces de riz sauvage et les rhizobiums qui nodulent les légumineuses aquatiques *Sesbania* et *Aeschynomene*, afin de rendre ces associations plus efficaces pour une augmentation de la production rizicole. Pour cela, nous développeront particulièrement les études sur l'écologie des rhizobiums dans la rhizosphère et les racines du riz, la cytologie pour localiser les bactéries dans la racine, la caractérisation taxinomique et symbiotique de ces souches, ainsi que l'effet de ces souches sur la fixation de l'azote et la croissance des riz sauvages et de certaines variétés de riz cultivé.

Références bibliographiques

- Cocking, E. C. 1995. Interactions of rhizobia from legume stem nodules with rice and wheat for symbiotic nitrogen fixation. In : *Biological Nitrogen Fixation Working Group*, pp. 1-5. International Rice Research Institute, Manila, Philippines (1995).
- Dommergues, Y. R., B. L. Dreyfus, H. D. Diem et E. Duhoux. 1985. Fixation de l'azote et agriculture tropicale. *La Recherche* 162: 22-32.
- Dreyfus, B. L., J. L. Garcia et M. Gillis. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans*, gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. bacteriol.* 38: 89-98.
- Eaglesham, A. R. J., Ellis, J.M., Evans, W. R., Fleischman, D. E., Hungria, M., et R. W. F. Hardy., 1990. The first photosynthetic N₂-fixing *Rhizobium*: characteristics. In : *Nitrogen fixation: Achievements and Objectives*, pp. 805-811. Gresshoff, P. M., Roth, L. E., Stacey, G., and Newton, W. L., Eds., Chapman and Hall, New York.
- Ladha, J. K., R. P. Pareek et M. Becker. 1992. Stem-nodulating legume-rhizobium symbiosis and its agronomic use in lowland rice. *Advances in Soil Science*, 20: 147-191.
- Lorquin J., F. Molouba, N. Dupuy, S. Ndiaye, D. Alazard, M. Gillis et B. L. Dreyfus. 1993. Diversity of photosynthetic *Bradyrhizobium* strains from stem nodules of *Aeschynomene* species, p. 683-689. In : R. Palacios, J. Mora, and W. E. Newton (ed.), *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Ndoye, I., M. Becker et B. L. Dreyfus. 1996. *Sesbania rostrata* as green manure for lowland rice in Casamance, Senegal. *Tropical Agriculture*. (Sous presse).
- Serpantié G. et C. Floret. 1994. Un mode de gestion des ressources en Afrique tropicale: la jachère longue. *Regards différenciés sur une pratique en crise*. C. R. Acad. Agric. Fr., 80: 75-83.

5. DE LA CONTRIBUTION DES ARBRES FIXATEURS D'AZOTE A L'AMENAGEMENT DES ECOSYSTEMES TROPICAUX

Yvon DOMMERGUES
Directeur de Recherche Emérite au CNRS

5.1. DE LA FIXATION BIOLOGIQUE D'AZOTE EN GENERAL

La première crise du pétrole de 1970 a été à l'origine d'un développement spectaculaire des recherches sur la fixation biologique de l'azote que nos collègues de l'ICRISAT ont désigné sous le terme de BNF-boom (Biological Nitrogen Fixation boom). Il s'agissait de remplacer les engrais azotés par l'azote fixé biologiquement. Cet effort de recherche a abouti à des découvertes remarquables sur le plan fondamental. Mais peut-on actuellement considérer que ces découvertes ont permis de faire progresser l'agriculture tropicale? La réponse est qu'en dépit de brillantes exceptions, leur impact a été limité et ceci pour deux raisons. Lorsqu'il s'agissait d'exploitations agricoles importantes, il est apparu plus simple de continuer à recourir aux engrais azotés dont le prix s'est maintenu à un niveau raisonnable à la suite de la stabilisation des prix du pétrole. Lorsqu'il s'agissait de petites exploitations familiales pratiquement dénuées de ressources, il ne pouvait être question d'utiliser les engrais azotés en raison de leur inaccessibilité (financière et géographique), en outre la technologie de la fixation biologique de l'azote n'était pas suffisamment attractive ou apparaissait comme trop complexe et difficile à intégrer dans les systèmes culturels traditionnels ou tout simplement trop exigeante en main d'oeuvre.

La situation actuelle présente deux dangers. D'un côté, dans le cas d'applications massives d'engrais azotés, on risque de continuer à polluer l'environnement et plus particulièrement les nappes phréatiques (c'est le cas en particulier dans la Vallée du Nil ou des cultures maraîchères périurbaines). D'un autre côté on assiste à l'aggravation de la paupérisation des petits paysans, ce qui les conduit à s'expatrier vers les villes.

Comment remédier à cet état de fait ? Nous disposons de deux approches complémentaires. La première consiste à appliquer les connaissances déjà existantes; la deuxième à produire de nouveaux savoirs, en d'autres termes à mettre au point de nouvelles technologies mieux adaptées aux problèmes posés.

Application des connaissances actuelles

Il s'agit essentiellement d'utiliser au mieux les plantes fixatrices d'azote en symbiose (légumineuses et plantes actinorhiziennes) telles qu'elles existent actuellement, en éliminant les contraintes environnementales qui les empêchent d'exprimer pleinement leur potentiel fixateur:

- contraintes biologiques, notamment absence dans le sol de micro-organismes symbiotiques compétents et efficaces, présence de pathogènes (par ex. nématodes), compétition par les mauvaises herbes;
- contraintes physiques, par ex. sécheresse, érosion, lessivage;
- contraintes chimiques, par ex. salinité, carence en phosphore.

Bien souvent, on considère que l'apport des micro-organismes symbiotiques (technique connue sous le terme d'inoculation) suffit à lui seul à accroître la productivité des plantes fixatrices d'azote. En fait cette technique doit toujours être conjuguée avec des pratiques agronomiques ayant pour objet de lever autant que possible les contraintes physiques et chimiques du milieu.

Bien que ces mesures soient à notre portée, il est souvent difficile de les faire adopter car on se heurte à certaines réticences notamment celles résultant de méconnaissance des limitations des techniques proposées.

Mise au point de nouvelles technologies

Parallèlement à l'intensification vulgarisation des connaissances actuelles, il est indispensable de poursuivre l'effort de recherche sur les systèmes fixateurs d'azote symbiotiques, non pas seulement en s'intéressant, comme on l'a fait essentiellement jusqu'à présent, à un seul des deux partenaires de la symbiose, à savoir le micro-organisme, mais en explorant plus à fond les possibilités qu'offre l'amélioration des plantes hôtes. Il sera, bien entendu, utile d'accroître les potentialités fixatrices d'azote du végétal, mais il sera aussi nécessaire d'en accroître la tolérance aux principaux facteurs limitants du milieu que les pratiques agronomiques ne sont pas toujours capables de surmonter, notamment sécheresse, acidité du sol, salinité toxicité et excès d'azote minéral. Le développement des méthodes de

biologie moléculaire au cours de la dernière décennie devrait permettre à l'avenir d'obtenir des plantes hôtes dotées de performances symbiotiques supérieures à celles que nous connaissons actuellement.

5.2. DES ARBRES FIXATEURS D'AZOTE EN PARTICULIER

Dans les régions tropicales la végétation ligneuse joue un rôle beaucoup plus important que dans les autres parties du monde. En effet les arbres et arbustes n'y constituent pas seulement la source majeure des matériaux de construction ou de fabrication d'objets à usage domestique. Ils sont aussi la principale source d'énergie calorifique sous forme de bois ou de charbon de bois, aussi bien dans les campagnes que dans les villes. De plus, les arbres et arbustes jouent souvent un rôle irremplaçable en tant que producteurs de fourrage contribuant ainsi largement à l'alimentation du bétail, notamment en saison sèche en assurant la soudure avec la repousse de la végétation prairiale. Enfin, la végétation ligneuse participe souvent puissamment à la protection, ou même à la régénération des sols, permettant ainsi la stabilisation ou même parfois le redressement de la production agricole.

On comprend facilement que, dans ces conditions, toutes les atteintes à cette végétation ligneuse entraînent des conséquences dramatiques pour l'homme. En effet, qu'il s'agisse de formations végétales fermées ou ouvertes (savanes) ou des systèmes mixtes dans lesquels les arbres et arbustes occupent seulement une partie des surfaces cultivées, la vie dépend, en définitive, largement, de l'arbre. Pour reconstituer la végétation arborée, notamment dans les écosystèmes dégradés, il est recommandé de faire appel aux arbres fixateurs d'azote en raison de leur indépendance vis-à-vis de cet élément.

Etat de nos connaissances actuelles sur les arbres fixateurs d'azote

Au cours des 10 dernières années des progrès substantiels ont été accomplis sur le plan fondamental et sur celui des technologies proprement dites.

Sur le plan fondamental, les percées les plus importantes suivantes ont été réalisées dans les domaines suivants: nodulation caulinaire (laboratoire ORSTOM, Dakar et BSFT [CIRAD-ORSTOM]), premières étapes de l'infection chez les arbres (BSFT et divers laboratoires étrangers), transformation d'espèces actinorhiziennes fixatrices d'azote (BSFT), phylogénie des plantes actinorhiziennes (Université Laval, Québec), diversité et phylogénie des microflore rhizobiennes (laboratoire ORSTOM, Dakar) et actinorhiziennes (laboratoire de l'Université de Lyon), physiologie des frankia (BSFT), évaluation de la fixation d'azote *in situ* par la méthode de l'abondance naturelle de l'isotope ¹⁵N (laboratoire de l'Université de Lyon, laboratoire de biochimie isotopique de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris, BSFT).

Sur le plan des technologies deux avancées majeures ont été réalisées dans les domaines suivants: sélection clonale (microbouturage et micropropagation) d'individus ayant de grandes potentialités fixatrices d'azote, par ex. obtention de clones très performants de *Casuarina equisetifolia* et d'*Acacia mangium* (laboratoire ORSTOM, Dakar) et micropropagation; sélection de rhizobiums *Acacia*-compatibles; préparation d'inoculums matriciels de *Rhizobium* et frankia parfaitement fiables et pratiques (BSFT); identification de meilleures combinaisons "clone de l'arbre x souche bactérienne fixatrice d'azote" (BSFT).

Transfert des connaissances au champ

Le transfert des technologies d'inoculation a été réalisé avec succès, mais sur une échelle modeste, dans le Pacifique et en Afrique (Côte d'Ivoire, Cameroun, Egypte). Mais jusqu'à présent les plantations clonales sont restées à l'état de projet.

Des efforts indiscutables, mais encore insuffisants, ont été déployés pour intégrer les arbres fixateurs d'azote dans les différents systèmes d'aménagement:

- Des succès indiscutables ont été obtenus dans le cadre des plantations forestières monospécifiques (*Acacia mangium*). Mais jusqu'à présent on n'est pas parvenu à gérer efficacement les plantations mixtes (arbres fixateurs cultivés en mélange avec des arbres non fixateurs producteurs de bois d'oeuvre).
- En agroforesterie, les résultats ont été variables. Contrairement à ce que l'on espérait le système de culture en couloirs (cultures annuelles entre des haies d'arbres, souvent fixateurs d'azote) n'est applicable que dans certains cas particuliers. Par contre, la jachère forestière semble pouvoir être généralisée à différentes conditions climatiques.
- Les systèmes sylvopastoraux et les plantations d'arbres fourragers sont très prometteurs aussi bien en zone semi-aride que sur les plateaux d'altitude.

- Les arbres fixateurs constituent une composante majeure parfois exclusive des forêts de protection, notamment en tant que brise-vent ou arbres d'ombrage, ou pour la fixation des dunes.
- Quant aux terres dévastées par l'homme (sites miniers, sols salinisés, terres surexploitées, sols pollués) les arbres fixateurs d'azote font merveille pour leur réhabilitation ou leur phytoremédiation, à condition, bien entendu, que soient réduites au minimum les contraintes environnementales limitant l'établissement et le fonctionnement du processus symbiotique.

Objectifs de recherche à long terme

Pour qu'ils soient plus largement intégrés dans les systèmes cultureux les arbres fixateurs devraient posséder deux qualités qui, en plus d'une faible compétitivité (enracinement pivotant), leur manquent trop souvent:

- ils devraient être plus tolérants aux contraintes de l'environnement;
- ils devraient pouvoir procurer, en plus du combustible et du fourrage graines ou fruits comestibles de sorte que les plantations d'arbres présentent un attrait supplémentaire pour le paysan. C'est ainsi qu'on pourrait, en faisant en particulier appel aux méthodes de biologie moléculaire, chercher à augmenter le rendement en graines alimentaires de certains *Acacia* (par ex. *A. aneura*) ou conférer l'aptitude à fixer l'azote à des espèces non fixatrices comme *Parkia biglobosa* (Légumineuse Mimosacée) productrice de fruits très appréciés donnant lieu à un commerce local important.

5.3. CONCLUSION

Même avec leurs imperfections (notamment concurrence vis à vis des autres plantes) les arbres fixateurs d'azote constituent non seulement d'incalculables sources de produits et de services mais ils peuvent participer avec beaucoup plus d'efficacité que les plantes annuelles à la restauration, au maintien ou même à l'accroissement de la fertilité des sols. Dans l'immédiat, il apparaît donc indispensable de développer leur intégration dans les différents types d'écosystèmes tropicaux tout en restant conscient des limitations à leur emploi. A l'avenir, il sera nécessaire de chercher à améliorer leurs performances en exploitant leur diversité génétique, qui est considérable.

6. SYMBIOSES FIXATRICES D' N_2 DANS DES ECOSYSTEMES DEGRADEES DU SENEGAL: APPLICATION AUX LEGUMINEUSES ARBORESCENTES ET AUX CASUARINACEES.

Bassirou SOUGOUFARA
MEPN/ORSTOM, BP 1386, Dakar, Sénégal

6.1. INTRODUCTION

Les arbres fixateurs d'azote, qu'il s'agisse de légumineuses (la bactérie fixatrice d'azote associée est un *Rhizobium*) ou de plantes actinorhiziennes (la bactérie associée est un actinomycète, *Frankia*), constituent à priori d'excellents candidats pour les reboisements, puisqu'ils peuvent pousser exclusivement aux dépens de l'azote de l'air qu'ils fixent grâce à leurs nodosités. En étant restitué en partie aux sols avec les litières (feuilles et racines) l'azote fixé contribue en outre à la restauration de la fertilité des écosystèmes. Deux exemples illustrant ce fait concernent d'une part l'utilisation de *Acacia mangium* et de *Acacia auriculiformis* comme nouvelles espèces constitutives des jachères forestières de Basse, Moyenne et Haute Casamance; d'autre part l'utilisation de *Casuarina equisetifolia*, en raison de l'intérêt qu'il représente pour la fixation des dunes maritimes sur le littoral nord sénégalais.

Cette note fait le point des résultats obtenus avec *Casuarina equisetifolia* dans la station de Notto, sur le littoral nord sénégalais et en milieu paysan en Casamance où le vif intérêt des groupements paysans pour *A. mangium* et *A. auriculiformis* devrait nous encourager à poursuivre les essais. Nous n'avons observé les effets de l'inoculation sur le terrain que sur une durée de trois ans, ce qui est relativement court pour le cas des végétaux pérennes.

6.2. UTILISATION DE *A. MANGIUM* ET *A. AURICULIFORMIS* DANS LES JACHERES HERBACEES EN CASAMANCE

Par son climat soudano-guinéen (pluviométrie moyenne entre 1000 et 1600 mm par an) la Casamance composée des régions de Ziguinchor et de Kolda, est une zone à fort potentiel agricole. Les rendements des cultures, bien que relativement faibles, ont été maintenus constants grâce à la pratique de la jachère herbacée ou forestière. Lorsqu'il a fallu accroître la production alimentaire de cette zone pour répondre aux exigences d'une croissance démographique importante, les surfaces des terres cultivées se sont étendues au détriment des forêts (figure 1) et, parallèlement les temps de jachères se sont raccourcis. Les terres ainsi exploitées dans un système agricole à faible intrant ont subi un processus de dégradation, baisse de fertilité, augmentation de la salinité (figure 2), érosion, qui ont abouti à un fléchissement rapide de leur productivité, accéléré par les aléas climatiques (la sécheresse, notamment).

Dans un tel système, les résultats montrent à terme, un épuisement des sols, une acidification et une baisse des rendements (Pieri, 1989). La perte de la fertilité d'un sol peut être compensée par des apports d'engrais minéraux et de matière organique ou par la jachère. La pression foncière actuelle dans la zone soudano-guinéenne, où la culture pluviale est pratiquée, ne permet plus une restauration correcte de la fertilité par le système de la jachère herbacée. Dans le cadre d'une agriculture à faible revenu d'intrants, comme c'est le cas au Sénégal, il faut envisager une solution permettant de raccourcir et/ou de rendre productif le temps pendant lequel la terre est laissée au repos.

Pour cela, la Direction des Eaux, Forêts, Chasses et de la Conservation des Sols et le laboratoire de Microbiologie des Sols du Centre ORSTOM de Dakar se sont associés pour mettre au point et tester un itinéraire technique fondé sur le remplacement de la jachère herbacée par une jachère forestière à base de *A. mangium* et *A. auriculiformis* en vue de maintenir et/ou de reconstituer rapidement la fertilité des sols en Casamance.

De ce point de vue, des essais ont été mis en place afin de tester l'effet de l'inoculation par des micro-organismes sélectionnées sur la fixation d'azote de ces arbres et la capacité de ces espèces à relever ou à maintenir le niveau de fertilité du sol. Ce chapitre fait donc le point sur les premiers résultats obtenus 8, 20, et 30 mois après la mise en place des arbres.

Présentation de *A. mangium* et de *A. auriculiformis*

Acacia mangium possède une distribution très limitée dans les zones côtières tropicales du Nord Queensland en Australie, dans les provinces de l'Ouest en Papouasie Nouvelle Guinée et dans les provinces d'Irian Jaya et de Maluku en Indonésie. *Acacia mangium* a été introduit avec succès sur des grandes surfaces principalement dans la province du Sabah, en Malaisie où la plupart des plantations ont été mises en place sur d'anciennes zones de cultures très appauvries et colonisées par *Imperata cylindrica*. D'autres introductions couvrant des étendues plus limitées ont été réalisées aux Philippines, en Indonésie, en Afrique tropicale humide (Galiana, 1991) et tout récemment, en Casamance. La croissance rapide de *Acacia mangium* et son potentiel fixateur d'azote élevé en font une espèce candidate pour l'amélioration du système de la jachère.

Acacia auriculiformis est aussi un arbre fixateur originaire de la zone "Australie, Papouasie Nouvelle Guinée, Indonésie" (Turnbull, 1986). Cette espèce pousse bien en zone tropicale humide (1000 à 2000 mm de pluie par an) sur des sols très variés : peu fertiles, argileux, sableux, salés ou temporairement inondés. Elle a été utilisée avec succès dans le Sud-Est asiatique (Turnbull, 1986) et au Zaïre (Khasai, 1993) pour la production de bois de feu ; en effet, sa densité de 500 kg/m³ et sa valeur calorifique de 4800 à 4900 kcal/kg en font un excellent bois de feu et de charbon. Cette espèce est également plantée pour la stabilisation des zones littorales, la revégétalisation des sols miniers et la lutte contre l'érosion. Au Sénégal, *Acacia auriculiformis* a été introduit, à titre expérimental, avec succès.

Matériels et Méthodes

Matériel végétal utilisé. Les graines d'*Acacia mangium* et d'*Acacia auriculiformis* ont été fournies par le laboratoire de graines du CIRAD-Forêt (45 bis, Avenue de la Belle Gabrielle) respectivement sous les numéros 92/9608N et 88/8125N.

Micro-organismes utilisés. La souche de *Bradyrhizobium* sp. ORS 800 a été fournie par le laboratoire de Microbiologie des sols de l'ORSTOM à Dakar, Sénégal et les souches Aust 13 C et Aust 11C par le BSFT à Nogent-sur-Marne, France. Les souches ORS 800 et Aust 13C ont été utilisées pour l'inoculation de *Acacia mangium* et la souche Aust 11 C pour celle de *Acacia auriculiformis*. L'inoculum de *Pisolithus* sp., utilisé avec *Acacia auriculiformis* a été fourni par le laboratoire de Microbiologie de l'ISRA/DRPF à Dakar, Sénégal.

La production des plants. Les plants ont été produits dans des pépinières villageoises. Les graines ont été scarifiées à l'eau bouillante puis laissées refroidir dans l'eau pendant une nuit. Au semis, une moitié des plants a été inoculée par 2 ml d'une culture de *Bradyrhizobium* sp. âgée d'une semaine et contenant 10⁸ bactéries par ml. Une semaine après la levée, la moitié des plants d'*Acacia auriculiformis* déjà inoculés par *Bradyrhizobium* sp., ainsi que la moitié des plants non inoculés ont reçu une suspension de spores de *Pisolithus* sp. soit environ 5.10⁴ spores par plants.

Mise en place des essais au champ. Les jeunes plants âgés de deux mois ont été transplantés à Oukout et à Sédhiou en 1993, à Kassankil, Ngoki, Tabawale et Saré Dramé en 1994 (figure 3) suivant les dispositifs factoriels décrits dans le tableau 1.

Tableau 6.1 : Description des dispositifs factoriels dans les différents sites

Sites	Facteur I Traitement	Facteur II Blocs	Répétitions
Kassankil	(témoin, inoculé)	(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10)	20
Oukout et Sédhiou	Témoin, inoculé	(1,2)	50
Ngoki	Témoin, mycorhizes, Rhizobium mycorhizes +Rhizobium)	(1,2,3,4)	105
Saré Dramé	Témoin, inoculé	(1,2,3,4)	77
Tabawale	Témoin, inoculé	(1,2)	77

Paramètres mesurés et variables calculées. La hauteur (HT) en cm, le taux de survie (TS) des plants en pour-cent et la teneur en azote en pour-cent (N%) des feuilles ont été déterminés 8, 20 et 30 mois après la plantation (6.2 a,b,c).

Résultats et discussion

Tableau 6.2 a,b,c. Effet de l'inoculation par (1) *Bradyrhizobium* sp. Aust 13C, Aust 11C et ORS 800 et (2) *Pisolithus* sp. sur la taille, le pourcentage d'azote dans les feuilles et le taux de survie d'*Acacia auriculiformis* et d'*Acacia mangium*.

a. 8 mois après plantation (plants âgés de 2 mois).

Sites/souches	Hauteur		N%		Taux de survie (%)	
	NI*	I	NI	I	NI	I
<i>Acacia auriculiformis</i> **						
Ngoki/Aust 11C	70a (71a)	107a (107a)	1,79a (2,01b)	2,17c (2,65d)	88a (85a)	94a (94a)
Saré Dramé/Aust 11C	68a (73a)	113b (101b)	1,4a (1,95 b)	2,17c (2,65d)	99a (100a)	98a (100b)
<i>Acacia mangium</i>						
Kassankil/Aust 13C	110a	163b	2,07a	2,76b	45a	83b
Oukout/ORS.800	21a	37b	1,34a	1,85b	49a	68b
Sédhiou/ORS.800	50a	122b	1,33a	2,02b	64a	92b
Tabawale/Aust 13C	62a	107b	2,1a	2,44b	95a	97a

b. 20 mois après plantation

Sites/souches	Hauteur		N%		Taux de survie	
	NI*	I	NI	I	NI	I
<i>Acacia auriculiformis</i> **						
Ngoki/Aust 11C	150a (160a)	320b (319b)	1,82a (1,92b)	2,10c (2,50d)	79a (80a)	88a (90a)
Saré Dramé/Aust 11C	156a (162a)	330b (327b)	1,77a (2,00b)	2,05c (2,20d)	83a (90a)	80a (93a)
<i>Acacia mangium</i>						
Kassankil/Aust 13C	179a	369b	1,75a	2,50b	43a	80b
Oukout/ORS.800	116a	166b	1,86a	2,19b	60a	82b
Sédhiou/ORS.800	184a	337b	1,52a	2,00b	92a	92b
Tabawale/Aust 13C	105a	173b	1,60a	1,98b	73a	80a

c. 30 mois après plantation

Sites/souches	Hauteur		N%		Taux de survie	
	NI*	I	NI	I	NI	I
<i>Acacia auriculiformis</i> **						
Ngoki/Aust 11C	280a (285a)	602b (685b)	1,70a (1,98a)	2,09c (2,31d)	79a (80a)	88a (90a)
Saré Dramé/Aust 11C	290a (292a)	592b (623b)	1,69a (1,92 a)	2,04c (2,35d)	82a (90a)	80a (93b)
<i>Acacia mangium</i>						
Kassankil/Aust 13C	307a	874b	1,90a	2,12b	43a	80b
Oukout/ORS.800	278a	620b	1,42a	1,97b	60a	82b
Sédhiou/ORS.800	310a	789b	1,65a	2,07b	92a	92b
Tabawale/Aust 13C	ND	ND	ND	ND	ND	ND

* : NI : Non inoculé ; I : inoculé

** : les chiffres entre parenthèse correspondent à l'inoculation par *Pisolithus* sp.

Acacia mangium

Le fort potentiel de croissance de cette espèce est illustré par les résultats obtenus à Sédhiou et à Kassankil. Dans le premier site, les plants inoculés mesurent en moyenne 122 cm, 337 cm et 789 cm respectivement après 8, 20 et 30 mois et dans le second cas, 163 cm, 369 cm et 874 cm respectivement après 8, 20 et 30 mois. Dans tous les essais, la croissance de cette espèce a été supérieure à celle d'*Eucalyptus camaldulensis* considéré comme espèce à croissance rapide introduite simultanément dans des parcelles adjacentes. On observe pour *Acacia mangium* un effet bénéfique de l'inoculation aussi bien sur la hauteur des plants que sur la teneur en azote des feuilles et sur le taux de survie, sauf à Tabawale où ce dernier paramètre a été spectaculaire aussi bien pour les plants témoins (95%) que pour les plants inoculés (97%) jusqu'alors âgés de 8 mois.

En outre, dans l'essai mis en place à Oukout, sur un sol sableux très pauvre en matière organique, nous avons constaté chez *Acacia mangium* un coefficient de variation très élevé sur la hauteur des plants (139%). Cette variation est probablement due à un effet "microsite" car les meilleures croissances ont été observées aux emplacements antérieurement occupés par les palmiers à huile. Il semblerait donc qu'un apport de matière organique sous forme de compost ou de terreau dans le trou de plantation permettrait d'améliorer la croissance initiale des plants mis en place et d'obtenir des plantations de hauteur relativement homogène.

Acacia auriculiformis

Dans les deux sites où *Acacia auriculiformis* a été introduit, les taux de survie ont été satisfaisants (> 79%). L'inoculation par *Bradyrhizobium* sp. Aust 11C augmente significativement la hauteur des plants ainsi que la teneur en azote des feuilles. L'inoculation par *Pisolithus* sp. n'a pas affecté de façon significative la croissance en hauteur des plants. Par contre la teneur en azote des feuilles a été augmenté de façon significative par la mycorhization. De même, comparée à l'inoculation par la souche de *Bradyrhizobium* sp. Aust 11C seule, la double inoculation *Bradyrhizobium* sp. Aust 11C + *Pisolithus* sp. n'améliore pas la croissance en hauteur, mais par contre améliore significativement la teneur en azote des feuilles.

Conclusion

Les résultats partiels de ces essais montrent une croissance exceptionnelle pour *A. auriculiformis* et *A. mangium*. L'inoculation de ces deux espèces par *Bradyrhizobium* sp. permet une amélioration significative de la croissance en hauteur des arbres, de la teneur en azote des feuilles et de leur survie. L'amplitude de cette amélioration est variable d'un site à l'autre. L'inoculation d'*Acacia auriculiformis* par *Pisolithus* sp. permet une amélioration significative de la teneur en azote des feuilles, mais pas de la croissance en hauteur.

6.2. UTILISATION DE CAUSUARINA EQUISETIFOLIA POUR LA FIXATION DES DUNES MARITIMES

Les Casuarinacées forment un groupe de 90 espèces d'arbres et d'arbrisseaux s'étendant de l'Australie aux Iles du Pacifique et au sud-est de l'Asie. En général, ce sont des arbres à croissance rapide ; de nombreuses espèces sont connues peut-être fixatrices d'azote car elles portent des nodules résultant de l'infection par un actinomycète fixateur d'azote dénommé *Frankia*.

Parmi les Casuarinacées, nos investigations ont porté sur *Casuarina equisetifolia* en raison de ses potentialités d'adaptation à des conditions environnementales difficiles.

En effet, la forte instabilité des ensembles dunaires et les risques d'ensevelissement des Niayes qui en découlent appelaient à des actions de protection. C'est ainsi que l'intervention du service forestier a été décidée dès 1948, l'objectif visé étant le freinage de la migration frontale des systèmes dunaires et la stabilisation de leur partie interne par la création de boisements littoraux avec *C. equisetifolia*. L'opération débuta en 1950 par le classement d'une bande littorale de 200 m de large entre Malika et Kayar et dès 1959 la presqu'île du Cap-Vert comptait sur 25 km de côté une bande boisée de 435 ha.

Résultats des travaux préliminaires de stabilisation des dunes.

Il faut distinguer 3 cas :

(i) Stabilisation réussie à l'origine et maintenue: C'est le cas de certains périmètres dans la région méridionale des Niayes (Yoff, Kayar par exemple) où *C. equisetifolia* a atteint un développement optimal avec une densité de 2500 pieds/ha.

(ii) Stabilisation réussie à l'origine mais vouée à l'échec sous l'effet des pressions anthropiques. Il s'agit par exemple des périmètres voisinant Pikine et Malika qui ont été fortement dégradés par l'homme.

(iii) Stabilisation défectueuse dès l'origine. Les arbres n'ont pas réussi à s'installer pour différentes raisons: déchaussement ou envahissement par le sable; croissance irrégulière des plantes de *C. equisetifolia*

Origine de l'irrégularité des résultats de reforestation

En dehors du problème de l'envahissement des jeunes plantations par le sable, on a constaté en 1976 que l'irrégularité de croissance de *C. equisetifolia* était due à une nodulation défectueuse ou même absente des arbres.

On a donc décidé d'induire la nodulation systématique de *C. equisetifolia* en inoculant les jeunes plants au niveau des pépinières avec des suspensions des nodules broyés, (Andeke et Dommergues), ce qui représente non seulement un risque de dissémination de pathogènes des racines (par ex. *Pseudomonas solanacearum*), mais aussi celui de multiplier les souches de *Frankia* inefficaces.

Tableau 6.3 : Potentiel fixateur de N₂ et fixation de N₂ in situ de *C. equisetifolia* dans différents sols

N° des expériences	Méthode d'estimation (a)	Age) (ans	Quantité de N ₂ fixé	
			g arbre ⁻¹	g arbre ⁻¹ .an ⁻¹
<u>Potentiel fixateur de N₂</u>				
(PF (c))				
1 - Bel-Air	TND	2	84,8	42,4
	AV	2	84,4	42,2
<u>Fixation réelle de N₂(FR)</u>				
2 - Notto	TND	3	13,4	4,5
3 - Notto	TND	3	18,0	6,0
	NA	3	13,0	4,3
4 - Malika	Bal.	13	377,0 (d)	29,0

(a) Méthode d'estimation de la fixation de N₂ : TND, méthode par la différence ; AV, méthode de la valeur A, NA, méthode de l'abondance isotopique naturelle Bal,

(b) Références : (1) Sougoufara *et al.*, (1990) ; (2) Sougoufara *et al.*, (1989) ; (3) Mariotti *et al.*, (1992) ; (4) Dommergues (1963).

(c) Expérience effectuée dans des cuves en ciment de 1m³ enfoncés dans le sol et remplies de sol de Cambérène homogénéisé et stérilisé au bromure de méthyle

(d) Plantation de *C. equisetifolia* de 2000 arbres ha⁻¹

Inoculation avec des souches de *Frankia* sélectionnées et efficaces

Au cours de ces dernières années, des progrès considérables ont été réalisés dans le développement de nouvelles technologies permettant l'amélioration de la productivité des arbres fixateurs d'azote en milieu tropicaux et subtropicaux.

Ces nouvelles technologies consistent essentiellement à optimiser le fonctionnement des symbioses en agissant à la fois sur le partenaire bactérien et sur le partenaire végétal (Sougoufara, 1990).

Les résultats les plus spectaculaires concernent, entre autres, la sélection de souches à hautes performances (fixation biologique de l'azote, tolérance à la salinité), la maîtrise de la culture en masse du *Frankia* et la mise au point de nouveaux conditionnements pour les inoculums (inoculums matriciels) (Diem *et al.* 1988).

En outre, avant d'adopter définitivement une espèce fixatrice d'azote donnée, il importe de bien connaître son potentiel fixateur d'azote. En effet, l'évaluation de la quantité d'azote fixé, qu'il s'agisse de "potentiel fixateur de N₂" ou de "fixation réelle de N₂" doit être une des préoccupations majeures aux différents niveaux d'investigations (moléculaires, cellulaire, plante entière ou écosystème) puisqu'en définitive c'est seulement cette évaluation qui permet d'apprécier l'efficacité des systèmes considérés et d'optimiser leur utilisation.

C'est ainsi que nous avons mis en place en juillet 1994 à Notto, au Sénégal, un essai au champ avec comme objectifs (1) de déterminer la réponse de *C. equisetifolia* à l'inoculation avec une souche de *Frankia* incluse dans l'alginate et (2) d'estimer le pourcentage d'azote fixé par la méthode de différence et le traçage isotopique naturel. Les résultats concernant l'inoculation ont montré l'efficacité du nouveau type d'inoculum utilisé (Sougoufara *et al.*, 1989). Les résultats concernant l'estimation du pourcentage d'azote fixé ont également fait l'objet d'une publication (Mariotti *et al.*, 1992) (Tableau 6.3).

6.3 CONCLUSION

La fixation biologique de l'azote est liée à la présence de souches spécifiques du micro-organisme (*Rhizobium* ou *Frankia*) et l'inoculation est nécessaire lorsque les micro-organismes sont absents dans le sol. Elle assure une bonne installation et un développement satisfaisant des arbres.

Etant donné que nous disposons déjà des systèmes dont le "potentiel fixateur de N₂" est naturellement satisfaisant, les recherches visant à l'accroissement de la "fixation réelle de N₂" devront être fondée d'une part sur l'amélioration de la tolérance des plantes-hôtes aux contraintes du milieu (aridité, salinité) et d'autre part sur l'obtention de souches symbiotiques capables de renforcer cette tolérance des plantes-hôtes. Les investigations dans ce domaine requièrent un renforcement de la collaboration entre les végétalistes et les microbiologistes oeuvrant en tant qu'écologistes, physiologistes et généticiens.

Compte tenu de la nécessité de perfectionner les pratiques culturales il ne faudra pas négliger non plus le concours des pédologues agronomes et forestiers.

Références Bibliographiques

- Diem, H.G., Duhoux, E., Simonet, P. et Dommergues, Y.R. (1988). Actinorhizal symbiosis biotechnology : the present and the future . In 8th International Biotechnology Symposium. Proc. Vol. II. Eds G. Durant, L. Bobichon and J Florent. pp. 987-995. Société Française de Microbiologie.
- Galiana, A. (1991). La symbiose fixatrice d'azote chez *Acacia mangium-Rhizobium*. Centre Technique Forestyier, Nogent-sur-Marne, France, 246p.
- Khasai, P.D. (1993). Acid scarification and hot water soaking of *Racosperma auriculiformis* seeds. the Forestry Chronicle, 69: 331-334.
- Mariotti, A., Sougoufara, B. & Dommergues, Y.R. (1992). Estimation de la fixation d'azote atmosphérique par le traçage isotopique naturel dans une plantation de *Casuarina equisetifolia* (Forst) Soil Biol Biochem 24: 647-653.
- Pieri, C. (1989). Fertilité des terres, Eds.: Ministère de la Coopération et CIRAD-IRAT, Paris, 444 p.
- Sougoufara, B., Diem, H.G. et Dommergues, Y.R. (1989). Response of field grow *Casuarina equisetifolia* to inoculation with *Frankia* strain ORS 021001 entrapped in alginate beads. Plant and Soil. 118: 133-137.
- Sougoufara, B. (1990). La fixation de N₂ par les Casuarinas : Amélioration par sélection clonale et quantification par différentes méthodes : Thèse de Doctorat de l'Université de Nancy I ,190 p.