

**ACTA
BOTANICA
GALLICA**

*A Journal for selected
Botanical Papers*

VOL. 143 N° 7
1996



LES PLANTES ACTINORHIZIENNES

BULLETIN DE LA
SOCIÉTÉ BOTANIQUE
DE FRANCE

AVIS AUX AUTEURS

Le *Bulletin de la Société botanique de France*, *Acta botanica Gallica*, comporte 4 fascicules par an, regroupant tous les aspects de la Botanique (Systématique, Morphologie, Cytologie, Génétique, Écologie, Physiologie, Pathologie, Biotechnologie, etc.). Les communications peuvent être rédigées en français ou en anglais. Cependant, il est toujours possible de publier dans une autre langue officielle de la CEE, après entente avec le Rédacteur.

Tout article doit présenter, dans l'ordre, sur la première page : titre, auteur(s), adresse(s), résumé de 10 lignes au plus en français et « summary » correspondant (et, éventuellement, une « abridged version » faisant appel aux figures et aux références bibliographiques), key words avec 5 mots au maximum. Ensuite, le texte doit respecter les formes habituelles de présentation (Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats, Discussion, Conclusion, Bibliographie) en explicitant les abréviations. Puis, viennent les illustrations (Fig., Tabl., Pl.) avec la traduction en anglais des légendes, et, enfin, sur une feuille séparée : auteur(s) et titre de l'article en anglais.

Dans le texte, les renvois à la bibliographie sont faits avec le nom des auteurs et l'année de la publication, en adoptant la disposition suivante lorsqu'il y a plus de 2 auteurs : Dubois *et al.*, 1988. Lorsque plusieurs articles d'un même auteur parus dans la même année sont cités, l'année doit être suivie de *a*, *b*, *c*, etc.

Dans la bibliographie, les références des auteurs cités dans le texte sont placées par ordre alphabétique, en utilisant les codifications usuelles des périodiques, et disposées selon les modèles ci-dessous :

Dubois J., J. Droujininski & J. Vasseur, 1988. - Croissance et potentialités organogènes de suspensions cellulaires de *Cichorium intybus* L. var. Witloof. *Bull. Soc. bot. Fr., Acta bot. Gallica*, **135** (4/5), 311-322.

Mathew B., 1980. - *Crocus*. In : *Flora Europaea*. Tutin *et al.*, Cambridge, **5**, 92-99.

Les dessins doivent être présentés sous forme d'originaux au format de 16 × 21,5 cm. Il en sera de même des tableaux et graphiques. Les clichés photographiques destinés à être reproduits par simili pourront être réduits à l'impression : les auteurs doivent indiquer l'échelle sur les clichés et le coefficient de réduction désiré. Les clichés seront, dans la mesure du possible, regroupés en planches au format maximal 12,8 × 18 cm.

Les textes, en **double exemplaire**, doivent être dactylographiés en double interligne, recto seulement, et avec une marge gauche de 5 cm. Il est vivement recommandé de les accompagner du support magnétique (**disquette 3,5 pouces, de préférence au format Mac Intosh, logiciels Word 4 et 5**). Le Rédacteur fera connaître à l'auteur l'avis du Comité de lecture sur l'insertion, les modifications souhaitées ou le rejet du manuscrit.

Les auteurs reçoivent une épreuve en placards de leurs communications. Les corrections doivent être retournées dans le délai maximum de dix jours au Rédacteur, faute de quoi la correction sera faite d'office par le Secrétariat.

La Société botanique de France offre aux auteurs, **membres** de la Société, l'impression de 12 pages annuelles dont 2 pages de clichés (quel que soit le nombre d'auteurs d'un article) et, pour les **non-membres**, l'impression gratuite de 6 pages dont 1 page de clichés. Pour chaque article, il est envoyé 25 tirés-à-part gratuits aux membres. Les illustrations, les pages et les tirés-à-part supplémentaires sont aux frais des auteurs au tarif en vigueur de l'année de publication et l'auteur devra fournir un bon de commande au moment du retour des épreuves.

Toute correspondance concernant la publication doit parvenir, sans frais, à la :

Société botanique de France
rue du Professeur-Laguesse
BP 83
F-59006 Lille Cedex

ACTA BOTANICA GALLICA

BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ BOTANIQUE DE FRANCE

VOLUME 143 1996 (7)

SOMMAIRE

C. ROUVIER, J. SCHWENCKE, Y. PRIN, E. NAVARRO, P. BENOIST, A. MÜLLER, M. GIRGIS, S. SELIM, P. REDDELL, D. GAUTHIER, G. RINAUDO, P. NORMAND et P. SIMONET.- Biologie et diversité génétique des souches de <i>Frankia</i> associées aux Casuarinacées -----	567
H.G. DIEM.- Les mycorhizes des plantes actinorhiziennes -----	581
E. DUHOUX, D. DIOUF, H. GHERBI, C. FRANCHE, J. AHÉE et D. BOGUSZ.- Le nodule actinorhizien -----	593
H.Y. WANG et A.M. BERRY.- Plant regeneration from leaf segments of <i>Datisca glomerata</i> -----	609
C. GUAN, D.J. WOLTERS, C. VAN DIJK, A.D.L. AKKERMANS, A. VAN KAMMEN, T. BISSELING et K. PAWLOWSKI.- Gene expression in ineffective actinorhizal nodules of <i>Alnus glutinosa</i> --	613
D. BOGUSZ, C. FRANCHE, H. GHERBI, D. DIOUF, A. NASSAR, C. GOBÉ, F. AUGUY, J. AHÉE et E. DUHOUX.- La symbiose <i>Casuarinaceae-Frankia</i> : approche moléculaire du rôle de la plante-hôte -----	621
A. ROY et J. BOUSQUET.- The evolution of the actinorhizal symbiosis through phylogenetic analysis of host-plants -----	635
A. MOIROUD.- Diversité et écologie des plantes actinorhiziennes -----	651
Y.R. DOMMERGUES.- La fixation d'azote chez les plantes actinorhiziennes et ses applications	663
A.R. MANZANARES, E. GARCÍA MOYA et M.F. PASSINI.- <i>Pinus cembroides s.l.</i> y <i>Pinus johannis</i> del Altiplano Mexicano : una síntesis -----	681
Table alphabétique des matières -----	695

Publié et diffusé avec l'aide de la Délégation à la Langue française

Les sommaires d'*Acta botanica Gallica* sont reproduits dans les *Current Contents*, indexés dans les différentes publications de l'*Institute of Scientific Informations* (Philadelphie, USA), dans les *Abstracts* et *Index* de *Bioscience Information Service* of Biological Abstracts (Philadelphie, USA), dans le *BioPascal-Folio* du C.N.R.S. (Paris), ainsi que dans *Geo Abstracts* et *Geobase*.

ACTA BOTANICA GALLICA 143 (7) 1996

CONTENTS

C. ROUVIER, J. SCHWENCKE, Y. PRIN, E. NAVARRO, P. BENOIST, A. MÜLLER, M. GIRGIS, S. SELIM, P. REDDELL, D. GAUTHIER, G. RINAUDO, P. NORMAND and P. SIMONET.- Biology and genetic diversity of <i>Frankia</i> strains associated to Casuarinas	567
H.G. DIEM.- Mycorrhizae of actinorhizal plants	581
E. DUHOUX, D. DIOUF, H. GHERBI, C. FRANCHE, J. AHÉE and D. BOGUSZ.- The actinorhizal nodule	593
H.Y. WANG and A.M. BERRY.- Plant regeneration from leaf segments of <i>Datisca glomerata</i>	609
C. GUAN, D.J. WOLTERS, C. VAN DIJK, A.D.L. AKKERMANS, A. VAN KAMMEN, T. BISSELING and K. PAWLOWSKI.- Gene expression in ineffective actinorhizal nodules of <i>Alnus glutinosa</i>	613
D. BOGUSZ, C. FRANCHE, H. GHERBI, D. DIOUF, A. NASSAR, C. GOBÉ, F. AUGUY, J. AHÉE and E. DUHOUX.- <i>Casuarinaceae-Frankia</i> symbiosis : molecular study of the host-plant	621
A. ROY and J. BOUSQUET.- The evolution of the actinorhizal symbiosis through phylogenetic analysis of host-plants	635
A. MOIROUD.- Diversity and ecology of actinorhizal plants	651
Y.R. DOMMERGUES.- Nitrogen fixation in actinorhizal plants. Applications	663
A.R. MANZANARES, E. GARCÍA MOYA and M.F. PASSINI.- <i>Pinus cembroides s.l.</i> y <i>Pinus</i> <i>johannis</i> del Altiplano Mexicano : una síntesis	681
Table of contents for 1996	695

Avant-propos

Les associations symbiotiques plantes-microorganismes fixatrices d'azote ont été et continuent à être largement étudiées dans le groupe des Légumineuses. Cependant, de nombreuses autres familles de plantes, constituent également des associations fixatrices d'azote.

On connaît depuis plus d'un siècle et demi les nodules fixateurs de ces plantes qui possèdent comme microsymbiote, un actinomycète, du genre *Frankia*. Ce n'est qu'à partir des années 1980 que Fessenden, en proposant l'appellation d'actinorhizes par analogie avec le terme des mycorhizes, a donné à ces nodules leur titre de noblesse. Par extension, les plantes possédant des actinorhizes sont appelées plantes actinorhiziennes.

Depuis 1979, où il a été possible d'isoler et de cultiver *Frankia* en conditions aseptiques, les travaux réalisés chez les plantes actinorhiziennes ont fait des avancées remarquables, ce qui permet de faire, à présent, les comparaisons entre ces deux grands groupes de plantes fixatrices d'azote. Ce regain d'intérêt est essentiellement lié à la concentration des travaux sur quelques plantes modèles et aux méthodologies offertes par la biologie moléculaire. Considérée comme une symbiose plus primitive que celle des Légumineuses, la symbiose actinorhizienne constitue un modèle d'étude cellulaire et moléculaire de choix pour disséquer les mécanismes intimes de son fonctionnement. Par ailleurs, les plantes actinorhiziennes étant des espèces pionnières et améliorantes pérennes, constituent une étape importante de la dynamique de la revégétalisation de sites très variés. Ainsi, la progression des connaissances s'est faite dans des domaines aussi variés que la physiologie, la biologie et l'écologie.

Nous avons souhaité que les interventions de cette journée d'étude donnent au lecteur un aperçu général des progrès réalisés par les différentes équipes travaillant dans ce domaine. Nous avons donc choisi de regrouper les interventions présentées, sous forme d'exposés généraux, autour de quatre thèmes : les microsymbiotes des plantes actinorhiziennes, le développement et la physiologie du nodule, l'analyse moléculaire de la symbiose, l'écologie et les applications des plantes actinorhiziennes.

Nous sommes reconnaissants à la Société botanique de France et à la Société française de Physiologie végétale d'avoir bien voulu parrainer cette réunion. Nous tenons aussi à remercier, pour leur soutien financier, l'ORSTOM, le CIRAD-Forêt et l'Université Paris 7-Denis Diderot.

Foreword

Plant-microorganism symbiosis for N_2 -fixation have been and are still extensively studied in the case of *Leguminosae*. By contrast, in spite of the fact that they have been known for more than a century and a half, N_2 -fixing symbiosis involving other plant families, especially symbiosis resulting from the association of the host plant with a N_2 -fixing actinomycete *Frankia* have gained their title of nobility only in 1979 when R. J. Fessenden granted the N_2 -fixing nodules the name of actinorhizas by analogy with the term of mycorrhizas (Meeting on actinomycete-nodulated plants at Harvard Forest, Petersham).

Investigations began to flourish after the first successful isolation in pure culture of *Frankia* by Torrey's group in 1978.

The current renewal of interest in the actinorhizal symbiosis is essentially due (1) to spectacular advances in the field of molecular biology techniques and (2) the growing recognition of the exceptional potential of actinorhizal plants in the management of ecosystems. Because the actinorhizal symbiosis is generally considered as more primitive than the legume-rhizobium symbiosis, the former symbiosis appears to be an ideal model for exploring the functioning of nodules at cellular and molecular levels. Furthermore, because actinorhizal plants are pioneers and perennial species in the process of revegetation and rehabilitation of wasted lands.

Consequently our knowledge of actinorhizas is increasing in a number of various areas such as plant physiology, biology and ecology.

It is our hope that this meeting will provide an overview of most recent advances in our knowledge on actinorhizas. For this purpose, communications to the meeting have been presented in the form of review papers and concentrated on four topics : the microsymbionts of actinorhizal plants, development and physiology of the nodule, molecular analysis of the symbiosis, ecology and applications of actinorhizal plants.

We are grateful to the French Botanical Society, the French Society of Plant Physiology for sponsoring the meeting. We also would like to thank ORSTOM, the Department of CIRAD-Forêt and the University Denis Diderot in Paris for their financial support.

Emile DUHOUX

Hoand G. DIEM

Biologie et diversité génétique des souches de *Frankia* associées aux Casuarinacées

par Carole Rouvier ⁽¹⁾, Jaime Schwencke ⁽²⁾, Yves Prin ⁽²⁾, Elisabeth Navarro ⁽³⁾, Patrick Benoist ⁽²⁾, Angeles Müller ⁽²⁾, Mina Girgis ⁽²⁾, Shawky Selim ⁽²⁾, Paul Reddell ⁽⁴⁾, Daniel Gauthier ⁽³⁾, Gérard Rinaudo ⁽³⁾, Philippe Normand ⁽¹⁾, et Pascal Simonet ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Laboratoire d'Ecologie microbienne du Sol, URA CNRS 1977, Université Lyon I, F-69622 Villeurbanne Cedex

⁽²⁾ BSFT (ORSTOM/CIRAD-Forêt), 45bis av. de La-Belle-Gabrielle, F-43736 Nogent-sur-Mame Cedex

⁽³⁾ Centre ORTOM, B. P. A5, Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie, France

⁽⁴⁾ CSIRO, Private Mail Bag, Aitkenvale, Queensland 4814, Australie

Résumé.- Quelques techniques nécessaires à l'étude de la biologie et de la diversité des microsymbiotes associés aux plantes appartenant à la famille des Casuarinacées ont été développées. Dans une première partie, après avoir amélioré la croissance exponentielle de certaines souches, nous avons pu mettre en évidence un système protéolytique, une excrétion de protéines exo-cellulaires, et utilisé certains isoenzymes pour caractériser ces souches. Par ailleurs, les signaux présymbiotiques échangés entre les deux partenaires ont été étudiés. Dans une deuxième partie nous avons analysé la diversité génétique de *Frankia* associé aux *Casuarinaceae*. L'étape de l'isolement de la souche a été évitée par la caractérisation directe de l'endosymbionte à l'intérieur du nodule. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une diversité génétique au sein de *Frankia* associé aux *Casuarinaceae* en Australie, alors que toutes les études précédentes sur des souches isolées avaient montré une très grande homogénéité génétique.

Summary.- Here we present some methodologies developed for the study of the biology and genetic diversity of *Frankia* nodulating actinorhizal plants belonging to the *Casuarinaceae* family. First, the exponential growth was improved for some strains. This permitted to describe their complex proteolytic system, an excretion of exo-proteins and to use some isoenzymes to characterize these strains. We have also studied the preliminary microbial signals that follow exposure of host-plant to flavonoids. In a second part, the genetic diversity of *Frankia* nodulating *Casuarinaceae* was studied. The isolation step was avoided by a direct characterization of the endosymbiont inside the nodule. A genetic diversity was shown among *Frankia* associated to *Casuarinaceae* in Australia, whereas previous studies on isolated strains had shown an important genetic homogeneity.

Key words : *Frankia* - *Casuarinaceae* - exponential growth - proteolytic system - exo-proteins - PCR/RFLP - non-isolated strains - Australia - genetic groups.

I - INTRODUCTION

Frankia est un actinomycète fixateur d'azote atmosphérique capable d'établir une symbiose avec 8 familles de plantes dites actinorhiziennes (Baker et Schwintzer, 1990). Parmi celles-ci, les Casuarinacées sont des plantes tropicales, comprenant les genres *Allocasuarina*, *Casuarina*, *Gymnostoma* et *Ceuthostoma* (Wilson et Johnson, 1989). Cette famille se trouve à l'état natif en Australie et dans les îles du Pacifique sud (Johnson et Wilson, 1989). Quelques espèces appartenant au genre *Casuarina* ont été exportées, à partir de la fin du XIX^{ème} siècle, vers toutes les zones tropicales et subtropicales du globe. Actuellement, ces grands arbres servent principalement de brise-vent protégeant les cultures des embruns salés, de stabilisateurs de dunes, et leur bois fournit un charbon à très haute teneur calorique (Diem et Dommergues, 1990 ; El-Lakany, 1983).

Depuis 1983, date du premier isolement d'une souche de *Frankia* à partir de Casuarinacées, capable de renoduler sa plante-hôte d'origine, seulement quelques souches sont actuellement disponibles (Diem *et al.*, 1982 ; Diem *et al.*, 1983 ; Diem et Dommergues 1985 ; Zang *et al.* 1984 ; Zang et Torrey 1985a, b ; Girgis *et al.*, 1990 ; Müller *et al.*, 1991 ; Savouré et Lim, 1991 ; Girgis et Schwencke, 1993). Ceci semble dû à différents facteurs. Tout d'abord, ces souches présentent une croissance lente et hétérogène, ce qui entraîne très souvent une contamination du milieu. Ensuite, et ceci semble caractéristique des souches isolées de Casuarinacées, cette étape d'isolement a très souvent conduit à l'obtention de souches incapables de reproduire la nodulation de la plante-hôte d'origine, mais qui nodulaient des membres de la famille des Elaeagnacées. Ces souches, qui ont été nommées « atypiques » (Nazaret *et al.*, 1989), seraient présentes dans les couches superficielles du nodule et ne sont éliminées que par un pelage minutieux du nodule (Diem, commu-

nication personnelle). Enfin, malgré quelques exceptions (Zang *et al.*, 1984 ; Zang et Torrey 1985b ; Girgis *et al.*, 1990 ; Savouré et Lim, 1991 ; Müller *et al.*, 1991 ; Girgis et Schwencke 1993), il semble extrêmement difficile d'isoler *Frankia*-Casuarinacées (*Frankia* nodulant les Casuarinacées) d'une autre espèce que *Casuarina equisetifolia* (Rosbrook et Reddell, 1995).

L'étude de la biologie de *Frankia* a donc nécessité une étape d'amélioration de la croissance exponentielle de souches disponibles au laboratoire. Ainsi, nous avons pu obtenir des inoculums de qualité et en grande quantité (Girgis et Schwencke 1993 ; Selim, 1995). Puis, au cours de nos études de la biologie de *Frankia*, cinq aspects ont été abordés : étude du système protéolytique, des protéines exocellulaires, d'isoenzymes permettant d'identifier les souches, et enfin, la recherche des signaux présymbiotiques.

La deuxième partie de nos recherches s'est attachée à l'étude de la diversité génétique de *Frankia* associé aux Casuarinacées. Des études faites sur des souches isolées ont tout d'abord montré une très grande homogénéité génétique. Nous avons ensuite développé une méthode de caractérisation génétique évitant l'isolement de la souche, afin de mettre en évidence la diversité génétique de *Frankia* nodulant les genres *Casuarina* et *Allocasuarina* en Australie, aire d'origine de ces genres.

II - ETUDES BIOLOGIQUES

A - Etat du sujet au début de nos études

Depuis la première mise en culture *in vitro* de *Frankia* par Callaham *et al.* (1978), toutes les souches isolées jusqu'à présent et cultivées dans des conditions statiques ont une croissance lente et non exponentielle. *Frankia* se développe au fond des flacons, sous la forme d'un voile composé de colonies hyphales (400-2000 µm de diamètre), et présente un temps de génération de

36 à 48 heures, un maximum de biomasse après au moins 12 à 24 jours et un rendement limité (5-10 mg de protéines bactériennes par litre, etc.). Dans ces conditions statiques de croissance, les souches de *Frankia* présentent à la fois une hétérogénéité morphologique et physiologique : hyphes en croissance en bordure des colonies mais également présence des zones de lyse, des spores, des hyphes toruleux reproductifs (RTH) et même, dans certains cas, des diazovésicules fixatrices d'azote (vésicules fixatrices d'azote) (Diem et Dommergues, 1985 ; Normand et Lalonde, 1986 ; Benson et Schultz, 1990). De même, une diminution protéolytique de la biomasse est observée en croissance statique. Cette grande hétérogénéité et le phénomène protéolytique sont incompatibles avec des études biochimiques qui, de ce fait, avaient été très peu développées. Notre intérêt initial était de développer des études biochimiques en vue de l'amélioration de la symbiose. Ceci nous a donc conduit à chercher des conditions de croissance exponentielle rapide avec un minimum de protéolyse et des colonies homogènes (seulement des hyphes en croissance, pas de sporanges ni d'hyphes en voie de lyse).

B - Développement des études biologiques

1. Mise au point de la croissance exponentielle de souches de *Frankia* isolées de Casuarinacées

La croissance exponentielle et rapide de *Frankia*-Casuarinacées a été obtenue en milieu minéral BAP (Fontaine *et al.*, 1986) tamponné avec Mes/Tris, par agitation contrôlée et par addition de phosphatidylcholines (milieu BAP-pcm, Girgis et Schwencke, 1993). Dans ces conditions, le taux de doublement est de 10-12 heures selon la souche avec un maximum de croissance au jour 3-4 et un rendement de biomasse entre 2 et 3 fois supérieur aux méthodes sans agitation. Plusieurs souches de *Frankia* isolées de Casuarinacées (BR, Cj, CeF, Thr, S21, Allo2, G80) ont une bonne croissance

dans ces conditions. Dans tous les cas, *Frankia* forme des microcolonies (50-150 μm de diamètre), morphologiquement et physiologiquement homogènes (pas d'hyphes lysés, pas de sporanges ni de spores à l'intérieur des microcolonies). Ces microcolonies, par coloration vitale à l'acridine orange, montrent des hyphes en croissance active tant à l'intérieur qu'à l'extérieur de la microcolonie (Fig. 1). Ces résultats ont été obtenus avec des mélanges de phosphatidylcholines de soja et, ensuite de jaune d'œuf, (Schwencke, 1991 ; Girgis et Schwencke, 1993 ; Schwencke, 1994a). Plus tard, nous avons pu démontrer que la 1,2-dipalmitoyl phosphatidylcholine de synthèse suffisait à elle seule pour la croissance exponentielle, tandis que des phosphatidylcholines de synthèse contenant des résidus d'acide oléique étaient nocifs (Selim et Schwencke, 1994a). De plus, nous avons récemment montré que l'acide palmitique ainsi que des acides gras structuellement voisins pouvaient à eux seuls promouvoir la croissance exponentielle de plusieurs souches de *Frankia* (BR, Thr, S21, Allo2, G80) isolées d'arbres de la famille des Casuarinacées (genres *Casuarina*, *Allocasuarina* et *Gymnostoma*). Par contre, l'acide oléique facilitait la dégradation protéolytique post-exponentielle de *Frankia* (Tableau 1). Nous avons aussi pu montrer que l'action bénéfique de l'acide palmitique et de la 1,2-dipalmitoyl phosphatidylcholine est probablement liée à leur utilisation pour la biosynthèse des composants de la membrane cytoplasmique de *Frankia* (Selim *et al.*, 1996). L'obtention de cultures homogènes de *Frankia* a, d'une part, facilité le développement d'études biochimiques et, d'autre part, permis l'obtention d'inoculums de qualité, la définition des conditions de nodulation de Casuarinas précises et reproductibles, ainsi que l'étude de quelques variables sur la nodulation tels que la quantité de protéines de *Frankia*, l'effet des ions calcium, cadmium, de l'alginate, etc. (Selim 1995 ; Selim et Schwencke, 1995).

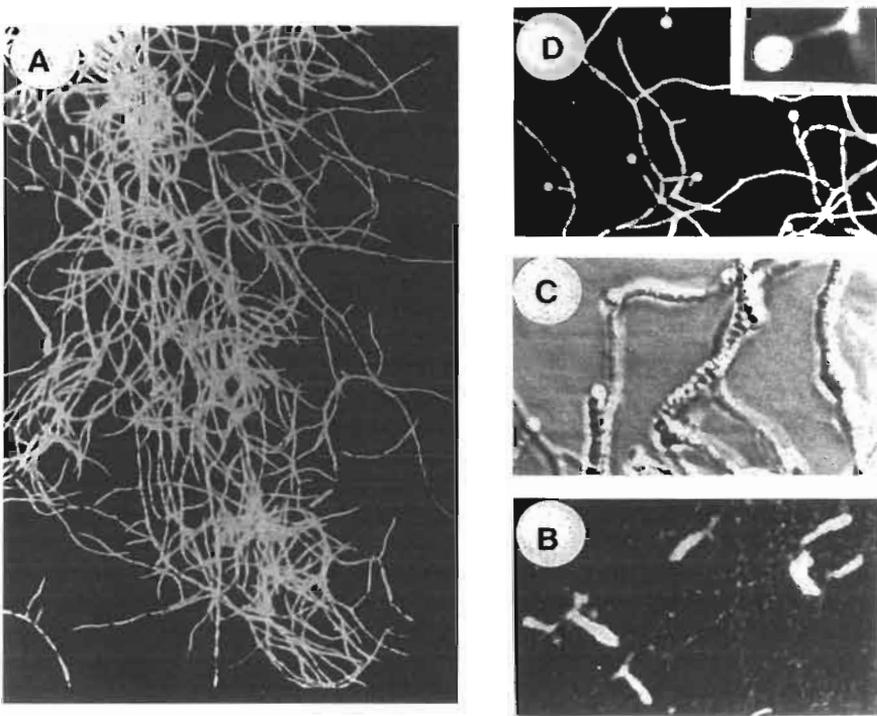


Fig. 1.- Structures spécialisées chez *Frankia*. Selon l'âge et les conditions de croissance, *Frankia* présente les structures suivantes : A - des hyphes (structures végétatives) en conditions de croissance exponentielle. B - des sporanges (structures de résistance) en conditions de croissance post-exponentielle ou statique. C - des hyphes toruleux reproductifs (RTH), structures de résistance se développant en croissance post-exponentielle ou statique. D - des diazovésicules, sièges de la fixation de l'azote car elles contiennent la nitrogénase, se forment en absence d'azote combiné dans le milieu de culture. A, B, D : observation au microscope à fluorescence après une coloration vitale à l'acridine orange pendant 15 mn (0,05 mg/ml dans $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 50 mM). C : microphotographie du Dr H. G. Diem.

Fig. 1.- The specialized structures of *Frankia*. Depending on age and culture conditions, *Frankia* presents the following different structures : A - hyphae (vegetative structures) ; exponential growth. B - sporangia (resistant structures) ; post-exponential or static growth. C - reproductive torulose hyphae (RTH) ; resistance structures ; post-exponential or unbalanced growth. D - Diazovesicles, specialized structures where nitrogen fixation occurs (nitrogenase complex inside) ; growth in absence of a combined nitrogen source. A, B, D : fluorescence microscopy after vital coloration with orange acridine 0,05 mg/ml in 50 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$. C : microphotograph, kindly provided by Dr H. G. Diem.

2. Le système protéolytique de la souche *Frankia* BR

En conditions de croissance statiques, ainsi qu'en présence de phosphatidylcholines de soja (Schwencke, 1991), on observe des signes morphologiques de lyse cellulaire et une perte de protéines hyphales (biomasse) des isolats de *Frankia*, indiquant un phénomène protéolytique. Ceci nous a conduit à l'étude du système protéolytique de

Frankia, complètement inconnu au début de nos recherches. Nous avons pu démontrer l'existence d'au moins six activités aminopeptidasiques et, au minimum, 14-16 activités endoprotéasiques de bas poids moléculaire, dont 7 augmentent de façon coordonnée à partir de l'arrêt de la croissance. En plus de cette complexité, nous avons décelé la présence d'inhibiteurs, ce qui suggère l'existence de phénomènes de

Tableau 1.- Croissance de *Frankia* BR dans un milieu BAP additionné de phosphatidylcholines ou d'acides gras
 Table 1.- Growth of *Frankia* strain BR in BAP medium with phosphatidylcholines or fatty acids

Jours	Rendement en biomasse ($\mu\text{g.ml}^{-1}$ protéines)						
	BAP-pcm	1,2-dipalmitoyl phosphatidylcholine	C-14	C-15	C-16	C-17	C-18:1, cis9
0	1,010,3	1,010,2	1,010,5	1,010,4	1,010,5	1,010,3	1,010,2
1	2,210,3	2,010,3	1,510,2	2,110,5	2,010,6	2,310,3	1,210,3
2	4,510,9	4,810,9	4,310,1	5,410,2	4,710,1	4,710,1	2,710,1
3	13,610,5	13,610,3	6,010,4	15,110,5	12,510,4	10,110,2	5,410,4
4	21,110,3	21,010,5	9,910,2	19,810,1	20,010,3	19,010,3	11,110,6
5	23,510,5	23,610,6	13,311,3	22,110,2	21,810,2	20,810,3	17,510,4
8	20,510,2	20,410,5	13,510,7	20,110,2	21,110,3	21,310,2	10,110,4
13	14,910,8	17,610,4	11,110,3	15,510,2	16,210,2	12,010,2	8,310,2

Contrôle 1] BAP-pcm (mélange des phosphatidylcholines d'œuf). Contrôle 2] 2,4 μM 1,2-dipalmitoyl phosphatidylcholine (synthétique). 2,4 μM sels sodiques de : (C-14:0) myristique, (C-15:0) pentadécanoïque, (C-16:0) hexadécanoïque, (C-17:0) heptadécanoïque, (C-18:1, cis 9) oléique. Protéines mesurées par la méthode de Bradford (1976). Toutes les valeurs : moyennes \pm déviation standard de trois ou quatre expériences.

régulation de l'activité des protéases par la formation des complexes protéinase-inhibiteurs. La mise en évidence des activités protéolytiques n'a pu se faire qu'après activation au SDS à 30°C.

L'analyse sur gels de polyacrylamide-gélatine en conditions non dénaturantes a révélé l'existence d'une protéinase d'un poids moléculaire estimé à 1300-1600 kDa. En conditions dénaturantes, cette protéase géante se dissocie libérant jusqu'à 11 protéinases d'une masse moléculaire entre 19 et 40 kDa. Ces résultats indiquent que cette protéinase géante est un complexe multiprotéolytique (Benoist *et al.*, 1992).

Après sédimentation sur gradient de saccharose des extraits bruts de *Frankia*, nous avons découvert l'existence de plusieurs complexes multiprotéolytiques allant de 270 kDa (12S) jusqu'à 1300-1600 kDa (28S-30S) dénommés HMPC (High Molecular Mass Proteolytic Complex). Parmi cette famille de complexes de haut poids moléculaire les complexes de 1600 et 650 kDa, présentent des similarités biochimiques (spécificité de substrats), morphologiques (cylindres de quatre à six anneaux creux, microscopie électronique) et immunologi-

que (réactions croisées avec des anticorps anti-protéasomes de rat) avec les prosomes ou protéasomes (20S et 26 ou 30S). A l'époque, les protéasomes n'avaient été décrits que dans des cellules eucaryotes (Scherrer, 1990 ; Tanaka et Ichira, 1990 ; Orłowski, 1990). Aujourd'hui, on sait qu'ils sont également présents chez les Archaeobactéries (Lupas *et al.*, 1993 ; Seemüller *et al.*, 1995). Mais les protéasomes de *Frankia* restent encore les seuls connus pour les eubactéries (Goldberg, 1995 ; Lupas *et al.*, 1993 ; Hochstrasser, 1995). Ces protéasomes et leurs sous-unités hydrolysent le même type de substrats que les protéasomes des animaux. De plus, les anticorps anti-protéasomes de rat reconnaissent les HMPC de *Frankia*, ainsi que leurs sous-unités de 35, 65 et 91 kDa (Benoist *et al.*, 1992), ce qui suggère l'existence de familles de gènes ayant une origine très précoce dans l'évolution. Les études sur les protéasomes de *Thermoplasma acidophilum* confirment cette idée (Lupas *et al.*, 1993 ; Seemüller *et al.*, 1995). Le fait que le protéasome de 28S (1600 kDa) se trouve parmi les protéines libérées dans le milieu de culture (Müller *et al.*, 1991), et qu'il montre des

activités gélatinolytiques et collagénolytiques, ouvre la possibilité qu'il puisse participer à l'étape d'invasion de la plante-hôte. En effet, les extensines présentes dans la paroi primaire des plantes ont des séquences collagène-like (Varner et Ling, 1989).

3. Estérases, déhydrogénases et aminopeptidases chez *Frankia*

Plusieurs activités estérasiques, aminopeptidasiques et déshydrogénasiques ont été mises en évidence chez *Frankia* suite à la mise au point d'un nouveau système d'électrophorèse sur gels mixtes de polyacrylamide-agarose à très bas point de gélification : ULGA-PAGE (Benoist et Schwencke, 1990). Les activités enzymatiques varient avec l'âge de la culture mais, en condition de croissance exponentielle, les profils sont tout à fait reproductibles. Ainsi, les zymogrammes d'estérases (mais pas celui des aminopeptidases) de plusieurs isolats de *Casuarina*, *Allocasuarina* et *Gymnostoma* présentent des caractéristiques permettant de les différencier entre eux ainsi que des autres groupes d'infectivité (Girgis et Schwencke, 1993 ; Schwencke, 1994b). Les souches de *Gymnostoma* présentent un profil électrophorétique d'estérases tout à fait caractéristique et particulier, permettant de les distinguer clairement de toutes les autres souches isolées des genres *Casuarina* et *Allocasuarina* (Fig. 2). Des souches résistantes aux antibiotiques montrent également un profil différent de celui des souches d'origine sensibles (Schwencke, 1994b ; Selim et Schwencke, 1994b). En utilisant ces deux critères, il a été possible d'identifier des souches réisolées à partir de nodules obtenus par inoculation mixte avec des mélanges des souches. Nous avons trouvé quelques nodules contenant deux souches à la fois (Tableau 2).

4. Etude des protéines extracellulaires

A l'aide d'une méthode originale de concentration des protéines extracellulaires par la DEAE-cellulose (Müller *et al.*, 1991),

nous avons montré pour la première fois que la souche BR possède une forte capacité sécrétrice de protéines. Cette sécrétion est importante pendant la croissance exponentielle mais diminue beaucoup au début de la phase stationnaire. L'analyse par SDS-PAGE des extraits extracellulaires concentrés, montre 63 à 65 polypeptides, le profil de ces polypeptides sécrétés montrant quelques variations en fonction de l'âge de la culture. Six aminopeptidases de *Frankia* (FAP1, 2, 3, 4, 5, 6BR) sont présentes parmi les protéines sécrétées. Elle montrent le même profil électrophorétique et la même spécificité vis-à-vis de plusieurs substrats que leurs homologues intracellulaires. Curieusement, à la différence des autres, la FAP3BR (spécifique pour la proline amino terminale) est la seule dont la présence n'est plus décelable au-delà du deuxième jour après l'arrêt de la croissance exponentielle. Au moins 15 protéinases extracellulaires sont sécrétées, mais seulement 5 apparaissent comme exclusivement extracellulaires. Leur importance dans le processus d'infection ou dans les relations symbiotiques reste à déterminer (Müller *et al.*, 1991).

5. Signaux précédant l'établissement de la symbiose *Casuarina-Frankia*

La possibilité de disposer de façon reproductible de souches de *Frankia* en bonnes conditions physiologiques (hyphes homogènes et sans sporanges) nous a permis d'aborder cette étude. Tout d'abord, nous avons montré la présence de plusieurs flavonoïdes dans des extraits alcooliques de graines de *Casuarina glauca*. Puis nous avons trouvé que la souche *Frankia* BR synthétise des facteurs déformants des poils absorbants de *Casuarina glauca* (dnF) quand elle est cultivée en présence d'un mélange de flavonoïdes extraits des graines de *Casuarina glauca*. L'analyse des extraits microbiens par PAGE-SDS a montré des changements spécifiques dans le profil des peptides cytoplasmiques et membranaires de *Frankia* après l'addition aux

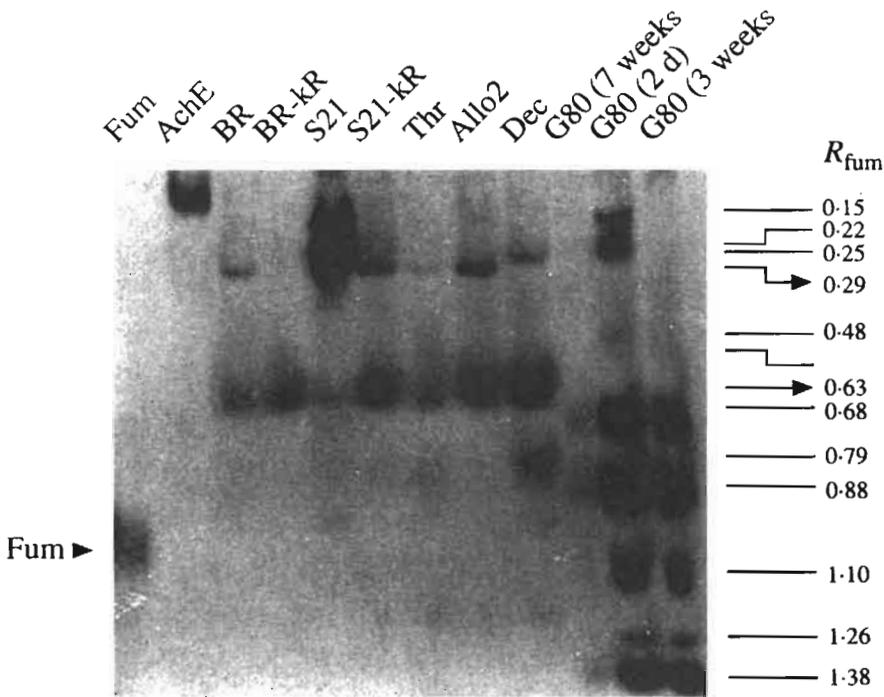


Fig. 2.- Profil électrophorétique d'estérases de quelques souches de *Frankia*. Pour chaque souche, 250 mg de protéines (méthode BCA) ont été chargés dans chaque puits. Fum, marqueur fumarase pré-colorée, R_{fum} , mobilité électrophorétique relative, calculée en divisant le parcours en cm d'une bande donnée par les cm parcourus par la fumarase sur le même gel. Les valeurs R_{fum} sont très reproductibles d'un gel à l'autre. Incubation des gels dans 5-bromo-4-chloro-indoxyl-acétate 1 mM et $MgCl_2$ 5 mM pendant 30 mn à 20-22°C. AchE, acétyl choline estérase. Souches isolées de *Casuarina* : BR, BR-kR, S21, S21-kR et Thr. Souches isolées d'*Allocasuarina* : Allo2 et Dec. Souches isolées de *Gymnostoma* : G80. Extraits gardés à - 80°C pendant la période de temps indiquée. Cliché de Girgis et Schwencke, 1993, présenté avec l'autorisation de *J. Gen. Microbiol.* (maintenant *Microbiol.*).

Fig. 2.- Electrophoretic patterns for esterases of some *Frankia* strains. For each strain, 250 mg protein (BCA method) were loaded. Fum, prestained fumarase marker, R_{fum} , relative mobility, calculated by dividing the distance of migration in cm of a given band by the migration in cm of the fumarase marker in the same gel. R_{fum} values were highly reproducible from one gel to another. Gels were incubated with 5 mM 5-bromo-4-chloro-indoxyl acetate and 5 mM $MgCl_2$ for 30 mn at 20-22°C. AchE, acetyl cholin esterase. Strains isolated from *Casuarina* : BR, BR-kR, S21, S21-kR and Thr. Strains isolated from *Allocasuarina* : Allo2 and Dec. Strains isolated from *Gymnostoma* : G80. Extracts were stored at - 80°C for the time indicated. Reproduced from Girgis and Schwencke, 1993, with authorization from *J. Gen. Microbiol.* (now *Microbiol.*).

cultures d'extraits de graines contenant les flavonoïdes. Ces changements se produisent en parallèle avec l'induction des dnF qui sont sécrétés au milieu de culture.

La capacité déformante des surnageants de culture de *Frankia* est importante. Elle est encore décelable à des dilutions de 1/100 000. La morphologie

des poils absorbants déformés de *Casuarina glauca* (poils enroulés sur eux-mêmes, bâton de berger, en forme de serpent, gonflés, ramifiés, etc.) est comparable à celles observées dans la symbiose *Rhizobium-Légumineuses* en présence des facteurs Nod (Selim, 1995 ; Schwencke et Selim, 1995).

Tableau 2.- Identification, par leur profils électrophorétique d'estérases, de souches présentes dans des nodules^a de *Casuarina glauca* après inoculation^b des plantules avec des mélanges de souches.

Table 2.- Identification by their esterases patterns of strains from nodules^a of *Casuarina glauca* after inoculation^b of seedlings with mixtures of strains.

Souches identifiées	Isolats									
	A 0	A 1	A 2	A 3	A 4	F 0	F 2	F 3	F 4	F 5
Thr	+ ^c	+	+	+	- ^c	-	+	+	+	+
S21-kR	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+

a - Les nodules A et F ont donné lieu à plusieurs isolats à partir des lobes : 0,1,2,3,4 et 5

b - Inoculum composé d'un mélange des souches S21-kR (résistante à la kanamycine) Thr (sensible)

c - (+) présence, (-) absence de la souche dans les lobes du nodule.

III. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE *FRANKIA* NODULANT LES CASUARINACÉES

A - Etat du sujet au début des recherches

Les travaux de Fernandez *et al.* (1989) ont permis de définir 9 espèces génomiques au sein du genre *Frankia*. Sur les 11 souches isolées de Casuarinacées, 8 se sont retrouvées dans l'espèce génomique 9. Les 3 souches restantes étaient des souches atypiques, c'est-à-dire qu'elles ne renodulaient pas leur hôte d'origine (Gauthier *et al.*, 1981), et n'ont pu être classées. Les souches de l'espèce génomique 9 présentaient des taux d'hybridation ADN/ADN assez élevés (de 69 à 100 %). Cette homogénéité génétique a été confirmée par Nazaret *et al.* (1989) en utilisant la technique RFLP et les gènes de la fixation d'azote comme sonde. Ces travaux ont néanmoins permis de différencier la souche ORS020609 (M2) isolée de *C. equisetifolia* à Madagascar, et qui présentait un profil particulier. Au cours de cette étude, l'éloignement génétique des souches atypiques par rapport aux souches typiques a été montré et l'hypothèse d'une co-infection souche typique-souche atypique a été préférée par rapport à celle d'une mutation souche typique - souche atypique, l'hétérogénéité génétique constatée parmi

les souches atypiques ne pouvant provenir d'événements mutationnels (Nazaret *et al.*, 1989). Ce résultat a donc confirmé la nature contaminante des souches atypiques.

B - Développement des études génétiques

1. Séquençage de zones variables de l'opéron ribosomal et de l'opéron *nif*

Le séquençage de zones variables de l'ADN obtenues par PCR est la technique la plus adaptée pour appréhender la diversité génétique de *Frankia*. Non seulement la PCR nécessite peu de biomasse bactérienne, mais en plus ces régions d'ADN peuvent être amplifiées directement à partir du nodule quand l'endosymbionte ne peut être isolé, comme c'est souvent le cas chez *Frankia*-Casuarinacées. Le séquençage d'une région hypervariable de l'ARNr 16S a montré que les souches du groupe génomique 9 présentaient la même séquence, une souche se démarquant par un nucléotide de différence, la souche M2 (Nazaret *et al.*, 1991). Au cours de cette étude, deux grands groupes phylogénétiques ont été obtenus. D'un côté, les souches infectives sur les Elaeagnacées, de l'autre les souches infectives sur *Alnus* et celles infectives sur les Casuarinacées. Ce regroupement a été également obtenu par séquençage de l'intergène *nifH-nifD* et du début du gène *nifD*. Par ailleurs, il semblerait que les sou-

ches infectives sur les Casuarinacées dérivent phylogénétiquement de celles infectives sur *Alnus* (Cournoyer *et al.*, 1993). Cette observation n'est pas dénuée de sens, puisque les Casuarinacées et les Betulacées (dont *Alnus* est la seule espèce actinorhizienne) font partie de la même sous-classe des Hammamelidées, et l'étude des pollens fossiles montre que les Casuarinacées sont apparues après les Betulacées (Cronquist, 1988).

Etant donné que ces souches isolées ne pouvaient être discriminées au niveau de l'ARNr 16S, l'IGS 16S/23S a ensuite été choisi comme zone d'étude. Cette zone qui présente 411 pb chez la souche ORS020606 isolée de *Casuarina equisetifolia* (Normand *et al.*, 1992) était susceptible de présenter une séquence à haute variabilité, puisque aucune séquence codante n'y était présente. Mais là encore, ces souches n'ont présenté pratiquement aucune différence dans leur séquence (Rouvier *et al.*, 1992). Ces résultats ont ensuite été confirmés par le séquençage d'une insertion hypervariable située dans le gène de l'ARNr 23S (Hönerlage *et al.*, 1994).

Puis, très récemment, le séquençage de l'ARNr 16S dans son entier sur un nombre important de souches a permis d'établir clairement la phylogénie du genre *Frankia*. Il est apparu que le séquençage partiel avait été une bonne approche, puisque les regroupements ont été retrouvés, à savoir d'un côté les souches infectives sur les Casuarinacées et celles infectives sur *Alnus*, et de l'autre le groupe homogène des souches infectives sur les Elaeagnacées (Normand *et al.*, sous presse).

2. Etude de la diversité génétique de *Frankia*-Casuarinacées en Australie

Les quelques souches de *Frankia* isolées de *Casuarina* ont donc montré une très grande homogénéité génétique. Ces résultats étaient assez étonnants. D'une part, parce que ces souches ont été isolées dans des régions géographiques très éloignées

(Afrique, Amérique du Sud, Asie, Amérique du Nord), d'autre part les souches appartenant aux autres groupes d'inoculation (*Alnus*, Elaeagnacées) présentaient une plus grande variation génétique (Fernandez *et al.*, 1989 ; Nazaret *et al.*, 1991).

A la suite de ces constatations, il nous est apparu qu'un certain nombre de biais pourraient avoir masqué la diversité génétique de *Frankia*-Casuarinacées. Tout d'abord, il serait possible que l'étape de l'isolement en elle-même ait sélectionné les souches les plus adaptées au milieu de culture, qui ne seraient pas représentatives de la diversité génétique réelle existant au sein de *Frankia* nodulant les Casuarinacées. Deuxièmement, la plupart de ces souches ont été isolées, plus ou moins directement, d'une seule espèce de plante-hôte : *Casuarina equisetifolia*. Il est donc possible que le manque de diversité de la plante-hôte ait entraîné l'isolement de souches génétiquement très proches. Enfin, ces isolements ont presque tous été effectués dans des zones d'introduction des Casuarinacées, où peu d'espèces ont été exportées, ce qui pourrait avoir conduit à la dissémination de souches de *Frankia* génétiquement proches. L'utilisation fréquente de l'inoculation lors de l'implantation des Casuarinacées a également pu fausser l'interprétation des résultats d'étude de diversité.

Le but de cette deuxième partie a donc été d'évaluer la diversité génétique de *Frankia*-Casuarinacées en caractérisant, sans les isoler, des souches de *Frankia* associées à différentes espèces de Casuarinacées. Nous avons étudié 4 espèces, appartenant aux genres *Allocasuarina* et *Casuarina*. Nous avons étudié ces « souches non-isolées » en Australie, aire de répartition naturelle de ces deux genres. L'étape d'isolement semblant être un biais, il nous fallait utiliser une méthode de caractérisation génétique évitant cette étape d'isolement. Pour cela, nous avons adapté une méthode de PCR/RFLP (analyse d'un fragment amplifié par des endonucléases de restriction) sur de l'ADN

extrait directement d'un lobe nodulaire. Deux régions d'ADN ont été étudiées : l'une dans l'opéron ribosomal (région *rrn*), l'autre dans l'opéron *nif* (région *nif*). Chacune de ces régions comprenait environ 1Kb. Ces régions ont été analysées avec différentes enzymes de restriction : 7 pour la région *rrn*, 6 pour la région *nif*.

Une campagne de prospection dans le Nord-Queensland a permis de récolter des nodules dans 20 sites différents et d'extraire l'ADN de 22 souches « non-isolées » (Tableau 3). Huit souches de référence ont également été utilisées (Tableau 4). Pour chaque région d'ADN, les endonucléases ont don-

Tableau 3.- Souches non isolées utilisées
Table 3.- Non-isolated strains used in this study

Espèce de la plante-hôte	Site	Nomination des souches non-isolées	Latitude,	Longitude
<i>Casuarina equisetifolia</i>	Cow Bay	CeCB	16°14'	145°28'
	Garners Beach	CeGB	17°48'	146°06'
	Mount Low Beach	CeMLB	19°10'	146°42'
	Pallarenda	CePall	19°12'	146°44'
	Saunders Beach	CeSB	19°11'	146°37'
	Wangetti Beach ^a	CeWg1	16°41'	145°35'
		CeWg2		
Wongalinga Beach	CeWB	17°56'	146°06'	
<i>Casuarina cunninghamiana</i>	Bakerville Creek	CcBK	17°22'	145°15'
	Herbert River Crossing	CcHRC	18°15'	145°22'
	Jourama Falls ^b	CcJF	18°52'	146°07'
	Old Chinaman Creek	CcOCC	17°26'	145°16'
	Tinaroo Creek	CcTC	17°39'	145°17'
	West Watsonville	CcWW	17°28'	145°16'
<i>Allocasuarina torulosa</i>	Atherton Rifle Range ^a	AltARR1	17°18'	145°29'
		AltARR2		
	Bluewater	AltBW	19°11'	146°35'
North of Lawyer Creek	AltNLC	17°55'	145°09'	
<i>Allocasuarina littoralis</i>	Atherton	AllAT	16°25'	145°24'
	Kuranda ^a	AllKur1	16°50'	145°39'
		AllKur2		
West of Herberton	AllWH	17°23'	145°23'	

^anodules collectés sur 2 arbres, ^bnodule aérien

Tableau 4.- Souches bactériennes utilisées
Table 4.- Bacterial strains used in this study

N° d'enregistrement	Nom usuel	Plante-hôte d'origine	Origine géographique	Références
ORS020606	CeD	<i>Casuarina equisetifolia</i>	Sénégal	Diem et Dommergues (1983)
ORS020607	CeF	<i>Casuarina equisetifolia</i>	U.S.A.	Diem et Dommergues (1983)
ORS020608	Br	<i>Casuarina equisetifolia</i>	Brésil	Müller et al. (1991)
ORS020609	M2	<i>Casuarina equisetifolia</i>	Madagascar	Diem et Dommergues, non publié
ORS021001	Cj1-82	<i>Casuarina junghuhniana</i> ^a	Thaïlande	Diem et al., 1983
ORS022602		<i>Allocasuarina torulosa</i> ^b	Australie	Diem, non publié
HFP020203	Cc13	<i>Casuarina cunninghamiana</i> ^c	U.S.A.	Zhang et al., 1984
HFP022801	AIII1	<i>Allocasuarina lehmanniana</i> ^c	U.S.A.	Zhang et Torrey, 1985a

^ahybride *C. equisetifolia*/*C. junghuhniana*.

^binoculé avec un broyat de nodules de *C. cunninghamiana* (Diem, communication personnelle)

^cinoculé avec un broyat de nodules de *C. equisetifolia*.

né 2 à 4 profils types, suivant leur pouvoir discriminant. Pour chaque région d'ADN, l'ensemble des endonucléases utilisées a donné 5 combinaisons de profils types, correspondant à 5 groupes génétiques. Ces groupes étaient constitués des mêmes souches, isolées et non-isolées, quelle que soit la région d'ADN étudiée. L'organisation de ces groupes était la suivante :

- **Groupe 1** : les souches de références
- 6/8 souches non-isolées de *C. equisetifolia*.
- **Groupe 2** : 2/8 souches non-isolées de *C. equisetifolia*
- **Groupe 3** : les souches non-isolées de *C. cunninghamiana*
- **Groupe 4** : les souches non-isolées d'*A. torulosa*
- **Groupe 5** : les souches non-isolées d'*A. littoralis*

Pour une discrimination rapide de ces groupes, 2 enzymes sont suffisantes : *Nci* I et *Scr*FI pour la région *rrn* (Fig. 3) et *Bst*UI et *Cfo*I pour la région *nif* (Fig. 4).

Cette étude nous a donc permis de montrer qu'il existait une diversité génétique au sein de *Frankia* nodulant les genres *Casuarina* et *Allocasuarina* en Australie (Rouvier et al., 1996). L'espèce à laquelle appartient la plante-hôte semble jouer un rôle important dans la répartition des groupes. C'est

d'ailleurs ce qui pourrait expliquer l'homogénéité génétique observée jusqu'à présent au sein des souches isolées. En effet, ces souches ont toutes été isolées (plus ou moins directement) de *Casuarina equisetifolia*, et la majorité des souches non-isolées australiennes associées à cette espèce sont dans le groupe 1, avec les souches de référence. Néanmoins, la présence d'un second groupe au sein des souches associées à cette même espèce en Australie, qui n'est pas retrouvé pour les souches isolées montre que leur isolement hors de l'Australie pourrait avoir entraîné une réduction de leur diversité génétique.

III - CONCLUSION

L'établissement des conditions de croissance exponentielle des souches de *Frankia* isolées des Casuarinacées a été une l'étape capitale, permettant d'étudier plus précisément leur biologie. Notamment, l'étude de l'excrétion protéique a mis en évidence des complexes protéiques particuliers (les protéasomes) dont le rôle dans la symbiose sera intéressant à étudier. De plus, des cultures homogènes ont été obtenues, ce qui a permis d'aborder, dans des conditions optimales, l'étude des signaux échangés par les deux partenaires (bactérie-plante) au cours de la symbiose.

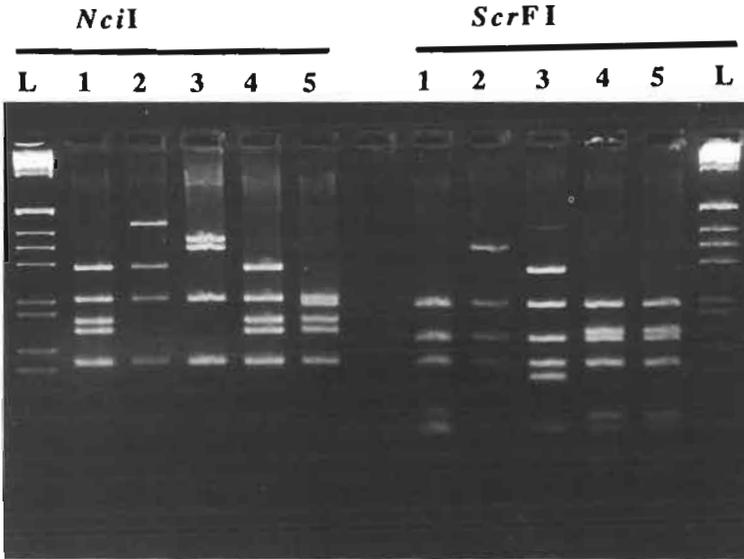


Fig. 3.- Profils obtenus sur la région *rrm* avec les endonucléases *NciI* et *ScrFI*. L, ladder 1Kb, lignes 1 à 5, groupes 1 à 5
 Fig. 3.- Restriction patterns of *rrm* region with endonucleases *NciI* and *ScrFI*. L, 1Kb ladder, lines 1 to 5, groups 1 to 5

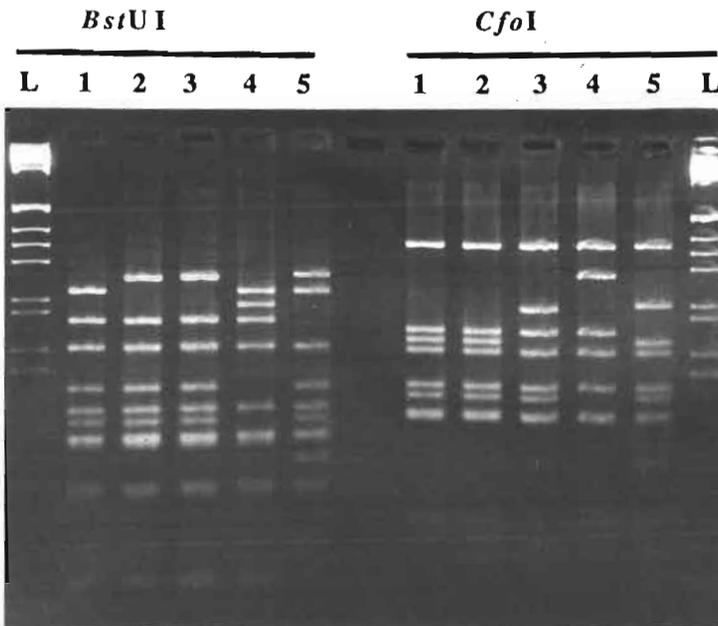


Fig. 4.- Profils obtenus sur la région *nif* avec les endonucléases *BstUI* et *CfoI*. L, ladder 1Kb, lignes 1 à 5, groupes 1 à 5.
 Fig. 4.- Restriction patterns of *nif* region with endonucleases *BstUI* and *CfoI*. L, 1Kb ladder, lines 1 to 5, groups 1 to 5.

Si certaines de ces souches isolées, notamment du genre *Gymnostoma*, ont pu être discriminées par les isoenzymes, la majorité ont montré une très grande homogénéité génétique à partir du séquençage de zones variables du génome.

En fait, l'utilisation d'une technique permettant d'étudier la diversité génétique de souches « non-isolées », directement dans le nodule, a permis de montrer que les souches isolées étudiées jusqu'à présent n'étaient pas représentatives de la diversité génétique de *Frankia* nodulant les Casuarinacées. En effet, la plupart de ces souches ont été isolées d'une seule espèce, *Casua-*

rina equisetifolia, et l'étude de différentes espèces a mis en évidence différents groupes génétiques associés aux différentes espèces étudiées. Par ailleurs, il semblerait que le fait que ces souches isolées proviennent de zones d'introduction et non de la zone d'origine (l'Australie), ait contribué à la mise en évidence de leur grande homogénéité génétique. Ces résultats amènent donc d'intéressantes perspectives, d'une part sur le rôle de la plante-hôte dans cette diversité génétique, d'autre part sur la diminution de cette diversité génétique dans les zones d'introduction où quelques espèces de Casuarinacées ont été massivement exportées à partir de l'Australie.

BIBLIOGRAPHIE

- Baker D.D. & C.R. Schwintzer, 1990.- Introduction. In : The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. Schwintzer C. R. & J. D. Tjepkema (eds), Academic Press, San Diego, 3-13.
- Benoist P. & J. Schwencke, 1990.- Native agarose-polyacrylamide gel electrophoresis allowing the detection of aminopeptidase, dehydrogenase and esterase activities at the nanogram level : enzymatic pattern in some *Frankia* strains. *Anal. Biochem.*, **187**, 337-344.
- Benoist P., A. Müller, H.G. Diem & J. Schwencke, 1992.- High-molecular-mass multicatalytic complexes produced by the nitrogen-fixing actinomycete *Frankia* strain BR. *J. Bacteriol.*, **174**, 1495-1504.
- Benson D.R. & N.A. Schultz, 1990.- Physiology and biochemistry of *Frankia* in culture. In : The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. Schwintzer C.R. & J.D. Tjepkema (eds), Academic Press, San Diego, 107-127.
- Callahan D., P. Del Tredici & J.G. Torrey, 1978.- Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. *Science*, **199**, 899-902.
- Courmoyer B., M. Gouy & P. Normand, 1993.- Molecular phylogeny of the symbiotic actinomycetes of the genus *Frankia* matches host-plant infection process. *Mol. Biol. Evol.*, **10**, 1303-1316.
- Cronquist A, 1988.- The evolution and classification of the flowering plants, 2d ed. Allen, Lawrence, Kans.
- Diem H.G., D. Gauthier & Y.R. Dommergues, 1982.- Isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina equisetifolia*. *Can J. Microbiol.*, **28**, 526-530.
- Diem H.G., D. Gauthier & Y.R. Dommergues, 1983.- An effective strain of *Frankia* from *Casuarina* sp. *Can. J. Bot.*, **61**, 2815-2821.
- Diem H.G. & Y.R. Dommergues, 1985.- *In vitro* production of specialized reproductive torulose hyphae by *Frankia* strain ORS 021001 isolated from *Casuarina junghuhniana* root nodules. *Plant and Soil*, **87**, 17-29
- Diem H.G & Y.R. Dommergues, 1990.- Current and potential uses and management of *Casuarinaceae* in the tropics and subtropics. In : The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. Schwintzer C. R. & J. D. Tjepkema (eds), Academic Press, San Diego, 317-341.
- El-Lakany M.H., 1983.- A review of breeding drought resistant *Casuarina* for shelterbelts establishment in arid regions with special reference to Egypt. *For. Ecol. Manag.*, **8**, 129-137.
- Fernandez M.P., H. Meugnier, P.A.D. Grimont & R. Bardin, 1989.- Deoxyribonucleic acid relatedness among members of the genus *Frankia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 424-429.
- Fontaine M.S., P.H. Young & J.G. Torrey, 1986.- Effects of long-term preservation of *Frankia* strains on infectivity, effectivity and *in vitro* nitrogenase activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 694-698.
- Gauthier D., H. G. Diem & Y. Dommergues, 1981.- Infectivité et effectivité de souches de *Frankia* isolées de nodules de *Casuarina equisetifolia* et d'*Hippophaë rhamnoides*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **293**, 489-491.
- Girgis M.G.Z., Y.Z. Ishac, M. El Haddad, E.A. Saleh, H.G. Diem & Y.R. Dommergues, 1990.- First report on isolation and culture of effective *Casuarina*-compatible strains of *Frankia* from Egypt. In : Proc. of the 2nd Internat. *Casuarina* Workshop. El-Lakany, M.H., J.W. Turnbull & J.L. Brewbaker (eds), Desert Development Center. American University, Cairo, 156-164.
- Girgis M. & J. Schwencke, 1993.- Differentiation of *Frankia* strains by their electrophoretic patterns of intracellular esterases and aminopeptidases. *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 2225-2232
- Goldberg A.L., 1995.- Functions of the proteasome : the lysis at the end of the tunnel. *Science*, **268**, 522-523.

- Hochstrasser M., 1995.- Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr. Op. Cell Biol.*, **7**, 215-223.
- Hönerlage W., D. Hahn, K. Zepp, J. Zeyer & P. Normand, 1994.- A hypervariable region provides a discriminating target for specific characterization of uncultured and cultured *Frankia*. *System. Appl. Microbiol.*, **17**, 433-443.
- Johnson L.A.S. & K.L. Wilson, 1989.- *Casuarinaceae*: a synopsis. In: Evaluation, systematics and fossil history of the Hamamelidae, vol. 2: Higher Hamamelidae. P.R. Crane & S. Blackmore (eds), Systematics Association Special Volume 40B. Clarendon Press, London, 67-188.
- Lupas A., A.J. Koster & W. Baumeister, 1993.- Structural features of 26S and 20S proteasomes. *Enzyme and protein*, **47**, 252-273.
- Müller A., P. Benoist, H.G. Diem & J. Schwencke, 1991.- Age-dependent changes in extracellular proteins, aminopeptidases and proteinase activities in *Frankia* isolate BR. *J. Gen. Microb.*, **137**, 2787-2796.
- Nazaret S., P. Simonet, P. Normand & R. Bardin, 1989.- Genetic diversity among *Frankia* isolated from *Casuarina* nodules. *Plant Soil*, **118**, 241-247.
- Nazaret S., B. Cournoyer, P. Normand & P. Simonet, 1991.- Phylogenetic relationships among *Frankia* genomic species determined by use of amplified 16S rDNA sequences. *J. Bacteriol.*, **173**, 4072-4078.
- Normand P. & M. Lalonde, 1986.- The genetics of *Frankia*: a review. *Plant and Soil*, **90**, 429-453.
- Orlowski M., 1990.- The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry*, **29**, 10289-10297.
- Rosbrook P.A. & P. Reddell, 1995.- Isolation of *Frankia* from root nodules of three species of *Casuarina*. *Soil Biol. Biochem.*, **27**, 427-429
- Rouvier C., S. Nazaret, M.P. Fernandez, B. Picard, P. Simonet & P. Normand, 1992.- *rrn* and *nif* intergenic spacers and isozyme patterns as tools to characterize *Casuarina*-infective *Frankia* strains. *Acta Oecologica*, **13**, 487-495.
- Rouvier C., Y. Prin, P. Reddell, P. Normand & P. Simonet, 1995.- Genetic diversity among *Frankia* nodulating *Casuarinaceae* in Australia revealed by PCR/RFLP on crushed nodules. *Appl. Env. Microbiol.*, **63**, 979-985.
- Savouré A. & G. Lim, 1991.- Characterization of an effective *Frankia* (ISU 0224887) isolated from nodules of *Gymnostoma sumatranum*. *Plant and Soil*, **131**, 21-27
- Scherrer K., 1990.- Prosomes, subcomplexes of untranslated mRNP. *Mol. Biol. Reports*, **14**, 1-9.
- Schwencke J., 1991.- Rapid exponential growth and increased biomass yield of some *Frankia* strains in buffered and stirred mineral medium (BAP) with phosphatidylcholines. *Plant and Soil*, **137**, 37-41.
- Schwencke J., 1994a.- Biochemical studies with *Frankia*. Problems and hopes. In: Recent Developments in Biological Nitrogen Fixation Research in Africa. Saidiki M. & A. Hilali (eds), IAV Hassan II, Rabat, 245-252.
- Schwencke J., 1994b.- *Frankia* strains from the *Casuarinaceae* family. Identification by their zymograms of esterases and antibiotic sensitivity. Possibilities and limitations. In: Nitrogen Fixation with Non-Legumes. N.A. Hegazi, M. Fayed & M. Monib (eds), The American University in Cairo Press, 567-576.
- Schwencke J. & Sh. Selim, 1995.- Deforming factors of *Casuarina* root hairs (dnF), are induced in *Frankia* by flavonoids from *Casuarina* seeds. 10th International Conference on *Frankia* and Actinorhizal Plants. Los Angeles, 6-11 August, 1995.
- Seemüller E., A. Lupas, D. Stock, J. Löwe, R. Huber & W. Baumeister, 1995.- Proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science*, **268**, 579-582.
- Selim S. & J. Schwencke, 1994a.- 1,2-dipalmitoyl phosphatidylcholine, 1,2-dipalmitoyl phosphatidic acid or 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol inhibit sporangia formation and promote exponential growth of various *Frankia* isolates from the *Casuarinaceae* family. *Soil Biol. Biochem.*, **26**, 569-575.
- Selim, S. & J. Schwencke, 1994b.- Antibiotic-resistant derivatives from *Frankia* strains of the *Casuarina* and *Allocasuarina* genera. In: Nitrogen Fixation with Non-Legumes. N.A. Hegazi, M. Fayed & M. Monib (eds), The American University in Cairo Press, 225-226.
- Selim S., 1995.- La symbiose *Casuarina*-*Frankia*. Optimisation de la croissance et approche biologique de la reconnaissance microorganisme/plante-hôte. Thèse Docteur es Sciences, Université Paris Sud, 1995.
- Selim S. & J. Schwencke, 1995.- Simple and reproducible nodulation test for *Casuarina*-compatible *Frankia* strains: inhibition of nodulation and plant performance by some cations. *Arid Soil Res. Rehabil.*, **9**, 25-37.
- Selim S., S. Delacour & J. Schwencke, 1996.- Specific long chain fatty acids promote optimal growth of *Frankia*: accumulation and intracellular distribution of palmitic and propionic acid. Soumis à *Arch. Microbiol.*
- Tanaka K. & A. Ichihara, 1990.- Proteasomes (multicatalytic proteinase complexes) in eukaryotic cells. *Cell structure and function*, **87**, 127-132.
- Varner J.E. & L.S. Ling, 1989.- Plant cell wall architecture. *Cell*, **56**, 231-239.
- Wilson K.L. & L.A.S. Johnson, 1989.- *Casuarinaceae*. In: Flora of Australia. Hammamelidales to Casuarinales. Australian Government Publishing Service, Canberra, vol. 3, 100-203.
- Zang Z., M.F. Lopez & J.G. Torrey, 1984.- A comparison of cultural characteristics and infectivity of *Frankia* isolates from root nodules of *Casuarina* species. *Plant and Soil*, **78**, 79-90.
- Zang Z. & J.G. Torrey, 1985a.- Studies of an effective strain of *Frankia* from *Allocasuarina lehmanniana* of the *Casuarinaceae*. *Plant and Soil*, **87**, 1-16.
- Zang Z. & J.G. Torrey, 1985b.- Biological and cultural characteristics of an effective *Frankia* strain HFPC-13 (Actinomycetales) from *Casuarina cunninghamiana* (*Casuarinaceae*). *Ann. Bot.*, **56**, 367-378.

Les mycorhizes des plantes actinorhiziennes

par Hoang G. Diem

CNRS et Laboratoire de Biotechnologie des Symbioses Forestières Tropicales,
CIRAD-Forêt/ORSTOM, 45bis avenue de La-Belle-Gabrielle, F-94736 Nogent-sur-Marne
Adresse actuelle : Direction des Relations Internationales, CNRS,
3 rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16

Résumé.- En qualité d'espèces pionnières pour la revégétation des sols, les plantes actinorhiziennes sont prédisposées à former avec les champignons mycorrhiziens des associations symbiotiques aussi indispensables à leur croissance que celles formées avec *Frankia*. Comme l'on pouvait s'y attendre, les mycorhizes stimulent le développement et l'activité fixatrice de N₂ de la symbiose actinorhizienne en améliorant la nutrition minérale de la plante-hôte. En plus des mycorhizes, les plantes actinorhiziennes peuvent former un type de racines très particulières appelées « racines protéoïdes » ou « racines en écouvillon » en réponse aux effets néfastes des carences nutritionnelles dans le sol. Ces « racines en écouvillon » constituées de touffes de radicelles sont des structures racinaires spécialisées très efficaces pouvant remplacer les mycorhizes et permettre aux plantes porteuses de croître dans les sols marginaux pauvres en nutriments. Il n'y a pas de compétition entre *Frankia* et les champignons mycorrhiziens pour les sites d'infection mais l'extension de la mycorhization peut affecter la croissance de *Frankia* et le développement ultérieur des jeunes nodules actinorhiziens. Par contre, la présence de *Frankia in planta* n'a aucune incidence sur l'infection mycorrhizienne. En référence à l'aulne et à *Allocasuarina*, l'auteur a discuté des implications possibles de *Frankia* et des champignons mycorrhiziens dans les phénomènes de reconnaissance et d'échanges de signaux chimiques entre la plante-hôte et ces microorganismes symbiotiques. On remarque que, curieusement, *Frankia* et les champignons endomycorrhiziens arbusculaires présentent certaines similitudes dont on peut tenir compte pour développer de futures recherches.

Summary.- As pioneer species for land revegetation, actinorrhizal plants are predisposed to form with mycorrhizal fungi symbiotic associations that are essential for plant growth as the associations they form with *Frankia*. As expected, mycorrhizas stimulate the development and the N₂-fixing activity of the actinorrhizal symbiosis by improving mineral nutrition of the host plant. In addition to mycorrhizas, actinorrhizal plants are also able to form a unique type of roots called « proteoid roots » or « cluster roots » in response to the detrimental effects of nutrient deficiencies in soil. As an alternative of mycorrhizas, cluster

roots are specialized roots capable of assisting plant growth in marginal, nutrient deficient soils. There is no competition between *Frankia* and mycorrhizal fungi for infection sites but extensive mycorrhizas can affect *Frankia* growth and the subsequent development of young lobes of actinorhizal nodules. By contrast, the presence of *Frankia in planta* has no incidence on mycorrhizal infection processus. With reference to *Alnus* and *Allocauarina* the possible implications of *Frankia* and mycorrhizal fungi on the mechanisms of recognition and chemical signalisation between the host plant and these microsymbionts are discussed. Strikingly, it should be noticed that *Frankia* and arbuscular endomycorrhizal fungi exhibit a number of similarities that could be taken into account for developing future research.

Key words : mycorrhiza - *Frankia* interactions - proteoid roots - cluster roots.

INTRODUCTION

Bien que l'actinomycète fixateur de N_2 *Frankia* soit incontestablement considéré comme le principal associé symbiotique des plantes actinorhiziennes, il n'est pas le seul microorganisme symbiotique de ce groupe de plantes. D'autres microorganismes telluriques, tels que les champignons mycorrhiziens, peuvent aussi vivre en parfaite symbiose avec les plantes actinorhiziennes. La présence simultanée de *Frankia* et de champignons mycorrhiziens sur la même plante hôte donne donc naissance à une symbiose multiple à trois partenaires ou même à quatre partenaires si les champignons endomycorrhiziens arbusculaires (AM) et ectomycorrhiziens (EM) existent simultanément sur le même système racinaire. Pour les plantes actinorhiziennes, cette symbiose multiple est d'autant plus indispensable que ces plantes sont essentiellement des espèces pionnières colonisant, avant beaucoup d'autres espèces végétales, les sols appauvris à la suite des travaux de l'homme ou d'une perturbation écologique : déblais miniers, inondations, incendies, éruptions volcaniques, etc.

Le rôle des champignons mycorrhiziens, en tant qu'associés naturels des végétaux pour permettre à ces derniers de s'adapter aux diverses contraintes imposées par l'environnement, est bien connu (Moiroud, ce fascicule). C'est probablement dans cette perspective que les premières plantes vas-

culaires colonisatrices de la terre, il y a environ 400 Ma, *Asteroxylon* et *Rhynia*, hébergeaient déjà dans leurs cellules des structures semblables à celles des champignons AM (Pirozynski et Malloch, 1975).

La capacité des mycorrhizes à remédier aux effets nuisibles des contraintes du sol, en particulier des carences nutritionnelles, est amplement discutée par Sylvia et Williams (1992). Pour les plantes actinorhiziennes porteuses de mycorrhizes, cette propriété est évidemment déterminante car leurs activités en tant que plantes fixatrices de N_2 ne peuvent être optimales qu'en l'absence de ces contraintes reconnues comme facteurs limitants de la fixation biologique de N_2 .

Pour ces raisons, on peut conclure que, par leur statut de plantes pionnières et par leur capacité à s'associer avec *Frankia* pour fixer N_2 , les plantes actinorhiziennes sont doublement prédisposées à entretenir avec les champignons mycorrhiziens des relations de type mutualiste aussi importantes que celles existant avec *Frankia*. Plusieurs informations concernant les mycorrhizes des plantes actinorhiziennes peuvent être trouvées dans la revue bibliographique de Gardner (1986).

A l'aide d'exemples tirés de la littérature la plus récente, nous nous proposons de réexaminer ce sujet en évaluant d'abord les capacités de ce groupe de plantes à maîtriser les facteurs adverses du sol et en analysant ensuite les interactions qui peuvent se produire entre les différents partenaires d'un

même système symbiotique, *i.e.* : plante-hôte, *Frankia* et champignon mycorhizien.

1. Les types de mycorhizes associés aux plantes actinorhiziennes

Bien que l'on n'ait pas examiné toutes les 260 espèces de plantes actinorhiziennes identifiées jusqu'à maintenant, on peut postuler qu'elles sont toutes plus ou moins capables de former des mycorhizes dans les conditions naturelles. Le tableau 1 montre que, à l'exception de certains genres des familles des Rhamnacées et des Rosacées qui n'ont pas pu être examinés, les plantes actinorhiziennes des autres genres hébergent non seulement des champignons AM mais aussi des champignons EM et parfois les deux types à la fois sur une même plante-hôte. La présence simultanée des ectomycorhizes et des endomycorhizes sur un

même système racinaire n'est pas exceptionnelle (Rose, 1980), ce qui suggère que l'installation préalable d'un type déterminé de mycorhize n'a pas induit de modifications physiologiques et chimiques notables dans la plante pour exclure l'infection de cette dernière par un autre type de mycorhizes pourvu que les deux partenaires soient compatibles.

1-1. Compatibilité du champignon symbiotique et de la plante-hôte

On a très peu de renseignements précis sur les déterminants génétiques de la spécificité des champignons EM ou AM vis-à-vis des plantes actinorhiziennes auxquelles ils sont associés.

Cependant, certaines observations suggèrent qu'il existe des relations de compatibilité évidentes entre d'une part certaines

Tableau 1.- Les types de champignons mycorhiziens associés aux plantes actinorhiziennes (selon Gardner, *MIR-CEN Journal*, 1986, 2, 147-160).

Table 1.- Types of mycorrhizal fungi associated with actinorhizal plants.

Famille	Genre	Types
Betulaceae	<i>Alnus</i>	EM, AM
Casuarinaceae	<i>Casuarina</i>	EM, AM
	<i>Allocasuarina</i>	EM, AM
Myricaceae	<i>Myrica</i>	EM, AM
	<i>Comptonia</i>	EM, AM
Elaeagnaceae	<i>Elaeagnus</i>	EM, AM
	<i>Hippophae</i>	AM
	<i>Shepherdia</i>	EM, AM
Rhamnaceae	<i>Ceanothus</i>	AM
	<i>Colletia</i>	AM
	<i>Discaria</i>	AM
	<i>Trevoa</i>	AM
	<i>Talguenea</i>	
	<i>Kentrothamnus</i>	
Datisceae	<i>Datisca</i>	AM
Rosaceae	<i>Purshia</i>	EM, AM
	<i>Dryas</i>	EM, AM
	<i>Cercocarpus</i>	EM, AM
	<i>Rubus</i>	AM
	<i>Chamaebatia</i> <i>Cowania</i>	
Coriariaceae	<i>Coriaria</i>	EM, AM

espèces de champignons ou certains types de champignons mycorhiziens, d'autre part une espèce de plante hôte (Molina, 1981). Par exemple, parmi plusieurs autres espèces de champignons EM testés par Godbout et Fortin, (1983), seul *Alpova diplophloeus* forme un réseau de Hartig régulier et complet dans le cortex racinaire d'*Alnus crispa* et *A. rugosa*, attestant ainsi l'établissement réussi d'une vraie symbiose entre les deux partenaires.

L'exemple le plus évident de l'existence d'une certaine compatibilité entre les types de champignons mycorhiziens et les plantes actinorhiziennes est celui des plantes du genre *Allocasuarina* qui sont associées préférentiellement aux champignons EM tandis que les plantes du genre *Casuarina* sont plutôt infectées par les champignons AM (Reddell *et al.*, 1986 ; Thoen *et al.*, 1990 ; Dell *et al.*, 1994). Thoen *et al.* (1990) et Dell *et al.* (1994) ont observé que le champignon EM *Pisolithus* ne formait, autour des racines de *Casuarina*, qu'une enveloppe fongique composée d'hyphes, croissant sur le rhizoderme et que ce champignon ne développait pas de réseaux de Hartig dans le cortex des racines infectées. Pour ces auteurs, ces caractéristiques résultent de la réaction d'hypersensibilité de *Casuarina* à l'infection fongique EM et suggèrent que les deux partenaires sont incompatibles. Selon Dell *et al.*, il est possible que le degré de compatibilité des signaux de reconnaissance entre *Pisolithus* et *Casuarina* soit insuffisant pour induire un développement complet de la mycorhization. Par contre, avec les plantes du genre *Allocasuarina*, les hyphes constituant le manteau fongique sont intimement attachés aux cellules du rhizoderme par un dépôt d'hydrates de carbone fibrillaires, indiquant ainsi qu'il existe une réelle affinité entre le champignon et la plante-hôte. Cette affinité s'est ensuite manifestée de manière plus évidente par la formation d'un vrai réseau de Hartig dans le cortex racinaire de cette plante.

En supposant que les champignons EM aient des affinités génétiques plus marquées pour les *Allocasuarina* que pour les *Casuarina*, on doit pouvoir comparer les teneurs en chitinases dans les racines infectées des plantes de ces deux genres car la production de ces enzymes est plus ou moins stimulée sous l'effet des différents inducteurs spécifiques d'origine fongique (Albrecht *et al.*, 1994).

On sait que les champignons AM n'ont pas une grande spécificité d'hôte et que presque tous les végétaux sont potentiellement très sensibles à l'infection AM. Il est donc étonnant de remarquer que les espèces *Comptonia peregrina* et *Myrica gale* croissant dans plusieurs sites des Etats-Unis, soient dépourvues d'infections AM ou seulement porteuses de mycorhizes non fonctionnelles (Berliner et Torrey, 1989 ; Crocker et Schwintzer, 1994). Dans ces deux cas, ou bien les espèces végétales mentionnées sont peu compatibles avec les champignons AM ou bien certaines propriétés physico-chimiques particulières du sol ont affecté le potentiel infectieux (diversité de la population fongique et nombre de propagules infectives) de ces champignons AM indigènes dans le sol. On peut aussi suggérer que, même pour un couple de plante et de champignon génétiquement compatibles, les différentes étapes du processus de la formation d'une mycorhize (voir ci-dessous) sont très assujetties à l'effet des pressions environnementales.

Ces exemples sont des modèles d'étude fort intéressants pour déterminer dans quelle mesure les facteurs édaphiques sont capables de modifier le processus de communication entre un champignon AM et sa plante-hôte. Dans les conditions environnementales favorables, la rencontre d'une plante avec un champignon AM compatible devrait aboutir à l'établissement d'une symbiose puisque, d'après la littérature récente, les champignons AM sont capables de distinguer les plantes-hôtes et des plantes non hôtes (Giovannetti *et al.*, 1994). En

présence de flavonoïdes (Gianinazzi *et al.*, 1989) ou d'autres substances encore non identifiées (Bécard *et al.*, 1995) contenues dans l'exsudat racinaire de la plante-hôte, les champignons AM sont stimulés et, d'après Bécard et Fortin (1988) et Giovannetti *et al.* (1994), la première manifestation du champignon qui reconnaît un hôte compatible est la morphogenèse différentielle des hyphes multiramifiés à l'approche de cet hôte. C'est probablement à ce stade que les hyphes subissent les premières modifications cytologiques nécessaires pour devenir physiologiquement infectifs.

1-2. Les myconodules

On a décrit plusieurs exemples d'associations originales d'une plante actinorhizienne avec un champignon tellurique pour former des excroissances racinaires appelées des myconodules. Le cas le plus étudié est celui des myconodules formés par *Penicillium nodosatum* ou par *P. janczewskii* sur *Alnus incana* et *A. glutinosa* (Van Dijk, 1984 ; Valla *et al.*, 1989). Ces myconodules ont une durée de vie très courte puisque le cytoplasme de l'hôte ainsi que les hyphes du champignon dégénèrent dès que la cellule végétale est complètement envahie par ce dernier (Sequerra *et al.*, 1995). On ignore encore la signification de ces formations sur les plans physiologique et écologique.

L'autre exemple original de myconodules de plantes actinorhiziennes est rapporté par Huguenin (1969) qui a observé en Nouvelle-Calédonie de petites protubérances sphériques ou pyriformes de 400-600 mm de diamètre, disposées en lignes le long des racines latérales de *Gymnostoma dephancheanum*. Dans ce cas de myconodules, le microorganisme endophyte est un champignon AM produisant vésicules et arbuscules intracellulaires. Très probablement, les caractéristiques très particulières du sol de la Nouvelle-Calédonie ont exercé une influence déterminante sur la morphologie inhabituelle de ce type de mycorhizes de *Gymnostoma dephancheanum*.

2. Pourquoi les plantes actinorhiziennes ont-elles besoin des mycorhizes ? Stratégies des plantes actinorhiziennes pour maîtriser les carences nutritionnelles du sol

En raison de leur rôle de plantes pionnières, les plantes actinorhiziennes sont capables de croître et de s'adapter aux conditions environnementales difficiles, en particulier aux effets du déficit hydrique et de la carence des nutriments dans le sol.

Sur le plan nutritionnel, les plantes pionnières ont surtout besoin d'azote pour croître. En l'absence de sources d'azote combiné dans le sol, les plantes actinorhiziennes pionnières acquièrent l'azote par l'intermédiaire des nodules qu'elles forment avec *Frankia* pour fixer l'azote de l'atmosphère. Mais ces nodules ne peuvent se développer et fixer N₂ que si la plante-hôte dispose, en plus de l'eau, de quantités suffisantes de phosphore, de calcium et d'oligoéléments impliqués dans le processus biochimique de la fixation N₂ (Sanginga *et al.*, 1989 ; Walker *et al.*, 1993).

Par conséquent, l'efficacité de la symbiose actinorhizienne fixatrice de N₂ dépend des potentialités que peut développer la plante-hôte pour acquérir ces éléments dont la carence est l'un des facteurs limitants majeurs bien connus de la fixation biologique de N₂. Pour améliorer l'absorption des éléments nutritifs difficilement accessibles dans le sol, en particulier le phosphore, le système racinaire de certaines plantes actinorhiziennes *e.g.* *Casuarina*, *Allocasuarina*, *Gymnostoma*, *Myrica* et *Comptonia* possède une propriété remarquable qui consiste à former soit des mycorhizes avec un champignon AM ou EM, soit un type de racines particulières appelées « racines protéoïdes » ou encore « racines en écouvillon ». Malajczuk et Lamont (1981) et Lamont (1981) considèrent respectivement les racines mycorhizées et les racines en écouvillon comme des racines spécialisées, les premières d'origine symbiotique et les secondes d'origine non symbiotique, que peuvent former certaines espèces végétales en

réponse à l'effet des carences nutritionnelles dans le sol.

2-1. Les racines spécialisées d'origine symbiotique : les mycorhizes

Lorsqu'une racine est colonisée par un champignon AM ou EM, elle devient une structure très particulière du fait de la présence de ce champignon qui existe à la fois sous forme endophytique et à l'état de vie extraracinaire, tout en étant rattaché à la racine support. Ce double mode de vie du symbiote fongique confère aux mycorhizes le rôle incontestable de lien étroitement établi entre la plante-hôte et le sol environnant. Il en résulte que les avantages apportés par les mycorhizes sont multiples, allant de la protection de la plante contre les pathogènes jusqu'à l'amélioration de l'absorption de l'eau dans le sol et la production *in planta* des substances de croissance pour la plante-hôte. Mais le rôle le plus tangible des mycorhizes d'une plante actinorhizienne est de fournir au système fixateur de N_2 de cette plante des éléments nutritifs qu'il ne peut acquérir lui-même.

On a montré que les nutriments apportés par les mycorhizes, en particulier P, étaient essentiellement utilisés par la plante actinorhizienne pour développer les nodules formés avec *Frankia* et pour effectuer les processus biochimiques de la fixation de N_2 . Aussi, comme pour les Légumineuses, l'augmentation de la biomasse des nodules des plantes actinorhiziennes par suite de l'inoculation avec des champignons AM ou EM est-elle très nette et rapportée dans de nombreuses publications (Diem et Gauthier, 1982 ; Rose et Youngberg, 1981 ; Visser *et al.*, 1981 ; Chartapaul *et al.*, 1989 ; Russo, 1989 ; Vasanthakrishna et Bagyaraj, 1989 ; Jha *et al.*, 1993 ; Fraga-Beddiar et Le Tacon, 1990 ; Miller *et al.*, 1992 ; Isopi *et al.*, 1994). Il en résulte que la fixation de N_2 par *Frankia* et la croissance de la plante-hôte sont également améliorées.

Ces exemples ont donc clairement montré que les plantes actinorhiziennes étaient

probablement très dépendantes des mycorhizes pour accomplir leur rôle de plantes fixatrices d'azote. De ce fait, on est alors tenté de dire que, pour les plantes actinorhiziennes croissant dans un environnement défavorable, la présence simultanée d'actinorhizes et de mycorhizes sur une même plante-hôte n'est pas le résultat d'un simple hasard mais qu'elle relève d'une nécessité vitale pour la plante-hôte. Autrement dit, l'association d'une plante actinorhizienne avec un champignon EM ou AM pour former une symbiose multipartite reflète l'image d'un système biologique normal dans la nature tandis qu'une plante actinorhizienne sans microsymbiote fongique représente un cas particulier plus ou moins défectueux.

Il faut enfin noter que les mycorhizes des plantes actinorhiziennes ne se bornent pas seulement, comme on vient de le voir, à stimuler l'activité fixatrice de N_2 de ces plantes. Par le réseau d'hyphes extraracinaires croissant au-delà de la rhizosphère de la plante-hôte et par des connections hyphales avec les racines d'autres plantes, les champignons mycorhiziens peuvent aussi transférer, soit l'azote sous forme de citrulline et de glutamine provenant de la fixation de N_2 par les plantes actinorhiziennes (Arnebrant *et al.*, 1993), soit l'azote libéré par les racines ou les nodules dans le sol (Frey et Schüepp, 1993 ; Ikram *et al.*, 1994) vers des plantes non fixatrices de N_2 du même site.

Ainsi, l'association de champignons mycorhiziens avec les plantes actinorhiziennes n'est donc pas seulement bénéfique pour ces dernières mais, elle peut être aussi un facteur permanent de distribution de l'azote dérivé de la fixation symbiotique et intervient, du moins partiellement, dans la nutrition azotée des plantes adjacentes non fixatrices de N_2 . Cette hypothèse suggère que l'association mycorhizes-plantes fixatrices de N_2 peut jouer, dans une certaine mesure, un rôle significatif dans la croissance des végétaux au sein d'un éco-

système aux ressources nutritionnelles limitées : savanne, sol forestier dégradé, etc.

2-2. Les racines spécialisées d'origine non symbiotique : les racines en écouvillon

Ce type de racines a été décrit pour la première fois par Purnell (1960) sous le nom de « racines protéoïdes » en raison de sa présence nombreuse et fréquente dans le système racinaire des plantes de la famille des Protéacées. On a vu ensuite que d'autres végétaux produisaient aussi ce type de racines en réponse à la déficience de certains nutriments dans le sol. L'expression de « racines en écouvillon » (« cluster roots » ou littéralement « racines en touffes ») est donc maintenant préférable à l'ancienne appellation et adoptée en raison de la disposition caractéristique des radicules, comme les poils d'un écouvillon, sur la racine parentale qui est généralement une racine latérale de la plante.

Les racines en écouvillon (RE) sont constituées de touffes de radicules à croissance limitée (2-4 mm de long) alignées de manière contiguë le long des génératrices définies par les pôles ligneux de la racine parentale. Selon le nombre de pôles ligneux dans la racine parentale, il y a donc plusieurs rangées de radicules émergeant perpendiculairement à l'axe de cette dernière (en moyenne 4 rangées dans le cas de *Casuarina*), chaque touffe peut contenir quelques dizaines à quelques centaines de radicules (Dell *et al.*, 1980). Cette multitude de radicules formées dans chaque touffe améliore évidemment la surface d'absorption du système racinaire. Selon Lamont (1993), pour un même poids de racines, les RE explorent 32,5 fois plus de sol que les racines normales. L'intérêt des RE ne réside pas seulement dans cette augmentation de la surface ou de la capacité d'exploration des racines mais aussi dans leur grand pouvoir d'excréter des protons, des acides organiques, et des substances réductrices ou chélatantes pour améliorer l'absorption des éléments peu solubles dans le sol (Gardner *et al.*, 1983 ; Marschner *et al.*, 1986 ; Ro-

senfield *et al.*, 1991 ; Johnson *et al.*, 1994 ; Jeschke et Pate, 1995). Les RE sont donc des systèmes très efficaces permettant aux plantes porteuses de croître dans les sols marginaux contenant peu de nutriments assimilables. Dans ces conditions, il n'est pas étonnant que plusieurs plantes actinorhiziennes pionnières des familles des Betulacées, Casuarinacées et Myricacées aient aussi la faculté de produire des RE pour croître dans les sols marginaux pauvres en nutriments assimilables (Diem *et al.*, 1981 ; Reddell *et al.*, 1986 ; Louis *et al.*, 1990 ; Racette *et al.*, 1990 ; Crocker et Schwintzer, 1993, 1994 ; Berliner et Torrey, 1989).

Pour plusieurs auteurs (Malajczuk *et al.*, 1981 ; Crocker et Schwintzer, 1993), les RE sont des systèmes racinaires spécialisés que les plantes produisent pour remplacer les mycorhizes en cas d'absence de champignons mycorhiziens efficaces dans le sol ou en cas d'échec de l'infection mycorhizienne. Berliner et Torrey (1989) et Crocker et Schwintzer (1994) ont remarqué que les plantes *Comptonia peregrina* et *Myrica gale* non mycorhizées aux Etats-Unis produisaient toutes des RE.

Il est bien admis maintenant que les RE des plantes actinorhiziennes sont induites par les carences de phosphore (Louis et Torrey, 1990 ; Crocker et Schwintzer, 1993) et de fer (Arahou et Diem, 1996) assimilables dans le sol. On connaît bien aussi le mécanisme de l'ontogenèse des radicules des RE lequel est identique à celui des racines latérales normales, c'est-à-dire que ces radicules sont issues de la différenciation des cellules du péricycle de la racine parentale, le point d'émergence de ces radicules se trouvant en face de chaque pôle ligneux. Il reste la question de savoir comment un déséquilibre physiologique causé par une carence en P ou en Fe dans les tissus de la plante-hôte peut activer, en de nombreux points successifs et bien définis sur la racine parentale, le ou les gènes de la différenciation cellulaire au niveau du péricycle pour donner naissance à une multi-

tude de racelles tout autour de cette racine parentale.

3. Les interactions actinorhizes-mycorhizes

3.1 Impact sur le processus d'infection de la plante-hôte par *Frankia* et par le champignon mycorhizien

En dehors de l'augmentation de la biomasse nodulaire due à l'amélioration de la nutrition minérale de la plante, on connaît encore très mal l'effet des interactions *Frankia*-champignons mycorhiziens sur le processus d'infection des plantes actinorhiziennes par ces deux groupes de microsymbiotes. Bien que les travaux de Sempalalan *et al.* publiés récemment (1995) aient indiqué qu'il n'y avait pas d'interaction compétitive entre *Frankia* et le champignon AM *Glomus fasciculatum* pour la nodulation et la mycorhization de *C. equisetifolia*, l'étude des interactions entre les partenaires de la symbiose actinorhizienne reste toujours ouverte.

Plusieurs questions sont encore sans réponses actuellement :

- Sous l'effet des mycorhizes, l'exsudat racinaire de la plante-hôte stimule-t-il ou affecte-t-il la germination des spores ou la croissance des hyphes infectants de *Frankia* dans les sites d'infection ? Contient-il des inducteurs spécifiques de facteurs *nod* des différentes souches de *Frankia* ?

- En modifiant la physiologie de la racine infectée, les mycorhizes peuvent-elles influencer le processus de déformation des poils absorbants induit par les facteurs *nod* émis par *Frankia* au stade de pré-infection ?

- Contrairement aux nodules des Légumineuses, les nodules actinorhiziens sont des structures anatomiquement proches des racines et sont pérennes grâce à la multiplication successive de nouveaux lobes nodulaires. Les mycorhizes interviennent-elles dans la morphogenèse de ces nouveaux lobes par l'intermédiaire des phytohormones qu'elles produisent *in planta* ?

Les travaux sur les interactions entre *Frankia* et les champignons mycorhiziens pendant le processus d'infection de la plante-hôte sont encore très rares. A notre connaissance, jusqu'à maintenant, seuls Godbout et Fortin (1983), en étudiant l'infection simultanée de l'aune par *Frankia* et le champignon EM *Alpova diplophloeus*, ont apporté des indications précises sur le comportement de ces microorganismes soumis à l'effet des activités spécifiques de l'un et de l'autre.

Selon ces auteurs, la présence de *Frankia* déjà bien installée à la base d'un jeune nodule actinorhizien n'empêche pas l'infection de ce dernier par *A. diplophloeus* qui est même capable de former un manteau fongique et un réseau de Hartig pénétrant dans le cortex nodulaire. Cette observation suggère que le mécanisme de reconnaissance entre *A. diplophloeus* et l'aune ainsi que le processus de la mycorhization de cette plante n'ont pas été perturbés par la présence de *Frankia*. De plus, *A. diplophloeus* agit comme s'il ne reconnaissait pas le nodule actinorhizien en tant que structure spécialisée. Pour ce champignon mycorhizien, le nodule d'aune n'est qu'une simple racine de la plante-hôte. Cette remarque est en accord avec la théorie selon laquelle le nodule actinorhizien n'est qu'une racine modifiée alors que le nodule des Légumineuses est un organe bien défini (voir Duhoux *et al.*, ce fascicule).

Dans cette même expérience de Godbout et Fortin, contrairement au développement du champignon mycorhizien, la croissance de *Frankia* dans le jeune nodule mycorhizé est complètement inhibée, ce qui arrête la progression acropète de *Frankia* dans les tissus nodulaires. En cas de compétition donc, le champignon mycorhizien pourrait induire dans son voisinage des changements physiologiques et biochimiques importants de telle manière que la symbiose actinorhizienne, même déjà installée, ne peut se développer jusqu'à son terme.

Sous l'effet de la mycorrhization, la composition chimique de l'exsudat racinaire peut être aussi fortement modifiée. On ne connaît pas encore l'impact de ce phénomène sur le rôle des flavonoïdes exsudés par la plante-hôte pour activer les gènes *nod* de *Frankia*. Mais il est possible que, par analogie, les exemples d'interactions entre *Rhizobium* et les champignons mycorrhiziens des Légumineuses s'appliquent aussi aux microsymbiotes de la symbiose actinorhizienne.

Selon Bâ *et al.* (1994), l'infection débute d'une racine d'*Acacia holosericea* par *Pisolithus* n'est pas encore en mesure d'affecter les signaux chimiques de la nodulation échangés entre cette plante et sa bactérie symbiote *Bradyrhizobium*, d'où la formation du méristème nodulaire observé dans les sites d'infection bactérienne. Mais cette mycorrhization, même au stade débute, est déjà capable d'inhiber la multiplication des cellules de *Bradyrhizobium* dans les cordons infectieux qui sont des structures d'invasion bactérienne à l'intérieur de l'hôte. Au stade de mycorrhization avancée, ces auteurs n'ont observé dans les sites d'inoculation avec *Bradyrhizobium* ni méristème nodulaire ni cordons infectieux, ce qui suggère que dans ce cas, même le mécanisme précoce d'activation des gènes *nod* de *Bradyrhizobium* a été affecté probablement à cause des modifications biochimiques dans le système racinaire de la plante-hôte. Pour étayer cette hypothèse, il faut signaler que plusieurs auteurs (Duc *et al.*, 1989 ; Bradbury *et al.*, 1993 ; Xie *et al.*, 1995) ont déjà apporté la preuve que, dans le cas des Légumineuses, les processus biochimiques conduisant à la nodulation d'une part et à la mycorrhization d'autre part, seraient déterminés par un système génétique commun.

Il est bien connu que les plantes actinorhiziennes du genre *Allocasuarina* nodulent peu et de manière très irrégulière dans la nature bien que ces plantes, beaucoup moins spécifiques que les *Casuarina*, puissent être

infectées indifféremment par diverses souches de *Frankia* issues des *Casuarinacées*. Les causes de ce comportement des *Allocasuarina* ne sont pas connues. Reddell *et al.* (1986) ont attribué cette observation apparemment contradictoire à l'effet des facteurs limitants tels que la carence en phosphore dans le sol. Mais étant donné que les *Allocasuarina* sont naturellement très ectomycorhizés (Reddell *et al.*, 1986), il est probable aussi que l'irrégularité de leur nodulation soient due au dérèglement des systèmes de reconnaissance et d'infection de ces plantes par *Frankia* sous l'effet d'une mycorrhization précoce ou d'autres facteurs d'origine édaphique encore non identifiés.

3-2. Compétition nutritionnelle entre les microorganismes symbiotiques *in planta*

Après la phase d'infection, la bactérie fixatrice de N_2 et le champignon mycorrhizien se développent concurremment en exploitant les mêmes sources d'éléments nutritifs. Leur multiplication *in planta* et leurs activités spécifiques ne peuvent s'effectuer de manière optimale que si les nutriments, en particulier les hydrates de carbone sont disponibles. Bayne *et al.* (1984) ont rapporté que la carence en sucres, causée par l'insuffisance photosynthétique de la plante-hôte peut affecter à la fois le développement des mycorrhizes et des nodules fixateurs de N_2 . Parallèlement, il a été montré que les hyphes de champignon mycorrhizien AM ne pouvaient envahir les tissus centraux de nodules des Légumineuses qu'au moment de la sénescence des bactéroïdes de *Rhizobium* (Baird et Caruso, 1994). Selon Bethlenfalvay *et al.* (1985), l'une des raisons de l'absence d'hyphes de champignons mycorrhiziens dans les nodules encore fonctionnels serait liée à la forte compétition exercée par *Rhizobium* qui a besoin de sucres comme sources d'énergie pour fixer N_2 .

Plus précisément, il est bien connu que plus la mycorrhization et la nodulation sont importantes, plus la teneur en sucres dans les racines est faible.

Avec le supplément de P apporté par les mycorhizes, les activités métaboliques s'intensifient aussi bien au niveau des racines mycorhizées que dans les nodules, d'où une demande plus grande de sucres par le champignon mycorhizien et par le microsymbiote fixateur de N_2 . D'une manière générale, la plante-hôte peut satisfaire le coût énergétique imposé par les deux symbioses (Kucey et Paul, 1982) ou bien la compétition entre les partenaires symbiotiques pour les sucres dans les racines affecte seulement le développement des racines sans diminuer la production de la biomasse des parties aériennes (Bethlenfalvay *et al.*, 1985). Mais, dans certains cas, on a observé une diminution de la croissance de la plante-hôte à la suite de la mycorhization. Cet effet dépressif est attribué à la compétition pour le carbone provoquée par l'accroissement des activités métaboliques de la symbiose à la suite d'un apport excessif de P. Puisque les teneurs en P et en C varient inversement dans une symbiose (Bethlenfalvay *et al.*, 1985), une bonne coordination des activités des microsymbiotes au sein de la symbiose actinorhizienne à plusieurs partenaires (Sempavalan *et al.*, 1995) dépend essentiellement de l'équilibre entre l'apport de P par les mycorhizes et la disponibilité des sucres que la plante-hôte peut fournir à ses microsymbiotes.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Nul doute que les mycorhizes constituent un atout indispensable pour les plantes actinorhiziennes, plus précisément un support naturel incontournable pour des espèces qui ont de grandes exigences en phosphore pour fixer l'azote. Au cas où les champignons mycorhiziens indigènes dans le sol sont peu infectifs ou peu efficaces, certaines plantes

actinorhiziennes peuvent encore acquérir les éléments nutritifs peu accessibles dans le sol en formant un type spécial de racines, dites racines en écouvillon, qui sont des structures de substitution à l'absence des mycorhizes. Il n'est donc pas étonnant que les plantes actinorhiziennes soient de précieuses plantes pionnières puisqu'elles disposent de plusieurs systèmes biologiques *e.g.* actinorhizes, mycorhizes et/ou racines en écouvillon pour acquérir des éléments nutritifs nécessaires à leur croissance dans un environnement pauvre et parfois hostile.

On connaît déjà bien l'intérêt des mycorhizes pour ce groupe de plantes, surtout en ce qui concerne leurs effets stimulants de la fixation biologique de N_2 mais les recherches sur les interactions entre les différents partenaires de la symbiose multipartite sont très en retard.

Curieusement, on remarque que les microsymbiotes des plantes actinorhiziennes, par exemple *Frankia* et les champignons AM, présentent certaines similitudes : (1) propagules infectantes sous forme d'hyphes et de spores germant dans la rhizosphère, (2) modes de survie et de multiplication en dehors de la plante-hôte probablement identiques, (3) aptitude symbiotique avec des espèces végétales appartenant à des familles très variées et parfois classées parmi les plus primitives et enfin, (4) microorganismes symbiotiques obligatoires ou ayant une tendance très marquée pour cette forme de vie. En raison de ces caractères communs, certains problèmes posés par *Frankia* et les champignons AM peuvent être traités parallèlement. Il est possible que les résultats obtenus soient complémentaires et contribuent efficacement à faire progresser nos connaissances en ce qui concerne l'écologie, la physiologie et la génétique de ces microorganismes.

BIBLIOGRAPHIE

- Albrecht C., T. Burgess, B. Dell & F. Lapeyrie, 1994.- Chitinase and peroxidase activities are induced in eucalyptus roots according to aggressiveness of Australian ectomycorrhizal strains of *Pisolithus* sp. *New Phytol.*, **127**, 217-222.
- Arahou M. & H.G. Diem, 1997.- Induction of cluster (proteoid) root formation in *Casuarina glauca* by iron deficiency. *Plant and Soil* (sous presse).
- Arnebrant K., H. Ek, R.D. Finlay & B. Söderström, 1993.- Nitrogen translocation between *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. seedlings inoculated with *Frankia* sp. and *Pinus contorta* Doug. ex Loud seedlings connected by a common ectomycorrhizal mycelium. *New Phytol.*, **124**, 231-242.
- Bá A.M., B. Balaji, Y. Piché, 1994.- Effect of time of inoculation on *in vitro* ectomycorrhizal colonization and nodule initiation in *Acacia holosericea* seedlings. *Mycorrhiza*, **4**, 1519-1525.
- Baird L.M. & K.J. Caruso, 1995.- Development of root nodules in *Phaseolus vulgaris* inoculated with rhizobium and mycorrhizal fungi. *Int. J. Plant Sci.*, **155**, 633-639.
- Bayne H.G., M.S. Brown, G.J. Bethlenfalvay, 1984.- Defoliation effects on mycorrhizal colonization, nitrogen fixation and photosynthesis in the *Glycine-Glomus-Rhizobium* symbiosis. *Physiol Plant*, **62**, 576-580.
- Bécard G., L.P. Taylor, D.D. Douds, P.E. Pfeffer & L.W. Doner, 1995.- Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *MPMI*, **8**, 252-258.
- Bécard G., J.A. Fortin, 1988.- Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.*, **108**, 211-218.
- Berliner R. & J.G. Torrey, 1989.- On tripartite *Frankia*-mycorrhizal associations in the *Myricaceae*. *Can. J. Bot.*, **67**, 1708-1712.
- Bethlenfalvay G.J., M.S. Brown & A.E. Stafford, 1985.- *Glycine-Glomus-Rhizobium* symbiosis. Antagonistic effects between mycorrhizal colonization and nodulation. *Plant Physiol.*, **79**, 1054-1058.
- Bradbury S.M., R.L. Peterson & S.R. Bowley, 1993.- Further evidence for a correlation between nodulation genotypes in alfalfa (*Medicago sativa* L.) and mycorrhiza formation. *New Phytol.*, **124**, 665-673.
- Chartapaul L., P. Chakravarty & P. Subramaniam, 1989.- Studies in tetrapartite symbioses. *Plant and Soil*, **118**, 145-150.
- Crocker L.J. & C.R. Schwintzer, 1993.- Factors affecting formation of cluster roots in *Myrica gale* seedlings in water culture. *Plant and Soil*, **152**, 287-298.
- Crocker L.J. & C.R. Schwintzer, 1994.- Soil conditions affect the occurrence of cluster roots in *Myrica gale* L. in the field. *Soil Biol. Biochem.*, **26**, 615-622.
- Dell B., J. Kuo & G.J. Thomson, 1980.- Development of proteoid roots in *Hakea obliqua* R. Br. (*Proteaceae*) grown in water culture. *Aust. J. Bot.*, **28**, 27-37.
- Dell B., N. Malajczuk, N.L. Bougher & G. Thomson, 1994.- Development and function of *Pisolithus* and *Scleroderma*, *Casuarina* and *Eucalyptus*. *Mycorrhiza*, **5**, 129-138.
- Diem H.G., I. Gueye, V. Gianinazzi-Pearson, J.A. Fortin & Y.R. Dommergues, 1981.- Ecology of VA mycorrhizae in the tropics : the semi-arid zone of Senegal. *Oecol. Plant.*, **2**, 53-62.
- Diem H.G. & D. Gauthier, 1982.- Effet de l'infection endomycorrhizienne (*Glomus mosseae*) sur la nodulation et la croissance de *Casuarina equisetifolia*. *C.R. Acad. Sci., sér. C.*, **294**, 215-218.
- Duc G., A. Trouvelot, V. Gianinazzi-Pearson, S. Gianinazzi, 1989.- First report of non-mycorrhizal plant mutants (Myc) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant Science*, **60**, 215-222.
- Fraga-Beddiar A., F. Le Tacon, 1990.- Interactions between a VA Mycorrhizal Fungus and *Frankia* associated with Alder [*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.]. *Symbiosis*, **9**, 247-258.
- Frey B., H. Schüepp, 1993.- Arole of vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal fungi in facilitating interplant nitrogen transfer. *Soil Biol. Biochem.*, **25**, 651-658.
- Gardner I.C., 1986.- Mycorrhizae of actinorhizal plants. *Mircen Journal*, **2**, 147-160.
- Gardner W.K., D.G. Parbery & D.A. Barber, 1982.- The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. I. Some characteristics of the soil/root interface. *Plant and Soil*, **68**, 19-32.
- Gianinazzi-Pearson V., B. Branzanti & S. Gianinazzi, 1989.- *In vitro* enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis*, **7**, 243-255.
- Giovannetti M., C. Sbrana & C. Logi, 1994.- Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, **127**, 703-709.
- Godbout C., J.A. Fortin, 1983.- Morphological features of synthesized ectomycorrhizae of *Alnus crispa* and *A. rugosa*. *New Phytol.*, **94**, 249-262.
- Huguenin B., 1969.- Les nodules mycorrhiziens du *Casuarina deplancheana* de Nouvelle-Calédonie. *Thèse 3ème cycle*, Univ. Rouen.
- Ikram A., E.S. Jensen & I. Jakobsen, 1994.- No significant transfer of N and P from *Pueraria phaseoloides* to *Hevea Brasiliensis* via hyphal links of arbuscular mycorrhiza. *Soil Biol. Biochem.*, **26**, 1541-1547.
- Isopi R., E. Lumini, M. Frattagiani, G. Puppi, M. Bosco, F. Favilli & E. Buresti, 1994.- Inoculation of *Alnus cordata* with selected microsymbionts : effects of *Frankia* and *Glomus* spp. on seedling growth and development. *Symbiosis*, **17**, 237-245.
- Jeschke W.D. & J.S. Pate, 1995.- Mineral nutrition and transport in xylem and phloem of *Banksia prionotes* (*Proteaceae*), a tree with dimorphic root morphology. *J. Exp. Bot.*, **46**, 895-905.
- Jha D.K., G.D. Sharma & R.R. Mishra, 1993.- Mineral nutrition in the tripartite interaction between *Frankia*,

- Glomus* and *Alnus* at different soil phosphorus regimes. *New Phytol.*, **123**, 307-311.
- Johnson J.F., D.L. Allan & C.P. Vance, 1994.- Phosphorus stress-induced proteoid roots show altered metabolism in *Lupinus albus*. *Plant Physiol.*, **104**, 657-665.
- Kucey R.M.N. & E.A. Paul, 1982.- Carbon flow, photosynthesis, and N_2 fixation in mycorrhizal and nodulated faba beans (*Vicia faba* L.). *Soil Biol. Biochem.*, **14**, 407-412.
- Lamont B.B. 1981.- Specialized roots of non-symbiotic origin in heathlands. In: *Heathlands and Related Shrublands of the World*, B. Analytical Studies, Specht R.L. (Ed.), Elsevier, Amsterdam, 183-195.
- Lamont B.B., 1993.- Why are hairy root clusters so abundant in the most nutrient-impooverished soils of Australia? *Plant and Soil*, **155-156**, 269-272.
- Louis I., S. Racette & J.G. Torrey, 1990.- Occurrence of cluster roots on *Myrica cerifera* L. (*Myricaceae*) in water culture in relation to phosphorus nutrition. *New Phytol.*, **115**, 311-317.
- Malajczuck N. & B.B. Lamont, 1981.- Specialized roots of symbiotic origin in heathlands. In: *Heathlands and Related Shrublands of the World*, B. Analytical Studies. Specht R.L. (Ed.), Elsevier, Amsterdam, 165-182.
- Marschner H., V. Römheld, W.J. Horst & P. Marin, 1986.- Root-induced changes in the rhizosphere: importance for the mineral nutrition of plants. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.*, **149**, 441-456.
- Miller S.L., C.D. Koo, R. Molina, 1992.- Early colonization of red alder and Douglas fir by ectomycorrhizal fungi and *Frankia* in soils from the Oregon coast range. *Mycorrhiza*, **2**, 53-61.
- Molina R., 1981.- Ectomycorrhizal specificity in the genus *Alnus*. *Can. J. Bot.*, **59**, 325-334.
- Pirozynski K.A., D.W. Malloch, 1975.- The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *BioSystems*, **6**, 153-164.
- Purnell H.M., 1960.- Studies of the family *Proteaceae*. I. Anatomy and morphology of the roots of some Victorian species. *Aust. J. Bot.*, **8**, 38-50.
- Racette S., I. Louis & J.G. Torrey, 1990.- Cluster root formation by *Gymnostoma papuanum* (*Casuarinaceae*) in relation to aeration and mineral nutrient availability in water culture. *Can. J. Bot.*, **68**, 2564-2570.
- Reddell P., G.D. Bowen & A.D. Robson, 1986.- Nodulation of *Casuarinaceae* in relation to host species and soil properties. *Aust. J. Bot.*, **34**, 435-444.
- Rose S.L., 1980.- Mycorrhizal associations of some actinomycete nodulated nitrogen-fixing plants. *Can. J. Bot.*, **58**, 1449-1454.
- Rose S.L. & C.T. Youngberg, 1981.- Tripartite associations in snowbrush (*Ceanothus velutinus*): effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on growth, nodulation and nitrogen fixation. *Can. J. Bot.*, **59**, 34-39.
- Rosenfield C.L., D.W. Reed & M.W. Kent, 1991.- Dependence of iron reduction on development of a unique root morphology in *Ficus benjamina* L. *Plant Physiol.*, **95**, 1120-1124.
- Russo R.O., 1989.- Evaluating alder-endophyte (*Alnus acuminata*-*Frankia*-*Mycorrhizae*) interactions. *Plant and Soil*, **118**, 151-155.
- Sanginga N., S.K.A. Danso & G.D. Bowen, 1989.- Nodulation and growth response of *Allocauarina* and *Casuarina* species to phosphorus fertilization. *Plant and Soil*, **118**, 125-132.
- Sempavalan J., C.T. Wheeler & J.E. Hooker, 1995.- Lack of competition between *Frankia* and *Glomus* for infection and colonization of roots of *Casuarina equisetifolia* (L.). *New Phytol.*, **130**, 429-436.
- Sequeria J., A. Cappellano, V. Gianinazzi-Pearson & A. Moiroud, 1995.- Ultrastructure of cortical root cells of *Alnus incana* infected by *Penicillium nodosatum*. *New Phytol.*, **130**, 545-555.
- Sylvia D.M. & S.E. Williams, 1992.- Vesicular-arbuscular *Mycorrhizae* and environmental stress *Mycorrhizae* in sustainable agriculture. *American Soc. Agro., Spec. Publ.*, **54**, 101-124.
- Thoen D., B. Sougoufara & Y. Dommergues, 1990.- *In vitro* mycorrhization of *Casuarina* and *Allocauarina* species by *Pysolithus* isolates. *Can. J. Bot.*, **68**, 2537-2542.
- Valla G., A. Capellano, R. Huguenev & A. Moiroud, 1989.- *Penicillium nodosatum* Walla, a new species inducing mycorrhizae on *Alnus* roots. *Plant and Soil*, **114**, 142-146.
- Van Dijk C. 1984.- Ecological aspects of spore formation in the *Frankia*-*Alnus* symbiosis. *Ph. D. Thesis*, Univ. Leiden, 154.
- Vasanthakerishna M. & D.J. Bagyaraj, 1993.- Selection of efficient VA mycorrhizal fungi for inoculating *Casuarina equisetifolia*. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, **7**, 177-180.
- Visser S., R.M. Danielson & D. Parkinson, 1991.- Field performance of *Elaeagnus commutata* and *Speperdia canadensis* (*Elaeagnaceae*) inoculated with soil containing *Frankia* and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.*, **69**, 1321-1328.
- Walker R.B., P. Chowdappa & S.P. Gessel, 1993.- Major element deficiencies in *Casuarina equisetifolia*. *Fertilizer Research*, **34**, 127-133.
- Xie Z.P., C. Staehelin, H. Vierheilig, A. Wiemken, S. Jabbouri, W.J. Broughton, R. Vögeli-Lange & T. Bolter, 1995.- Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and non nodulating soybean. *Plant Physiol.*, **108**, 1519-1525.

Le nodule actinorhizien

par Emile Duhoux (^{1,2}), Diaga Diouf (²), Hassen Gherbi (²), Claudine Franche (²), Jeanne Ahée (²), et Didier Bogusz (²)

(^{1,2}) Université Paris 7, D. Diderot et (²) Laboratoire des Biotechnologies,
Symbioses Forestières Tropicales (BSFT, ORSTOM-CIRAD/Forêt),
45bis, avenue de La-Belle-Gabrielle, F-94736 Nogent-sur-Marne

Résumé. - Les nodules actinorhiziens ou actinorhizes représentent l'exemple le plus typique de racines modifiées (lobes nodulaires), non pathogènes, induites par des signaux émis par le microsymbiote. La formation d'un lobe nodulaire se réalise selon quatre étapes : infection du poil absorbant par *Frankia*, formation du pré-nodule, initiation et infection des lobes nodulaires. Le lobe nodulaire se structure selon un gradient qui est déterminé à la fois par la croissance acropète de *Frankia* et par la différenciation des tissus mis en place par le méristème apical conduisant ainsi à la distinction de quatre zones principales. D'après notre étude de l'expression des gènes *nif* du *Frankia*, déterminée par hybridation *in situ*, il apparaît que la zone des cellules matures infectées par *Frankia* (zone III) correspond à la zone où la fixation de l'azote est la plus grande. Les similitudes et les différences avec l'organogenèse des nodules des légumineuses sont présentées et l'intérêt de cette symbiose fixatrice d'azote primitive est souligné.

Summary. - Actinorhizal nodules or actinorhizae represent the most typical example of modified non pathogenic roots (nodule lobes), induced by signals synthesized by the microsymbiont. The formation of a nodule lobe occurs in four steps : infection of the root hair by *Frankia*, formation of the pre-nodule, initiation and nodule lobe infection. The nodule lobe comprises four distinct zones which are the result of the *Frankia* acropetal growth and of the differentiation of tissues originating from the apical meristem. *In situ* hybridization studies of the expression of *nif* genes of *Frankia* show that the zone of infected mature cells (zone III) is the zone where the nitrogen fixation is the greatest. Similarities and differences with organogenesis of the nodules of legumes are displayed and the interest of this primitive symbiosis is emphasized.

Key words : actinorhizal - nodule - *nif* gene - rhizogenesis - symbiosis.

INTRODUCTION

Environ 260 plantes non-légumineuses, appartenant à 8 familles différentes établissent une association symbiotique avec un actinomycète fixateur d'azote, *Frankia*. Dans ces associations, une structure originale, le nodule, est formée sur le système racinaire de la plante après un processus complexe d'interactions cellulaires et moléculaires entre la plante-hôte et le microorganisme. Comme chez les Légumineuses, le nodule actinorhizien est le siège de la réduction de l'azote moléculaire N_2 en ammoniac qui est ensuite assimilé par la plante sous forme d'acides aminés.

Bien que différents types de nodules, induits soit par *Rhizobium*, soit par *Frankia* aient la même fonction (fixation de l'azote et assimilation de l'ammoniac), il existe une grande variation dans leur développement et leur morphologie finale. Contrairement aux Légumineuses, le nodule des plantes actinorhiziennes n'est pas un organe nouveau, mais une racine latérale modifiée. Alors que le microsymbiote *Rhizobium* est, au moins initialement, morphologiquement peu différencié, l'actinomycète *Frankia* est un organisme multicellulaire, comprenant dans des conditions d'azote limitantes une structure complexe faite d'hyphes, de sporanges, de spores et de vésicules symbiotiques. D'une manière générale, on peut dire que les nodules des plantes actinorhiziennes diffèrent sensiblement dans la morphologie, le développement, et l'anatomie de ceux observés chez les Légumineuses.

Dans cet article, nous essaierons de souligner les spécificités de l'organogenèse des nodules actinorhiziens. A travers les différents travaux effectués, il semble se dégager un consensus général sur les événements essentiels à la mise en place du nodule. Cette synthèse permettra de faire le point sur les connaissances de base acquises dans ce domaine et fournira le support structural indispensable aux études qui sont

actuellement développées sur la régulation des gènes symbiotiques actinorhiziens. Cette question est particulièrement importante si on souhaite manipuler les plantes d'intérêt agronomique non-légumineuses et les associer à des bactéries fixatrices d'azote dans une symbiose effective.

1- Développement du nodule actinorhizien

1-1 - Morphologie du nodule

Les nodules des plantes actinorhiziennes sont des structures coralloïdes composées de multiples lobes nodulaires. Ces lobes peuvent être finement ramifiés comme chez *Myrica* ou *Ceanothus* ou bien massifs et plus ou moins soudés comme chez l'aulne. Les nodules sont pérennes et peuvent atteindre chez *Allocasuarina* près de 50 cm de diamètre (Dommergues, comm. pers.). Le poids des nodules représente parfois 1 à 3 % de la biomasse des arbres. Dans un peuplement d'aulnes de 20 ans, le poids sec des nodules est compris entre 80 et 400 kg/ha (Akkermans, 1978).

On peut distinguer deux types morphologiques de nodules selon la présence ou l'absence de racines nodulaires. Le type *Alnus* est dépourvu de racines nodulaires. Le type *Myrica* possède des nodules où chaque lobe nodulaire est prolongé dans sa partie distale par une racine dite nodulaire. La racine nodulaire ne renferme pas de microsymbiote et n'intervient donc pas dans la fixation d'azote. Elle possède un aérénchyme bien développé, une coiffe réduite, et est dépourvue de poils absorbants. Les racines nodulaires, qui présentent généralement un fort géotropisme négatif, s'allongent de 5 à 6 cm puis s'arrêtent de croître. De nombreux résultats expérimentaux ont établi leur rôle dans la facilitation de la diffusion de l'oxygène et des gaz dans le lobe nodulaire, lorsque les nodules sont placés sous de faibles tensions d'oxygène (Callahan et Torrey, 1977 ; Tjepkema, 1978 ; Schwintzer et Lancelle, 1983). Il est intéressant de souligner que, dans une même

famille, les Casuarinacées, on observe des nodules avec (genre *Casuarina*, Pl. I, fig. 1) ou sans (genre *Allocasuarina*, Pl. I, fig. 2) racines nodulaires.

1-2 - Le nodule actinorhizien est une racine adventive modifiée

Le lobe nodulaire, qui représente l'unité élémentaire du nodule, possède une structure typique de racine avec une vascularisation centrale, entourée d'un endoderme, d'un cortex et d'un périderme. Seuls, certains massifs cellulaires du cortex, et de manière dissymétrique par rapport à l'axe du lobe, sont envahis par les hyphes du microsymbiote *Frankia*.

Par leur site d'origine, les lobes nodulaires s'apparentent aux racines latérales puisque leurs primordia sont initiés dans le péricycle et se situent toujours à l'opposé des pôles de protoxylème (Callaham et Torrey, 1977). Ils en diffèrent cependant par deux caractéristiques. Tout d'abord, les cellules corticales de la racine situées à l'extérieur de chaque primordium de lobe sont stimulées pour entrer en division et les cellules ainsi régénérées sont incorporées au jeune lobe en formation (Callaham et Torrey, 1977). Ensuite, le nombre des nodules initiés sur des racines d'aulne est plus grand que celui des racines latérales sur des plantes non inoculées (Angulo Carmona, 1974). Les nodules ne sont donc pas des racines latérales ordinaires mais des organes qui apparaissent en position adventive, c'est-à-dire entre les racines latérales ordinaires. Les lobes nodulaires correspondent donc à des racines adventives modifiées, directement soumises à l'induction et au contrôle exercé par les signaux émis directement ou indirectement par *Frankia*. Même si les mécanismes moléculaires mis en jeu ne sont pas encore élucidés (voir Pawlowski *et al.*, Bogusz *et al.*, ce fascicule), l'étude de l'ontogenèse des nodules va permettre d'aborder les interactions structurales plante-microorganisme de cette symbiose.

1-3 - Processus d'infection

On trouve deux grandes voies d'infection chez les plantes actinorhiziennes ; une voie intracellulaire par les poils absorbants et une voie intercellulaire (Quispel et Burggraaf, 1979 ; Berry et Sunell, 1990 ; Baker et Mullin, 1992). Il est à noter que la même souche de *Frankia* peut, dans certains cas, infecter par des voies différentes, des hôtes d'espèces différentes, indiquant par là qu'un mécanisme génétique de l'infection est sous le contrôle de la plante-hôte.

1-3-1 - Infection par l'intermédiaire des poils absorbants racinaires (Fig. 1)

Ce processus d'infection comprend quatre phases principales :

- La première correspond à la pénétration de *Frankia* dans les poils absorbants. L'infection intracellulaire a été décrite dans les genres *Myrica*, *Comptonia*, *Alnus* et *Casuarina* (Berry et Sunell, 1990). Le site d'infection se situe, le plus souvent, à la base d'une racine latérale. Sous l'influence du *Frankia*, les poils absorbants très jeunes, situés à l'apex de la racine latérale, se déforment (Pizelle, 1972). Les déformations sont provoquées entre quelques heures chez l'aulne (Prin et Rougier, 1987) et 24 à 48 heures après l'inoculation chez *Casuarina* (Diem *et al.*, 1983). Elles peuvent être induites en absence d'un contact entre le microsymbiote et la cellule végétale en présence d'exudats de la bactérie placée au contact du système racinaire de la plante (Burggraaf *et al.*, 1983 ; Prin et Rougier, 1987). Des facteurs déformants ont récemment été mis en évidence dans les surnageants de culture de *Frankia*. Il est à noter que ces facteurs déformants agissent à des dilutions très élevées (10^{-5}) et que leur biosynthèse est induite par des extraits de flavonoïdes (Schwencke et Selim, 1995). Aucun élément ne permet actuellement de dire que ces facteurs déformants pourraient correspondre aux facteurs Nod des Légumineuses (Fisher et Long, 1992 ; Dénarié *et al.*, 1992).

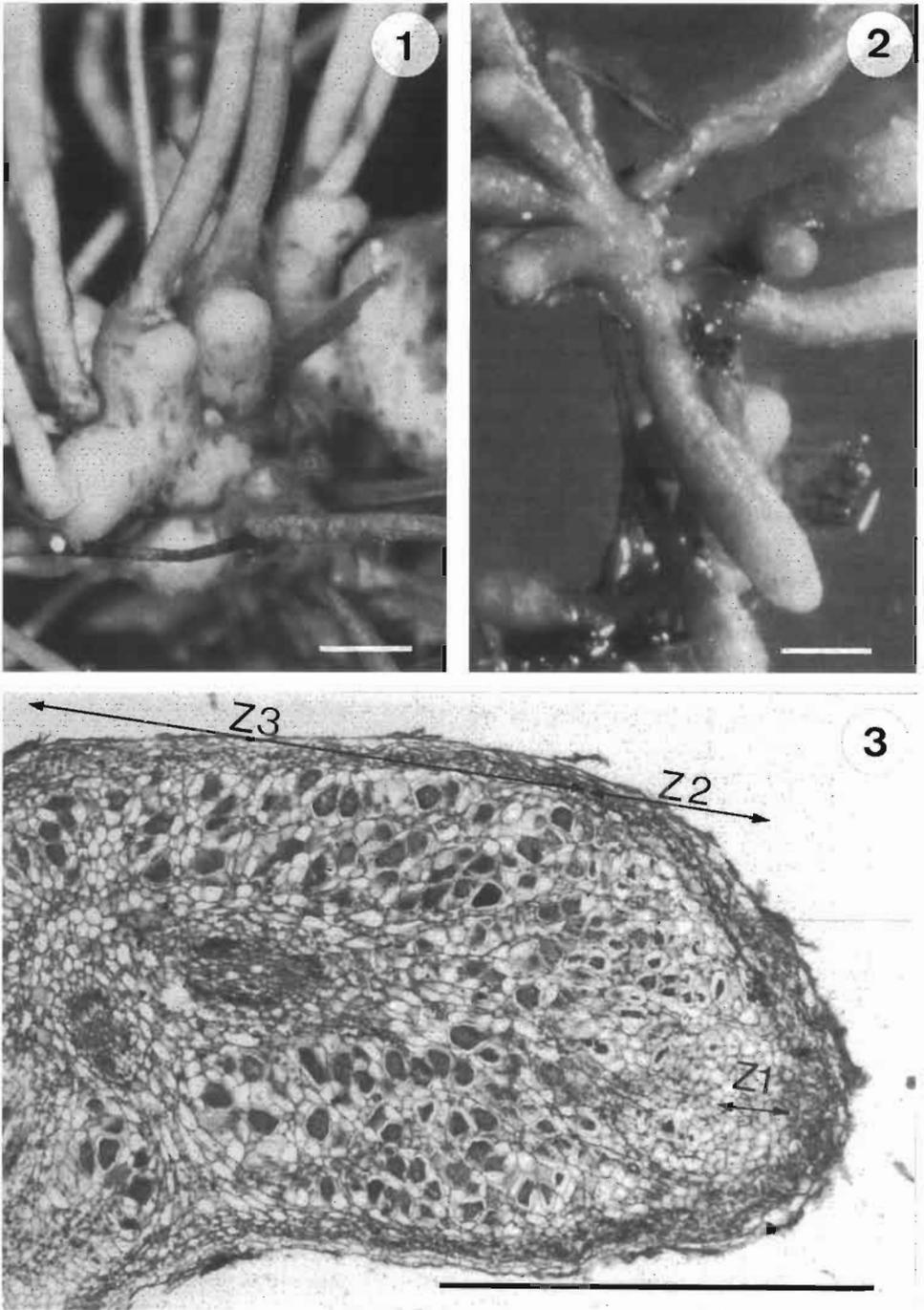


Planche I

Si la présence de *Frankia* induit la déformation de nombreux poils absorbants à la surface racinaire, un très petit nombre sont réellement infectés (Callaham et Torrey, 1977). Des observations vitales (Diem *et al.*, 1983) ont permis de montrer qu'en présence d'un inoculum sous forme de colonies de *Frankia*, les poils absorbants croissent et capturent les filaments du microsymbiote, suggérant l'existence d'un chimiotropisme d'une nature encore inconnue.

Les filaments de *Frankia* pénètrent ensuite dans la zone de courbure du poil absorbant, en digérant la paroi primaire du poil absorbant (Baker et Mullin, 1992). La pénétration de *Frankia* dans la cellule végétale s'accompagne d'une « encapsulation » des hyphes du microsymbiote. En effet, les hyphes intracellulaires sont toujours entourés par le plasmalemme de l'hôte ainsi que par un matériel polysaccharidique épais appelé capsule. La capsule constitue l'interface entre les deux partenaires maintenant l'interaction de compatibilité et les échanges de métabolites. Par marquage à l'or colloïdal, Berg (1990) a montré que la capsule était constituée de trois classes de polysaccharides, cellulose, hémicellulose (xylanes) et des pectines. Ces résultats confortent l'idée d'une origine végétale de la capsule. Après la pénétration du *Frankia*, le poil absorbant envahi présente une activité cellulaire et métabolique importante (comme par exemple, la migration du noyau au centre de la cellule, les déplacements des tractus cytoplasmiques, etc. (Berg, 1995).

- La seconde phase de l'infection est la formation du pré-nodule.

Environ 8 jours après l'inoculation, de petites protubérances, parfois pigmentées, apparaissent sur les racines inoculées par *Frankia*. Ces protubérances correspondent à une prolifération cellulaire limitée qui apparaît à proximité du poil absorbant infecté. Les filaments de *Frankia* croissent et se ramifient vers l'intérieur du massif cellulaire, à partir de la base du poil absorbant et envahissent certaines des cellules nouvellement formées provoquant leur hypertrophie (Callaham et Torrey, 1977). Le noyau et le nucléole des cellules infectées sont sensiblement plus volumineux que ceux des cellules non infectées (Angulo Carmona, 1974). A ce stade, on observe une grande production d'amidon dans les cellules non infectées du pré-nodule d'aulne (Angulo Carmona, 1974).

La fonction de ce pré-nodule n'est pas encore très bien comprise. Dans les cellules infectées, *Frankia* demeure généralement sous la forme de filaments ramifiés ; des vésicules symbiotiques peuvent être observées de manière occasionnelle indiquant que la fixation d'azote pourrait débuter dès ce stade. Le pré-nodule demeure une zone circonscrite toujours située en retrait par rapport à l'endoderme et parfois délimitée par des assises cellulaires riches en tannins. Un pré-nodule n'évolue jamais en nodule mais constitue une étape obligatoire dans la formation du lobe nodulaire.

- La troisième phase de l'infection est l'initiation du lobe nodulaire. Après la for-

Planche I

Fig. 1.- Nodule de *Casuarina glauca* âgé de 3 mois composé de plusieurs lobes nodulaires qui se prolongent par une racine nodulaire à géotropisme négatif. Fig. 2.- Nodule d'*Allocauarina verticillata* de 3 mois composé de plusieurs lobes nodulaires allongés et ramifiés, dépourvu de racine nodulaire. Fig. 3.- Vue microscopique d'une coupe pseudo-longitudinale de *C. glauca* colorée au bleu de toluidine présentant les cellules méristématiques (zone I), la zone des cellules jeunes infectées (zone II), la zone des cellules matures infectées (zone III). Dans les lobes âgés, la zone sénescence (zone IV) est située à la base du lobe. (barre = 500 µm).

Fig. 1.- 3 month-old nodule of *Casuarina glauca* showing multiple nodule lobes with upward-growing nodule roots. Fig. 2.- 3 month-old nodule of *Allocauarina verticillata* consisting of multiple, elongated and branched nodule lobes with no nodule root. Fig. 3.- Light microscopy of *C. glauca* nodule sectioned longitudinally and stained with toluidine blue showing meristematic cells (zone I), young infected cells (zone II), mature infected cells (zone III). In older nodule senescent zone (zone IV) is located at the basis of the lobe. (bar = 500 µm).

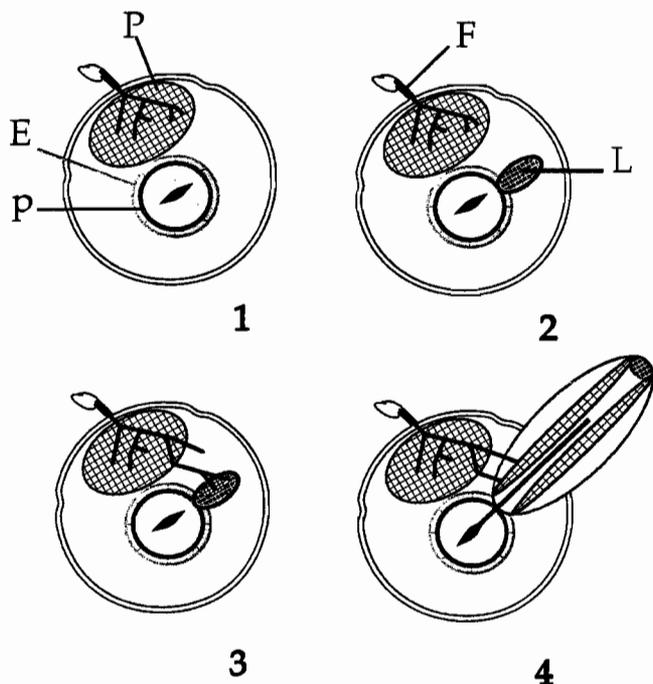


Fig. 1.- Organogenèse d'un lobe nodulaire d'une plante actinorhizienne. Les schémas représentent les étapes successives de l'organogenèse observée sur des sections transversales d'une racine de *Casuarina glauca* inoculée par *Frankia*. Fig. 1.- Pénétration de *Frankia* dans un poil absorbant et différenciation du pré-nodule. Le pré-nodule demeure dans une zone circonscrite dans le cortex racinaire provoquant une petite protubérance externe. Les filaments de *Frankia* croissent et se ramifient vers l'intérieur de la racine à partir de la base du poil absorbant. Fig. 2.- Initiation du lobe nodulaire dans le péricycle de la racine en face d'un pôle de xylème primaire. Fig. 3.- Infection du lobe nodulaire par *Frankia*. Les filaments de *Frankia* envahissent progressivement les cellules corticales du jeune lobe nodulaire. Fig. 4.- Développement du lobe nodulaire. Le lobe nodulaire perce la racine dans son cortex et croît grâce à un méristème apical. A la base de chaque lobe nodulaire, se développent de nouvelles ébauches de lobes et la même séquence de développement se répète.
E, endoderme ; F, filament de *Frankia* ; L, lobe nodulaire ; P, pré-nodule ; PE, péricycle.

Fig. 1.- Organogenesis of a nodule lobe of an actinorhizal plant. Diagrams represent the successive steps of organogenesis observed on transverse sections of a *Casuarina glauca* root inoculated with *Frankia*. Fig. 1.- Penetration of *Frankia* into a root hair and differentiation of the pre-nodule. The pre-nodule is located in the outside cortex of the root producing a small external protuberance. Filaments of *Frankia* originating from the basis on the root hair grow and ramify into the interior of the root. Fig. 2.- Initiation of the nodule lobe from the pericycle of the root opposite to the protoxylem pole. Fig. 3.- Infection of the nodule lobe by *Frankia*. Filaments of *Frankia* invade gradually cortical cells of the young nodule lobe. Fig. 4.- Development of the nodule lobe. The nodule lobe emerges from the root cortex and grows from an apical meristem. New lobes from each nodule lobe basis develop and the same sequence of development is repeated.
E, endoderm ; F, *Frankia* hyphae ; L, nodule lobe ; P, pre-nodule ; PE, pericycle.

mation du pré-nodule, le primordium du lobe nodulaire est initié dans le péricycle en réponse à des signaux de nature encore inconnue émis par les hyphes des *Frankia*. L'induction de cette morphogenèse a lieu à distance du point d'infection (cette distan-

ce atteignant parfois 1 mm) (Callaham et Torrey, 1977). Ces primordia se situent en général à l'opposé des pôles de protoxylème se répartissant en position distale et proximale sur la racine par rapport au site du pré-nodule.

Ces primordia ont une structure de racine et se développent en bordure ou de manière diamétralement opposée à l'emplacement du prénodule (Callaham et Torrey, 1977). Ils croissent en traversant les régions du cortex de la racine qui ne sont pas encore infectées par le microsymbiote. Par rapport à l'emplacement du prénodule, leur nombre varie selon les espèces, atteignant 1 à 2 chez *Casuarina* et parfois une dizaine chez *Comptonia* (Torrey, 1976 ; Callaham et Torrey, 1977). La croissance du lobe est assurée par un méristème qui se trouve en position apicale.

- La quatrième phase est l'infection du lobe nodulaire. Les filaments de *Frankia* qui étaient jusqu'alors contenus dans le prénodule continuent à proliférer dans les cellules corticales de la racine en direction du lobe nodulaire. Au cours de leur progression, les filaments de *Frankia* demeurent encapsulés et envahissent progressivement les cellules corticales du jeune lobe nodulaire. *Frankia* pénètre de cellule à cellule à travers les parois selon des files cellulaires, délimitées chez *Casuarina* par des cellules à tannins. Les cellules de *Casuarina* infectées s'élargissent et leur paroi s'épaissit de lignine. Il en est de même des parois adjacentes des cellules non infectées. Ce processus de lignification pariétale très localisé conduit à une protection physique et chimique des cellules infectées (Berg et McDowell, 1987 ; Berry, ce fascicule). Puis les filaments de *Frankia* commencent à produire des vésicules, sites de la fixation d'azote de la plupart des plantes actinorhiziennes. Notons cependant que chez quelques espèces (*Casuarina*, *Allocasuarina*) les filaments de *Frankia* ne différencient pas de vésicules dans les cellules infectées de la plante-hôte.

1-3-2 - Infection par pénétration intercellulaire

Depuis 1985, Miller et Baker ont montré qu'il existait une autre voie de pénétration du *Frankia*. Le microsymbiote est ob-

servé au moment de l'infection, dans les espaces intercellulaires du rhizoderme chez plusieurs genres d'Elaeagnacées (*Elaeagnus*, *Hippophae*, *Shepherdia*). Ce processus d'infection a été décrit comme étant apoplastique (Miller et Baker, 1985). Il a été retrouvé ces dernières années chez d'autres familles comme les Rhamnacées (*Ceanothus*), et les Rosacées (*Cercocarpus*) (Berry et Sunell, 1990). Dans ce type d'infection, on ne trouve pas de prénodule, étape essentielle de l'infection par l'intermédiaire des poils absorbants. Comme dans le cas de l'infection par les poils absorbants, un primordium de lobe nodulaire est initié dans le pérycycle. Les filaments de *Frankia* progressent vers ce primordium selon la voie apoplastique. Puis, les hyphes deviennent intracellulaires en pénétrant, après encapsulation, dans les cellules ; des vésicules se différencient sur les filaments de *Frankia* et la fixation d'azote commence.

1-4 - le tissu fixateur d'azote

Le tissu fixateur d'azote, situé dans la zone corticale du lobe nodulaire, comprend un mélange de cellules infectées et de cellules non infectées par le microsymbiote. Les cellules non infectées sont moins grandes que les cellules infectées ; elles peuvent contenir des amyloplastes ou des vacuoles riches en tannins et substances phénoliques.

Les cellules infectées sont remplies de filaments de *Frankia* qui différencient des vésicules symbiotiques pouvant être sphériques, en forme de crosse, elliptiques ou filamenteuses (Newcomb et Wood, 1987). Des sporanges et des spores sont parfois observés dans quelques nodules actinorhiziens (Berry et Sunell, 1990). Comme il a été dit précédemment, *Frankia* envahit les tissus sous forme d'hyphes inter- ou intracellulaires. Chez *Casuarina cunninghamiana*, Berg et McDowell (1987) ont pu distinguer deux structures différentes correspondant à ces deux formes. Des filaments cloisonnés croissent entre les parois des cellules végétales et des filaments intracellu-

lares, non cloisonnés et abondamment ramifiés se déploient dans le cytoplasme des cellules infectées matures. Ces différences structurales seraient peut-être à corrélérer avec des physiologies différentes, en particulier, en rapport avec la fixation d'azote chez cette espèce où *Frankia* est dépourvu de vésicules.

Dans un lobe donné, la croissance et l'invasion du microsymbiote a lieu de manière acropète. Les cellules du parenchyme cortical, envahies, se présentent selon un gradient de telle sorte que les cellules les plus récemment envahies sont celles qui sont situées le plus près du méristème. On observe une bonne corrélation entre le degré de développement intracellulaire du *Frankia* et l'hypertrophie des cellules-hôtes. On peut ainsi distinguer (Pl. I, fig. 3) quatre zones dans le lobe ; une zone apicale méristématique (zone I), une zone de jeunes cellules infectées (zone II), une zone de cellules infectées matures (zone III) et, enfin, une zone sénescence observée seulement dans les nodules âgés (zone IV).

La localisation de la fixation de l'azote dans le lobe nodulaire a pu être précisée par l'étude de l'expression des gènes *nifH* et *nifWZ* de *Frankia*. L'expression du gène *nifH* est localisée dans les cellules infectées, au niveau des vésicules filamenteuses de *Coriaria* (Mirza *et al.*, 1994), dans les vésicules sphériques de l'aulne (Prin *et al.*, 1993 ; Pawlowski *et al.*, 1995) et dans les filaments intracellulaires du *Casuarina* (Gherbi *et al.*, 1995). *NifH* est exprimé de manière graduelle le long de l'axe longitudinal du lobe nodulaire en fonction de l'âge des tissus infectés. On ne détecte pas d'expression dans les jeunes cellules infectées (zone II) ; dans ces cellules, *Frankia* occupe seulement le centre du volume cellulaire. C'est lorsque les cellules sont entièrement remplies de *Frankia* (zone III) que l'expression de *nifH* apparaît la plus grande. Dans les cellules sénescences (zone IV), l'expression est minimale, voir nulle (Pawlowski *et al.*, 1995). Ces observations

sont tout à fait en accord avec les travaux de cytophysiologie de Lalonde (1979) qui ont montré que *Frankia* formait des vésicules seulement lorsque les filaments étaient répandus dans la totalité de la cellule infectée, ainsi que les travaux de Mian et Bond (1978) et ceux de Huss-Danell et Bergman (1990) qui ont pu préciser que l'activité de la nitrogénase était induite pendant la maturation des vésicules.

1-5 - Développement des lobes nodulaires

Les deux types de nodules actinorhiziens comprennent une multitude de lobes nodulaires et sont pérennes. La formation du lobe nodulaire initial déclenche immédiatement le développement d'autres lobes nodulaires par une série de ramifications qui conduit à la forme d'un bouquet compact de lobes dont l'analogie avec les « balais de sorcière » a pu être évoquée par Torrey (1986), impliquant dans le cas des nodules actinorhiziens des racines et non pas des bourgeons. En effet, de nouveaux primordia de lobes nodulaires sont initiés de manière endogène (péricycle) à la base de chaque lobe formé. Les cellules corticales de chaque nouveau lobe sont envahies par les filaments de *Frankia*. Dans le cas des nodules de type *Myrica*, cette phase d'infection est suivie par une phase d'arrêt de croissance qui peut s'étaler sur plusieurs jours ou plusieurs semaines. Après cette phase d'arrêt, le méristème du lobe nodulaire amorce un développement modifié qui conduit à la formation d'une racine nodulaire, ce qui produit une touffe de racines nodulaires. Dans les nodules de type coralloïde (*Alnus*) le méristème nodulaire cesse toute activité, après avoir formé une sorte de papille à l'extrémité de chaque lobe.

En fonction des variations saisonnières, comme des modifications de température et d'humidité, de nouveaux lobes nodulaires sont formés par vagues successives (Schwintzer *et al.*, 1982) aboutissant à un nodule de plus en plus gros et grandement lignifié. Un nodule peut persister pendant

5 à 10 ans tout en conservant son activité fixatrice grâce aux nouveaux lobes formés chaque année (Schwintzer *et al.*, 1982).

La formation du nodule et l'induction de nombreux lobes d'origine racinaire semblent être liés, comme chez les Légumineuses, à une modification de la balance hormonale endogène des tissus infectés. Des teneurs importantes en cytokinines et en auxines dans les nodules actinorhiziens ont déjà été signalées (Henson et Wheeler, 1977 ; Dullaart, 1970 ; Wheeler *et al.*, 1979) et l'apport exogène d'inhibiteurs de transport d'auxine a permis d'obtenir des pseudonodules de *Casuarina* en absence de *Frankia*. Des auxines et des cytokinines sont synthétisées et excrétées par des souches de *Frankia* en culture pure (Stevens et Berry, 1988 ; Berry *et al.*, 1989). On peut donc, dès lors, supposer que ces substances de croissance sont impliquées directement ou indirectement dans la morphogénèse nodulaire. Comme chez les Légumineuses (Hirsch et Fang, 1994), on peut émettre l'hypothèse du rôle d'un signal externe (équivalent des facteurs Nod) qui agirait comme une hormone, ou bien celui d'un signal interne, correspondant à la modification de la balance hormonale de la plante déclenchée par des facteurs Nod ou leur équivalent.

2 - Nodule actinorhizien versus nodule des Légumineuses

Les deux types de symbiose présentent des différences et des similitudes dans leur développement, leur anatomie et leur physiologie (Tableau 1).

2-1 - Les différences

Généralement le nodule des Légumineuses est constitué d'un simple lobe tandis que celui des plantes actinorhiziennes est un ensemble de lobes ramifiés prolongés ou non par des racines nodulaires.

Les nodules actinorhiziens sont des touffes plus ou moins compactes de racines adventives (*Rhizothamnium* = petit buisson

de racines) dans lesquelles le tissu vasculaire occupe la position centrale et, l'actinomycète, les cellules infectées du cortex. Au contraire, les Légumineuses ont des nodules qui sont, de par leur origine, des excroissances du cortex d'une racine latérale dans lesquelles le tissu infecté est central et entouré par des cordons vasculaires périphériques inclus dans le cortex parenchymateux.

Lorsque *Frankia* pénètre dans les tissus de l'hôte, le microsymbiote croît et se multiplie par allongement des hyphes qui s'encapsulent, formant ainsi un vaste réseau dans le cortex racinaire. Au contraire, l'infection du tissu central des nodules des Légumineuses se fait par l'intermédiaire d'un cordon d'infection, structure tubulaire d'origine végétale, à l'intérieur duquel se trouvent les bactéries. Les *Rhizobium* sont libérés par un processus d'endocytose dans la cellule végétale. Après leur complète libération, les bactéries sont sequestrées à l'intérieur d'une membrane (membrane pér bactéroidienne) dérivant du plasmalemma de l'hôte. Celles-ci se différencient alors en bactéroïdes et se multiplient dans la cellule. Dans les nodules de type déterminé, comme *Aeschynomene*, les cellules infectées par les bactéroïdes continuent à se multiplier (Alazard et Duhoux, 1990). En conséquence, les unités de fixation d'azote des Légumineuses, les symbiosomes, sont nombreux et isolées, et s'opposent à l'organisation du réseau continu du *Frankia*.

2-2 - Les similitudes

Une comparaison sur le développement et le fonctionnement des deux types de symbiose peut nous fournir des indications sur les stratégies communes et uniques qui ont abouti au cours de l'évolution à trouver les conditions favorables à une fixation biologique de l'azote.

Une des solutions communes pour les symbioses actinorhiziennes ou légumineuses et valables aussi pour la symbiose Gun-

Tableau 1.- Caractéristiques des nodules des Légumineuses et des plantes actinorhiziennes
 Table 1.- Nodule characteristics in legumes and actinorhizal plants

CARACTERISTIQUES	PLANTES ACTINORHIZIENNES	LEGUMINEUSES
Macrosymbiote	8 familles, ligneuses	1 superfamille [*]
Microsymbiote	<i>Frankia</i> , gram +	<i>Rhizobium</i> , gram -
Infection	cellulaire ou intercellulaire	cellulaire ou intercellulaire
Nodule types	avec racine nodulaire sans racine nodulaire	.nodule indéterminé allongé(NI) .nodule déterminé sphérique(ND)
nature	multilobé groupe de racines adventives	unilobé en général excroissance du cortex de la racine
anatomie	cylindre central cellules corticales infectées	zone centrale infectée vascularisation dans le cortex
origine	péricycle	cortex interne (NI) cortex externe (ND)
structure du microsymbiote	hyphes encapsulées et ramifiées	cordon d'infection, multiplication des bactéries et endocytose
fonctionnement	pérenne	annuel ou pérenne
Régulation de la diffusion de l'oxygène	à la fois chez <i>Frankia</i> et dans la plante hôte	uniquement dans la plante hôte
Hémoglobine	présente ou absente	abondante
Sites de la nitrogénase	vésicules symbiotiques (exceptions: <i>Casuarina</i> , <i>Allocauarina</i>)	symbiosomes

nera-Nostoc (Mylona *et al.*, 1995) est que dans ces trois systèmes, le procaryote fixe N₂ à l'intérieur de la cellule-hôte tout en étant séparé du cytoplasme de la plante par un système membranaire dérivant du plasmalemme. Chez les Légumineuses, la membrane péribactéroïdienne a été largement étudiée (Brewin, 1991 ; Verma, 1992). Elle forme l'interface entre les deux partenaires symbiotiques à travers laquelle les signaux et les métabolites sont échangés, évitant aussi la réaction de défense de l'hôte. L'internalisation des symbiotes *Rhizobium* ou *Frankia*, conduit à une invagination du plas-

malemme et à une synthèse membranaire massive. Cette néosynthèse conduit à une augmentation de surface membranaire évaluée à plus de 30 fois celle des membranes d'une cellule non infectée (Verma, 1992). La membrane péribactéroïdienne contient des phospholipides (Perotto *et al.*, 1995) et des protéines (Verma, 1992) que l'on ne trouve pas dans la membrane plasmique et qui lui confèrent probablement des fonctions spécifiques. Une noduline Ngm-26, identifiée dans la membrane péribactéroïdienne, pourrait être une protéine d'un canal ionique impliqué dans la translocation

de petites molécules (Sandal et Marcker, 1988). D'autres protéines ou isoformes de protéines ont également été identifiées dans la membrane péribactéroïdienne, comme la choline-kinase I, H⁺ATPase, et une noduline Ngm-24 (Franssen *et al.*, 1992).

Un second trait commun développé par ces deux symbioses est la spécificité d'hôte dont l'ampleur varie avec le type de symbiose. Le développement des nodules implique une série d'interactions complexes qui sont principalement sous le contrôle du génome des deux partenaires. On reconnaît habituellement trois ou quatre groupes de spécificité d'hôte (Baker et Mullin, 1992 ; Benson et Silvester, 1993). Un premier groupe inclut les *Frankia* capables de noduler *Alnus*, *Comptonia* et *Myrica*. Le groupe 2 inclut toutes les souches capables de noduler *Casuarina*, *Gymnostoma* et quelques espèces d'*Allocasuarina*. Le groupe 3 correspond aux souches nodulantes *Elaeagnus*, *Hippophae* et *Shepherdia*. Les souches de ces trois groupes nodulent aussi le genre *Myrica* (*Myricaceae*) et *Gymnostoma* (*Casuarinaceae*), ces deux genres étant moins sélectifs dans le choix de leur partenaire. Un quatrième groupe défini par Baker (Baker et Mullin, 1992) nodule les membres de la famille des *Eleagnaceae* mais non les plantes-hôtes peu spécifiques.

Le problème de la spécificité est encore très mal connu chez les plantes actinorhiziennes. Cela tient au fait que d'abord il existe des isolats de *Frankia* qui ne parviennent pas à noduler l'hôte d'origine, ou bien la nodulation est possible mais avec une efficacité très réduite ; à ces souches on a donné le nom d'atypiques (voir revue, dans Benson et Silvester, 1993). Les résultats parfois aberrants obtenus pourraient être expliqués par la présence de plus d'une souche dans le nodule, ou par la perte de l'information génétique pour la nodulation au cours de l'isolement et la culture pure. Chez les Légumineuses, le support génétique de la nodulation est bien connu. On distingue les gènes de structure (nodABC) communs

à tous les *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium* qui sont indispensables pour l'établissement de la symbiose et les gènes de spécificité dont l'inactivation s'accompagne le plus souvent d'un changement du spectre d'hôte de la bactérie.

Chez les plantes actinorhiziennes au contraire, les hybridations avec des sondes de gènes *nod* de *Rhizobium* ont toujours échoué. L'expérience de complémentation (Chen *et al.*, 1991) d'un mutant *nodD* de *Rhizobium leguminosarum* avec une banque génomique de *Frankia* n'a pu être confirmée et la poursuite des travaux dans ce domaine est nécessaire pour identifier le support génétique de la nodulation.

3 - Intérêt de l'étude des interactions plante-*Frankia*

3-1 - Analyse moléculaire de la rhizogénèse.

Au cours de l'ontogénèse des actinorhizes, le pré-nodule modifie le phénotype du système racinaire en induisant de nouveaux méristèmes racinaires. On peut dès lors parler de rhizogénèse symbiotique. La différenciation du nodule actinorhizien est associée à l'expression de certains gènes (Bogusz *et al.*, ce fascicule). Ainsi, à partir d'une banque d'ADNc obtenus à partir de nodules de *Casuarina glauca*, on a pu montrer que, sur 240 clones analysés, 60 % d'entre eux correspondent à des ARNm-messagers présents à la fois dans les nodules et les racines, et seulement 18 % des transcrits sont présents spécifiquement dans les nodules. Ce résultat suggère que le programme génétique impliqué dans la rhizogénèse est fortement exprimé au moment de la nodulation des plantes actinorhiziennes (Bogusz *et al.*, ce fascicule).

Bien que l'histogénèse et la physiologie des racines latérales et adventives aient été largement étudiées (Peterson et Peterson, 1986 ; Scheres *et al.*, 1994), il existe très peu d'informations sur l'analyse moléculaire de l'induction de ces racines (Aeschbacher, 1994). Taylor et Scheuring (1994) ont

identifié et cloné un gène *RSI-1* largement exprimé dans les racines latérales et non dans les autres organes. De même, Vera *et al.* (1994) et Smith et Federoff (1995) ont cloné respectivement les gènes *HRGPnt3* et *LRPI* spécifiquement exprimés dans les racines adventives et latérales du tabac et d'*Arabidopsis*. Ces premiers résultats sont encourageants même si nous ne connaissons pas précisément la fonction de ces différents gènes.

L'analyse moléculaire de la différenciation des racines adventives induites dans les nodules actinorhiziens par *Frankia* peut constituer un nouveau modèle d'étude. En effet, l'initiation du méristème primaire de la racine n'est pas très accessible puisque l'observation doit être faite dans le jeune embryon. Elle pourrait compléter les analyses faites sur des racines cultivées *in vitro* et induites sous l'influence d'une auxine (Laskowski *et al.*, 1995). Enfin, la connaissance des mécanismes impliqués dans cette organogenèse a des applications pratiques majeures puisque les racines adventives sont celles que les horticulteurs ou les forestiers déclenchent à la base des boutures dont la technologie encore très empirique ne peut pas être extrapolée à toutes les espèces. Une meilleure connaissance relative à l'influence des microorganismes symbiotiques sur la rhizogenèse d'arbres forestiers serait utile à l'amélioration des pratiques forestières.

3-2 - Le nodule actinorhizien, modèle d'étude alternatif de la fixation biologique de l'azote

L'induction du lobe des actinorhizes a pour origine les cellules du péricycle situées en face des pôles ligneux. On ignore encore tout de la nature des signaux émis par le pré-nodule infecté par *Frankia* et dans leur transduction jusqu'à ces cellules cibles. Cependant, il est intéressant de signaler que chez les Légumineuses on commence à avoir des informations sur le mécanisme à l'origine de l'induction des premières divi-

sions cellulaires qui ont lieu dans le cortex racinaire (Mylona *et al.*, 1995). La noduline précoce ENOD40 qui est induite par les facteurs *Nod* dans le péricycle et les cellules corticales en voie de division possède un effet hormonal quand elle est introduite dans des protoplastes de tabac. Cette noduline est exprimée très tôt dans la morphogenèse nodulaire, avant même les premières divisions des cellules corticales. Dès lors, Mylona *et al.* (1995) avancent l'hypothèse que les divisions du primodium nodulaire pourraient être induites *via* la noduline ENOD40 dont l'expression est d'abord localisée dans le péricycle. L'induction du lobe nodulaire des actinorhizes pourrait être un raccourci du mécanisme élaboré chez les Légumineuses : certaines cellules du péricycle constitueraient directement l'effecteur des facteurs équivalents aux facteurs *Nod* (Fig. 2).

Les plantes actinorhiziennes constituent le second groupe de plantes importantes capables de fixer l'azote moléculaire. Contrairement aux Légumineuses, ces plantes appartiennent à plus de 260 espèces, dont 20 genres répartis dans 8 familles différentes. Les analyses de phylogénie moléculaire récentes tendent à montrer, contrairement à ce que l'on supposait, que ces familles seraient assez proches sur le plan taxonomique (Chase *et al.*, 1993). Cette aptitude de *Frankia* à pouvoir s'associer à des plantes appartenant à autant de familles différentes a permis de qualifier ces microorganismes de peu spécifiques ayant un spectre d'hôtes très large. C'est ainsi que les souches de *Frankia* isolées de plantes aussi différentes que *Casuarina*, *Alnus*, *Comptonia*, *Eleaegnus*, *Colletia* ... peuvent noduler *Myrica*. L'analyse récente de la phylogénie moléculaire de ces familles de plantes a montré qu'il y avait une forte corrélation entre leur divergence taxonomique et le degré de leur association avec *Frankia* (Maggia et Bousquet, 1994 ; Bousquet, ce fascicule) ; aux genres ayant divergé récemment au point de vue taxonomique cor-

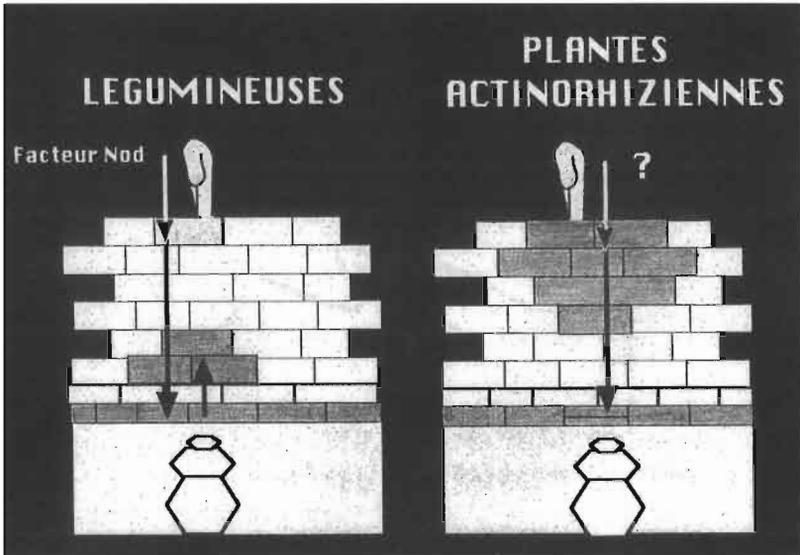


Fig. 2.- Induction de l'organogenèse des nodules de Légumineuses et des actinorhizes (d'après Mylona *et al.*, 1995, modifié et complété).

1 - Légumineuses - Dans les nodules indéterminés des Légumineuses, les divisions de certaines cellules du cortex interne de la racine sont à l'origine du primordium nodulaire ou futur nodule. La réactivation de ces cellules est concomitante de la présence d'une noduline ENOD 40 qui est exprimée dans ces cellules et dans les cellules du péri-cycle situées en face des pôles de protoxylème. Le symbiote (*Rhizobium*) ou les facteurs *Nod* induisent l'expression de cette noduline.

2 - Plantes actinorhiziennes - Dans les actinorhizes, le lobe nodulaire a pour origine les cellules du péri-cycle situées en face des pôles de protoxylème. On ne connaît pas actuellement les mécanismes de signalisation dans ces nodules ; le pré-nodule situé sous le ou les poils absorbants infectés pourrait jouer un rôle important dans l'induction de la division cellulaire du péri-cycle.

Notons que dans ces deux symbioses, les cellules cibles sont les mêmes (certaines cellules du péri-cycle) ; chez les actinorhizes, ces cellules sont également à l'origine du lobe nodulaire ; chez les Légumineuses, au contraire, les cellules du péri-cycle pourraient induire à distance, le primordium nodulaire, qui est localisé dans les cellules du cortex.

Fig. 2.- Induction of organogenesis of nodules in legumes and actinorhizae (according to Mylona *et al.*, 1995, modified and completed).

1 - Legumes - In undetermined nodules of legumes, cell divisions arise from the internal cortex of the root to develop into a nodular primordium. Cell division is correlated with the presence of a noduline, ENOD 40, which is expressed in these cells and in cells of the pericycle opposite to the protoxyleme poles. The microsymbiote (*Rhizobium*) or factors *Nod* can induce the expression of this noduline.

2 - Actinorhizal plants - In actinorhizae, the nodule lobe arises from pericycle cells opposite to the protoxyleme poles. Mechanisms of signaling in these nodules are not known ; the pre-nodule adjacent to infected root hair(s) could play an important role in the induction of the cellular division of the pericycle.

Note that in these two symbioses, cells target are the same (some cells of the pericycle) ; in actinorhizae, the nodule lobe arises from these cells ; in legumes, on the contrary, cells of the pericycle could stimulate the nodule primordium, located at a distance, in cells of the cortex.

respondraient des souches de *Frankia* les plus spécifiques (ayant un spectre d'hôte étroit). C'est ainsi que les genres *Allocasuarina* et *Casuarina* sont des plantes-hôtes spécifiques pour l'infectivité et l'effec-

tivité. Ces plantes sont incapables de noduler et de fixer effectivement N_2 avec des souches de *Frankia* isolées d'autres espèces de plantes-hôtes. De telles considérations conduisent à faire des hypothèses sur

l'origine de la symbiose actinorhizienne et chercher les ancêtres hypothétiques de la symbiose primitive. De la même façon, une analyse comparée de l'expression des gènes symbiotiques hétérologues, comme l'hémoglobine (Bogusz *et al.*, ce fascicule), peuvent fournir des arguments pour rechercher l'origine de l'association symbiotique fixatrice d'azote parmi les plantes supérieures.

CONCLUSIONS

Comparée à la symbiose légumineuse-*Rhizobium*, la symbiose actinorhizienne a des caractéristiques d'une symbiose primitive. Contrairement à l'immense majorité des souches de *Rhizobium*, le microsymbiote *Frankia* peut fixer l'azote à l'état libre grâce au développement de vésicules où la nitrogénase est protégée de l'oxygène. Le système membranaire de ces vésicules contient des hopanoïdes triterpéniques qui sont impliqués dans le mécanisme de régulation de diffusion de l'oxygène (Berry *et al.*, 1993 ; Berry, ce fascicule). En géné-

ral, le microsymbiote *Frankia* possède une structure dans le nodule assez comparable à celle observée en culture libre, ce qui est différent du bactéroïde des Légumineuses. Du côté du partenaire végétal, la spécificité d'hôte est particulièrement large et le lobe nodulaire est un organe correspondant à une racine adventive modifiée, structure plus primitive que l'expansion racinaire du nodule des légumineuses.

La morphogénèse nodulaire des actinorhizes commence seulement à être étudiée au plan moléculaire. De nombreuses questions restent posées : la base génétique de la spécificité d'hôte n'est actuellement pas comprise, de même l'ensemble du programme génétique qui conduit d'une part à l'induction du lobe nodulaire, d'autre part à la colonisation de ce dernier. Les résultats fournis par les futurs travaux pourraient nous permettre d'utiliser le modèle actinorhizien comme un système plus approprié, car probablement moins complexe que celui des Légumineuses pour transférer l'aptitude à fixer l'azote dans de nouvelles associations symbiotiques artificielles.

BIBLIOGRAPHIE

- Aeschbacher R.A., 1994.- The genetic and molecular basis of root development. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **45**, 25-45.
- Akkermans A.D.L., 1978.- Root nodule symbiosis in non-leguminous N₂-fixing plants. *In* : Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Dommergues Y.R. & S.V. Krupa (Eds), Elsevier-Amsterdam, Oxford, New York, 335-372.
- Alazard D. & E. Duhoux, 1990.- Development of stem nodules in a tropical forage legume, *Aeschynomene afraspera*. *J. Exp. Bot.*, **41**, 1199-1206.
- Angulo Carmona A.F., 1974.- La formation des nodules fixateurs d'azote chez *Alnus glutinosa*. *Acta Bot. Neerl.*, **23**, 257-303.
- Baker D.D. & B.C. Mullin, 1992.- Actinorhizal symbioses. *In* : Biological nitrogen fixation. Stacey G.S., R.H. Burris & H.J. Evans (Eds), Chapman & Hall, New York, 259-291.
- Benson D.R. & W.B. Silvester, 1993.- Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol. Rev.*, **57**, 293-319.
- Berg R.H., 1990.- Cellulose and xylans in the interface capsule in symbiotic cells of actinorhizae. *Protoplasts*, **159**, 35 - 43.
- Berg R.H., 1995.- Host cytoplasmic configurations during infection. *In* : The 10th International Conference on *Frankia* & actinorhizal plants, University of California, Davis, August 6-11.
- Berg R.H. & L. McDowell, 1987.- Endophyte differentiation in *Casuarina actinorhizae*. *Protoplasma*, **136**, 104-117.
- Berry A.L. & L. A. Sunell, 1990.- The infection process and nodule development. *In* : The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. Schwintzer C.R. & J.D. Tjepkema (Eds), Academic Press-San Diego, New York, Boston, London, 61-81.
- Berry A.L., O.T. Harriot, R.A. Moreau, S.F. Osman, D.R. Benson & A.D. Jones, 1993.- Hopanoid lipids comprise the *Frankia* vesicle envelope : potential barrier of oxygen diffusion to nitrogenase. *P.N.A.S.*, **90**, 6091-6094.
- Berry A.M., R.K.S. Kahn & M.C. Booth, 1989.- Identification of indole compounds secreted by *Frankia* HF-PAr13 in defined culture medium. *Plant & Soil*, **118**, 205-209.
- Brewin N.J., 1991.- Development of the legume root nodule. *Ann. Rev. Cell Biol.*, **7**, 191-226.
- Burggraaf A.J.P., J. Van der Linden & T. Tak, 1983.- Stu-

- dies on the localization of infectible cells on *Alnus glutinosa*. *Plant Soil*, **74**, 175-188.
- Callaham D. & J.G. Torrey 1977.- Prenodule formation and primary nodule development in roots of *Comptonia* (*Myricaceae*). *Can. J. Bot.*, **55**, 2306-2318.
- Chase M.W., D.E. Soltis, R.G. Olmstead, D. Morgan, D.H. Les et al., 1993.- Phylogenetics of seed plants : an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcl*. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, **80**, 528-580.
- Chen L., Y. Cui, M. Qin, Y. Wang, X. Bai, Q. Ma, 1991.- Identification of a *nodD*-like gene *Frankia* by direct complementation of a *Rhizobium nodD*-mutant. *Mol. Gen. Genet.*, **233**, 311-314.
- Dénarié J., F. Debellé & C. Rosemberg, 1992.- Signaling and host range variation in nodulation. *Ann. Rev. Microbiol.*, **46**, 497-531.
- Diem H.G., D. Gauthier & Y. Dommergues, 1983.- An effective strain of *Frankia* from *Casuarina* sp. *Can. J. Bot.*, **61**, 2815-2821.
- Dullaart J., 1970.- The auxin content of root nodules and roots of *Alnus glutinosa* (L.) Vill. *J. Exp. Bot.*, **21**, 975-984.
- Fisher R.F. & S.R. Long, 1992.- *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature*, **357**, 655-660.
- Franssen H.J., J.P. Nap & T. Bisseling, 1992.- Nodulins in root nodule development. *In* : Biological Nitrogen Fixation. Stacey G., R.H. Burris & H.J. Evans (Eds), Chapman & Hall, New York, 598-624.
- Gherbi H., E. Duhoux, C. Franche, K. Pawlowski, A. Berry & D. Bogusz, 1995.- Cloning and expression of a full-length hemoglobin cDNA and in situ localization of the corresponding mRNA in *Casuarina glauca* nodules. *Physiol. Plant.*, in press.
- Henson I.E., & C.T. Wheeler, 1977.- Hormones in plants bearing nitrogen-fixing root nodules : partial characterization of cytokinins from root nodules of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *J. Exp. Bot.*, **28**, 1076-1086.
- Hirsch A.M. & Y. Fang, 1994.- Plant hormones and nodulation : what's the connexion ? *Plant Mol. Biol.*, **26**, 5-9.
- Huss-Danell K & B. Bergman, 1990.- Nitrogenase in *Frankia* from root nodules of *Alnus incana* (L.) Moench : immunolocalization of the Fe- and MoFe proteins during vesicle differentiation. *New Phytol.*, **116**, 443-455.
- Lalonde M., 1979.- Techniques and observations of the nitrogen fixing *Alnus* root nodule symbiosis. *In* : Recent Advances in Biological Nitrogen Fixation. Subba Rao N.S., (Ed), Oxford & IBH, New Delhi, India, 421-434.
- Laskowski M.J., M.E. Williams, H.C. Nusbaum & I.M. Sussex, 1995.- Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development*, **121**, 3303 - 3310.
- Maggia L. & J. Bousquet, 1994.- Molecular phylogeny of the actinorhizal *hamamelidae* and relationships with host promiscuity toward *Frankia*. *Mol. Ecol.*, **3**, 459-467.
- Mian S. & G. Bond, 1978.- The onset of nitrogen fixation in young alder plants and its relation to differentiation in the nodular endophyte. *New Phytol.*, **80**, 187-192.
- Miller I.M. & D.D. Baker, 1985.- The initiation, development and structure of root nodules in *Elaeagnus angustifolia* L. (*Elaeagnaceae*). *Protoplasma*, **128**, 107-119.
- Mirza M.Z., K. Pawlowski, F.Y. Hafeez, A.H. Chaudhary & A.D.L. Akkermans, 1994.- Ultrastructure of the endophyte and localization of *nifH* transcripts in root nodules of *Coriaria nepalensis* wall by *in situ* hybridization. *New Phytol.*, **126**, 131-136.
- Mylona P., K. Pawlowski & T. Bisseling, 1995.- Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell.*, **7**, 869-885.
- Newcomb W., & S.M. Wood, 1987.- Morphogenesis and fine structure of *Frankia* (Actinomycetales) : the microsymbiont of nitrogen-fixing actinorhizal root nodules of *Coriaria arborea* (*Coriariaceae*). *Int. Rev. Cytol.*, **109**, 1-88.
- Pawlowski K., A.D.L. Akkermans, A. van Kammen & T. Bisseling, 1995.- Expression of *Frankia nif* genes in nodules of *Alnus glutinosa*. *Plant & Soil*, **170**, 371-376.
- Perotto S., N. Donovan, B.K. Drobek, & N.J. Brewin, 1995.- Differential expression of a glycosyl inositol phospholipid antigen on the peribacteroid membrane during pea nodule development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* (sous presse).
- Peterson R.L., & C.A. Peterson, 1986.- Ontogeny and anatomy of lateral roots. *In* : New root formation in plants and cuttings. Jackson M.B. (Ed.), Dordrecht, The Netherlands, Martinus Nijhoff, 1-30.
- Pizelle G., 1972.- Observations sur les racines de plantules d'Aune glutineux (*Alnus glutinosa* Gaertn..) en voie de nodulation. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, **119**, 571-580
- Prin Y. & M. Rougier, 1987.- Preinfection events in the establishment of *Alnus-Frankia* symbiosis : study of the root hair deformation step. *Plant Physiol. (Life Sci. Adv.)*, **6**, 99-106.
- Prin Y., F. Mallein-Gerin & P. Simonet, 1993.- Identification and localization of *Frankia* strains in *Alnus* nodules by *in situ* hybridization of *nifH* mRNA with strain-specific oligonucleotides probes. *J. Exp. Bot.*, **44**, 815-820.
- Quispel A. & A.J.P. Burggraaf, 1979.- Infection, initiation and structure of actinorhizal root nodules. *In* : Biological nitrogen fixation, recent developments. Subba Rao N.S. (Ed), Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, New Delhi, India, 255-281.
- Sandal N.N., & K.A. Marcker, 1988.- Soybean nodulin-26 is homologous to the major intrinsic protein of the bovine lens fiber membrane. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 9347.
- Scheres B., H. Wolfkenfelt, V. Willemsen, M. Terlou, E. Lawson, C. Dean & P. Weisbeek, 1994.- Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development*, **120**, 2475-2487.
- Schwencke J. & S. Selim, 1995.- Deforming factors of *Casuarina* root hairs (dnF) are induced in *Frankia* by flavonoids from *Casuarina* seeds. *In* : The 10th International Conference on *Frankia* and actinorhizal plants, Univ. California, Davis, August 6-11.
- Schwintzer C.R. & S.A. Lancelle, 1983.- Effect of water-table depth on shoot growth, root growth, and nodulation of *Myrica gale* seedlings. *J. Ecol.*, **71**, 489-501.

- Schwintzer C.R., A.M. Berry & L.D. Disney, 1982.- Seasonal patterns of root nodule growth, endophyte morphology, nitrogenase activity and shoot development in *Myrica gale*. *Can. J. Bot.*, **60**, 746-757.
- Smith D.L. & N.V. Federoff, 1995.- LRP1, a gene expressed in lateral and adventitious root primordia of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **7**, 735-745.
- Stevens G.A., & A.M. Berry, 1988.- Cytokinin secretion by *Frankia* sp. HFPAr13 in defined medium. *Plant Physiol.*, **87**, 15-16.
- Tjepkema J., 1978.- The role of oxygen diffusion from the shoots and nodule roots in nitrogen fixation by root nodules of *Myrica gale*. *Can. J. Bot.*, **56**, 1365-1371.
- Taylor B.H. & C.F. Scheuring, 1994.- A molecular marker for lateral root initiation : the *RSI-1* gene of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is activated in early lateral root primordia. *Mol. Gen. Genet.*, **243**, 148-157.
- Torrey J.G., 1976.- Initiation and development of root nodules of *Casuarina* (*Casuarinaceae*). *Amer. J. Bot.*, **63**, 335-344.
- Torrey J.G., 1986.- Endogenous and exogenous influences on the regulation of lateral root formation. In : New root formation in plants and cuttings. Jackson M.B. (Ed.), Martinus Nijhoff Publishers, 31-67.
- Vera P., C. Lamb & P.W. Doerner, 1994.- Cell-cycle regulation of hydroxyproline-rich glycoprotein *HRGPnt3* gene expression during the initiation of lateral root meristems. *Plant J.*, **6**, 717-727.
- Verma D.P.S., 1992.- Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell*, **4**, 373-382.
- Wheeler C.T., I.E. Henson & M.E. McLaughlin, 1979.- Hormones in plants bearing actinomycete nodules. *Bot. Gaz.* (Chicago), Suppl., **140**, S52-S57.

Plant regeneration from leaf segments of *Datisca glomerata*

by Huai Yu Wang ^(1,2) and Alison M. Berry ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Department of Environmental Horticulture, University of California, Davis, CA 95616

⁽²⁾ Floricultural Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, China

Summary.- *Datisca glomerata* is a perennial plant with a herbaceous annual habit, that forms nitrogen-fixing root nodules in association with the microsymbiont *Frankia* sp. (Actinomycetales). *Datisca* offers an important possibility as a model system to study genetics and gene expression in an actinorhizal root nodule symbiosis. Neither regeneration by *in vitro* culture nor genetic transformation of *Datisca* have been reported to date. As the first step, we studied plant regeneration from leaf tissue of *Datisca*. In preliminary experiments with 16 treatments, the best regeneration media was MS + BA, 10 μ M + NAA, 0.5 μ M + phloridzin, 10 mg/l. The best regeneration efficiency ranged from 26 % to 33.3 %.

Résumé.- *Datisca glomerata* est une plante pérenne possédant un cycle annuel d'herbacée, formant des nodules fixateurs d'azote en association avec le microsymbiote *Frankia* sp. (Actinomycétales). *Datisca* a de grandes potentialités en tant que plante modèle pour l'étude de la génétique et de l'expression des gènes dans les symbioses actinorhiziennes. Jusqu'à présent, il n'y a aucune publication concernant la culture *in vitro* et la transformation génétique de *Datisca* à partir de tissus foliaires. Une expérience préliminaire avec 16 traitements a été réalisée, le meilleur milieu de régénération étant le suivant : MS + BA, 10 μ M + NAA, 0,5 μ M + phloridzine, 10 mg/l. Dans le meilleur des cas, un taux de régénération de 26 à 33,3 % a été obtenu.

Key words.- *Datisca glomerata* - actinorhizal tissue culture - regeneration.

INTRODUCTION

Datisca glomerata is a perennial plant with a herbaceous annual habit, that forms nitrogen-fixing root nodules in association with the microsymbiont *Frankia* sp. (Actinomycetales). The plant is self-pollinating, produces abundant progeny, and has a relatively short regeneration time (2.5 gene-

rations per year). Since other actinorhizal hosts are woody perennials, *Datisca* offers an important possibility as a model system for combined genetic and gene expression studies in actinorhizal symbiosis. The ability to regenerate whole plant somatic tissue is a prerequisite for *Agrobacterium*-mediated transformation, which is one of the most successfully used gene transfer techniques

to genetically engineer perennial crops. Neither regeneration by *in vitro* culture nor genetic transformation of *Datisca* have been reported to date. Transformation of root tissue by *A. rhizogenes* and transgenic plant regeneration have been successfully demonstrated only in *Allocasuarina verticillata* (Phelep *et al.*, 1991). Most recently, nodulation of transformed roots of *Casuarina glauca* has been achieved (Diouf *et al.*, 1995). *In vitro*-grown plant systems offer the possibility of using a range of tissue types for transformation, but leaves are the most favored explant source because of their abundance and ease of manipulation for infection with *Agrobacterium*. Transformation of leaf tissue by *A. tumefaciens* offers further advantages in studying root symbiotic systems, since the high hormone levels induced by *A. rhizogenes* in transformed roots do not occur. Therefore, as the first step, we studied plant regeneration from leaf tissue of *Datisca*.

MATERIALS AND METHODS

Plant material was derived from *Datisca glomerata* seedlings. *Datisca* seeds were collected in the Vaca Hills, west of Davis, CA. Seeds were stratified at 4°C for 4 weeks, and sown in a soilless mix (peat : fir bark : sand, 1 : 1 : 1).

In vitro propagation was initiated by culturing axillary buds from the greenhouse-grown seedlings, following surface sterilization. Stem segments 3-5 cm in length, including 2-3 nodes, were cut from *D. glomerata* plants in

the greenhouse. Plant segments were surface-sterilized by immersion in 70 % ethanol for 1 minute, then in 20 % bleach for 20 minutes, and washed with sterile water 3 times. The stems were then cut into about 1 cm long segments, each one including a node, and inserted into agar medium. The buds were cultured on three media : MS (Murashige and Skoog, 1962) ; MS + benzyl adenine (BA, 5 µM) + naphthylacetic acid (NAA, 1 µM) ; MS + BA (1 µM). Within 5 to 7 days after planting in agar, shoots grew out of the nodes on both MS and MS + BA (1 µM). By two weeks after planting, there were 5-10 leaves on each shoot, which could be used for further experiments. Although multiple shoots formed on the second medium, they grew out much later and did not elongate far.

• Experimental design for plant regeneration from leaves

There are many factors affecting plant regeneration in tissue culture such as growth regulators, position of leaves, or cultural conditions, etc. For this reason, the preliminary experiment was performed with an orthogonal design, a simple and effective method to determine the most important parameters in an experiment (Taguchi, 1987 ; Lin, 1982 ; Box *et al.*, 1978). Similar multivariate designs have been applied for optimization of growth and secondary metabolite products in cell suspension cultures of *Cassia didymobotrya* (Botta *et al.*, 1989), for organic synthesis (Wold *et al.*, 1986) and for toxicological evaluation of chemical data. The orthogonal array used in this experiment was L16 (4⁵), as shown in Table 1. The experiment tested 4 levels each of NAA, BA, IAA (indole-3-acetic acid) and phloridzin (Sigma), as shown in Table 1.

Leaves of *D. glomerata* were excised aseptically from *in vitro*-grown plants. Without severing the leaf, 3-4 transverse cuts were made through the midvein on the abaxial side. Leaf strips were placed on the surface of the agar with the abaxial side upward. Eight-randomly-selected leaves were placed in each 6 cm Petri dish. Cultures were incubated at 24-25°C in a growth chamber, under fluorescent lights with a 16h photoperiod. The number of leaves which formed shoots were recorded after 8 weeks in culture. Data were analyzed by direct analysis and factorial analysis of variance.

Test /Factors Regeneration	A (µM)	B (µM)	C (µM)	D (mg/L)	E (%)
1	(1) 5	(1) 0	(1) 0	(1) 0	(1) 0
2	(1) 5	(2) 0.5	(2) 0.5	(2) 1	(2) 16.7
3	(1) 5	(3) 1	(3) 1	(3) 5	(3) 16.7
4	(1) 5	(4) 2	(4) 2	(4) 10	(4) 0
5	(2) 10	(1) 0	(2) 0.5	(3) 5	(4) 0
6	(2) 10	(2) 0.5	(1) 0	(4) 10	(3) 33.3
7	(2) 10	(3) 1	(4) 2	(1) 0	(2) 0
8	(2) 10	(4) 2	(3) 1	(2) 1	(1) 0
9	(3) 20	(1) 0	(3) 1	(4) 10	(2) 0
10	(3) 20	(2) 0.5	(4) 2	(3) 5	(1) 0
11	(3) 20	(3) 1	(1) 0	(2) 1	(4) 28.6
12	(3) 20	(4) 2	(2) 0.5	(1) 0	(3) 0
13	(4) 30	(1) 0	(4) 2	(2) 1	(3) 0
14	(4) 30	(2) 0.5	(3) 1	(1) 0	(4) 14.3
15	(4) 30	(3) 1	(2) 0.5	(4) 10	(1) 25
16	(4) 30	(4) 2	(1) 0	(3) 5	(2) 0

Table 1.- Optimization experiments for plant regeneration by L₁₆ (4⁵) design. A = BA, B = NAA, C = IAA and D = phloridzin, E = empty.

Tableau 1.- Expériences d'optimisation de la régénération suivant la matrice L₁₆ (4⁵). A = BA, B = NAA, C = IAA et D = phloridzine, E = vide.

Table 2.- Regeneration percentage by factor and concentration.

Tableau 2.- Pourcentage de régénération en fonction des différents paramètres et de la concentration.

	FACTORS			
	A	B	C	D
TOTAL				
ER(1)	33.4	0	61.9	14.3
ER(2)	33.3	64.3	41.7	45.3
ER(3)	28.6	70.3	31.0	16.7
ER(4)	39.3	0	0	58.3
AVERAGE				
ER(1)	8.35	0	15.48	3.58
ER(2)	8.33	16.8	10.43	11.33
ER(3)	7.15	17.58	7.75	4.18
ER(4)	9.38	0	0	14.58
ΔR	2.68	17.58	15.48	11

The importance of parameters: $\overline{B \ C \ D \ A}$

Shoots regenerated from the leaves were excised and transferred to rooting medium in Magenta boxes (Sigma). The rooting medium contained MS with indole-3-butyric acid, 1 μ M. Roots formed about 10-15 days later. Plantlets could then be transplanted.

RESULTS AND DISCUSSION

Seven days after placement of leaf strips on the agar surface, callus had formed in the most of the treatments. By two weeks after placement, the callus had grown very well, and there were 2-3 dark green points on the surface of some calli. These points differentiated into shoots or small leaves in around 5-8 weeks after culturing in the regeneration media (Fig. 1). The results of the optimization experiment are shown in Tables 1 and 2. Statistical analysis is included in Table 3. In the range of 5, 10, 20, 30 μ M of BA, no significant difference in regeneration frequency was observed. When used in combination with BA, the variance of NAA had the most significant effect on the regeneration frequency. Shoots could not regenerate without NAA, but in the case of high concentrations of NAA, the regeneration frequency was reduced. IAA also had a significant effect on the regeneration frequency. By contrast with NAA, however, the best regeneration was observed when the concentration of IAA was zero. In further selection of regeneration medium, IAA

Table 3.- Analysis of variance
Tableau 3.- Analyse de variance

Source	df	SS	S	F	F0.05(3,6)
B	3	1136.825	378.94	11.77a	4.76
C	3	500.555	166.85	5.18b	
D	3	351.27	117.09	3.64ns	
A	3	14.405	32.19		
Error	3	178.745			
Total	15	2181.8			

a: Significant at the 0.01 level

b: Significant at the 0.05 level

ns: Not significant.

was left out. Phloridzin can be a factor of considerable importance. The dihydrochalcone glycoside phloridzin and its aglycone phloretin are primary phenolic compounds in the foliage of *Malus* species (Williams, 1964). The putative role of phloridzin and its byproducts is controversial. This compound was found to be effective for adventitious shoot formation in some kinds of woody plants. Appropriate concentrations of phloridzin increased the regeneration efficiency of *Cedrus* and *Rosa*. The range of concentrations was 1-7 mg/l (Li, 1983; Tan, 1991). In the shoot tip culture of apple, the regeneration efficiency of medium supplemented with phloridzin was 2-3 times that of control (Jones, 1976). In our experiments, the significance of phloridzin is not very clear. Because of its importance in other systems, however, it should be tested further.

According to the results of this experiment, the better regeneration media for *Datisca glomerata* were: 1 - MS + BA, 10 μ M + NAA, 0.5 μ M + phloridzin, 10 mg/l; and 2 - MS + BA, 20 μ M + NAA, 1 μ M + phloridzin, 1 mg/l. Because 10 mg/l phloridzin and 20 μ M concentrations of BA could be too high, we carried out a further regeneration experiment, using MS + BA, 10 μ M + NAA, 0.5 μ M + phloridzin, 1 mg/l. The regeneration efficiency was comparable to the best results of the optimization experiment (2.6 ± 0.8 shoots per 10 explantlets, with 7 replicates).

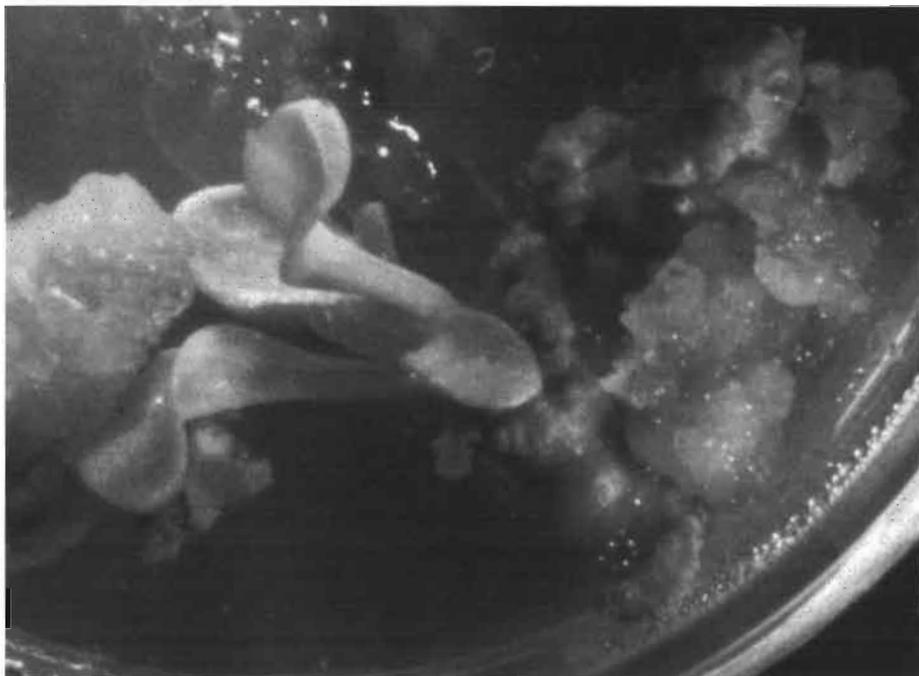


Fig. 1.- Shoot regeneration from leaf callus tissues of *Datisca glomerata*
 Fig. 1.- Régénération de tige à partir de cals d'origine foliaire de *Datisca glomerata*

BIBLIOGRAPHY

- Box C.E.P., Hunter W.G. & J.S. Hunter, 1978.- Statistics of experimenters. Wiley, New York, 374-418.
- Botta B., G. Dalloio, F. Ferrari, B. Monacelli *et al.*, 1989.- Cell suspension culture of *Cassia didymobotrya*: optimization of growth and secondary metabolite production by application of the orthogonal design method. *J. Plant Physiol.*, **V** (135), 290-294.
- Diouf D., H. Gherbi, Y. Prin & C. Franche, 1995.- Hairy root nodulation of *Casuarina glauca*, a system for the study of symbiotic gene expression in an actinorhizal tree. *Mol. Plant Microbe interactions*, **8** (4), 532-537.
- Jones O.P., 1976.- Effect of phloridzin and phloroglucinol on apple shoots. *Nature*, **V** (262), 392-393.
- Li Z., 1983.- Effect of phloridzin on *in vitro* culture of *Cedrus* and *Rosa*. *Comm. of Plant Physiol.* (in Chinese), **V** (4), 37-39.
- Lin D.G., 1982.- Mathematical principles of biostatistics (in Chinese), 335-401.
- Murashige T. & F. Skoog, 1962.- A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, **V** (15), 473-497.
- Phelep M. A. Petit, L. Martin & E. Duhoux, 1991.- Transformation and regeneration of a nitrogen-fixing tree *Allochcasuarina verticillata* Lam. *Bio-Technology*, **9** (5), 461-466.
- Taguchi G., 1987.- Systems of experimental design. UNIPUB, New York.
- Tan W.C. & C.G. Dai, 1991.- Tissue culture technology of ornamental plants (in Chinese), 72-73.
- Williams A.H., 1964.- Dihydrochalcones: their occurrence and use as indicators in chemical plant taxonomy. *Nature*, **202**, 824-825.
- Wold S., M. Sjostrum, R. Carlson, T. Lundstet, S. Hellberg, B. Skakerberg, C. Wikstran & J. Ohman, 1986.- *Anal. Chim. Acta*, **191**, 17-32.

Gene expression in ineffective actinorhizal nodules of *Alnus glutinosa*

by Changhui Guan ⁽¹⁾, Diederick J. Wolters ⁽²⁾, Cornelis van Dijk ⁽²⁾,
Antoon D.L. Akkermans ⁽³⁾, Ab van Kammen ⁽¹⁾, Ton Bisseling ⁽¹⁾
and Katharina Pawlowski ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Department of Molecular Biology, Agricultural University, 6703 HA Wageningen, The Netherlands

⁽²⁾ Department of Plant-Microorganism Interactions, Netherlands Institute of Ecology,
6666 GA Heteren, The Netherlands

⁽³⁾ Department of Microbiology, Agricultural University, 6703CT Wageningen, The Netherlands

Summary. - Several *Frankia* strains have been shown to induce ineffective, *i.e.* non-nitrogen fixing nodules, sometimes in a host-plant dependent manner. Previous studies have demonstrated that the resistance to nodulation of *Alnus glutinosa* by ineffective *Frankia* strains is genetically determined. In this study, ineffective nodules induced on susceptible *Alnus glutinosa* clones by soil suspensions from a local swamp were analysed cytologically. Comparisons with effective nodules showed that ineffective nodules contain higher amounts of polyphenols than effective nodules, indicating a plant defense reaction. Polyphenols were found even in the infected cortical cells. *In situ* hybridization with a *Frankia* antisense 16S rRNA probe showed that *Frankia* is degraded at an early stage of development of infected cells. The mRNAs of two plant genes, *ag12* and *ag13*, which had been found to be expressed in the infected cells of effective nodules, were localized in ineffective nodules. Their expression patterns seemed to be analogous in both types of nodules.

Résumé. - Plusieurs souches de *Frankia* induisent des nodules non-effectifs, c'est-à-dire non fixateurs d'azote, parfois sous la dépendance de la plante-hôte. De précédentes études ont montré que la résistance d'*Alnus glutinosa* à l'infection par des souches de *Frankia* non-effectives répond à un déterminisme génétique. Au cours de la présente étude, des nodules non-effectifs, induits sur des clones susceptibles d'*Alnus glutinosa* par des suspensions de sols locaux, ont fait l'objet d'une analyse cytologique. Une comparaison avec des nodules effectifs montre que les nodules non-effectifs contiennent plus de polyphénols, ce qui indique qu'une réaction de défense a lieu. Des polyphénols ont également été observés dans les cellules infectées du cortex. Une hybridation *in situ* avec une sonde antisens pour l'ARNr 16S de *Frankia* montre que *Frankia* subit très tôt une dégradation lors du développement des cellules infectées. La localisation des ARNm d'*ag12* et *ag13*, deux gènes de la plante qui sont exprimés dans les cellules infectées des nodules effectifs, a été réalisée. Une expression analogue semble exister dans les deux types de nodules.

Key words : *Frankia* - *ag12* - *ag13* - plant defense.

INTRODUCTION

Ineffective actinorhizal root nodules lack the ability to fix nitrogen. They have been observed on seedlings of different host species, induced by different sources of inoculum (Hahn *et al.*, 1988 ; Van Dijk *et al.*, 1988). In most cases, the induction of ineffective nodules depends on the host plant species (Van Dijk *et al.*, 1988 ; Bosco *et al.*, 1992). However, also presumably host-independently ineffective *Frankia* strains were isolated (Hahn *et al.*, 1988 ; van Dijk and Sluimer-Stolk, 1990) which seem to be phylogenetically related (Hahn *et al.*, 1989 ; Wolters, Akkermans and Woldendorp, unpublished observations).

Effective actinorhizal nodules consist of multiple lobes representing modified lateral roots without root caps, with a superficial periderm and infected cells in the expanded cortex. Due to the activity of the apical meristem, a developmental gradient of infected cells is formed in the cortex which can be divided into four zones. The meristematic zone (zone 1) consists of small dividing cells that are not infected by *Frankia*. The infection zone (zone 2) contains enlarging cortical cells some of which are infected by *Frankia* and are gradually filled with *Frankia* hyphae from the center outward (Lalonde, 1979 ; Schwintzer *et al.*, 1982 ; Berry and Sunell, 1990). In cells completely filled with hyphae, provesicles are formed as terminal swellings on hyphae (Fontaine *et al.*, 1984). In the course of the differentiation of provesicles into vesicles, bacterial nitrogen fixation (*nif*) gene expression is induced and nitrogenase is produced (Huss-Danell and Bergman, 1990 ; Pawlowski *et al.*, 1995). The onset of *nif* gene expression marks the transition from the infection zone to the fixation zone (zone 3). In the senescent zone (zone 4), *nif* gene expression is switched off and degradation of endosymbiont material and host cytoplasm is taking place (Berry and Sunell, 1990). The expression of plant genes along this developmental gradient has been analysed. *ag12*, encoding a nodule-

specific serine protease, was found to be expressed at highest levels in infected cells of the infection zone (zone 2 ; Ribeiro *et al.*, 1995). *ag13*, encoding a nodule-enhanced putative cell wall protein, was expressed in the pericycle of the central vascular bundle of nodule lobes and in infected cells of the senescence zone (zone 4 ; Guan *et al.*, 1997).

Since in ineffective nodules, no nitrogen fixation takes place, the plant does not have to provide the structures for efficient nitrogen assimilation as well as nitrogen and carbon transport. In order to find out whether the expression patterns of genes whose products are not directly involved in actinorhizal nodule metabolism, are influenced by the absence of nitrogen fixation, we studied the expression of *ag12* and *ag13* in ineffective nodules of *A. glutinosa*. The viability of the endosymbiont in infected cells of these nodules was examined by *in situ* hybridization with a *Frankia* 16S rRNA antisense probe.

MATERIALS AND METHODS

Plant growth conditions

Stem cuttings of *A. glutinosa* were used to obtain ineffective nodules because they were found to be susceptible to nodulation by ineffective *Frankia*. Stem cuttings of 2-4 cm were surface sterilized by wiping with a tissue with 70 % ethanol, and put on perlite with demineralized water. The perlite containers were covered with perspex plates and placed in climate-chamber at 23°C, with an illumination of 16 hrs and a relative humidity of 70 %. After roots emerged, plants were transferred to half strength modified Hoagland solution (Quispel, 1954). Trace elements were added according to Allen and Arnon (1955), and Fe-citrate (0.02 mM) was used as an iron source. The soil sample used for inoculation was collected at the swamp-area Boezem van Brakel (Dutch State Survey Grid 0132.6 424.0) where high amounts of ineffective *Frankia* and low effective/ineffective nodulation ratio had been found (Wolters *et al.*, 1996). Plants with a sufficiently large root system (at least 10 cm of roots) were transferred to full strength Hoagland solution with reduced N-content, with addition of 80 ppm of Precicur N (Schering Agrunol B.V., The Netherlands), according to Van Dijk and Sluimer (1994). This fungicide treatment was continued after the inoculation of the plants until the end of the experiment. Inoculation was carried out after one week, with freshly prepared soil-inocula. These were added to the plant root system at the equivalent of 20 g of soil per liter of Hoagland solution. Nodules were harvested about eight weeks after inoculation.

Cytology and *in situ* hybridization

Fixation and embedding of nodules have been described by Ribeiro *et al.* (1995). *In situ* hybridization was performed as described by Cox and Goldberg (1988) and adapted by Van de Wiel *et al.* (1990). For photography, sections were stained with 0.02 % Ruthenium Red for 5 min. and with 0.025 % Toluidine Blue for 2 min., dehydrated via a graded ethanol series and mounted with DePeX (BDH Laboratories, Poole, UK).

The preparation of sense and antisense probes of *ag12* and *ag13* has been described by Ribeiro *et al.* (1995) and Guan *et al.* (1996), respectively. For the *Frankia* 16S rRNA antisense probe, rDNA was amplified from ineffective *A. glutinosa* nodules using primer 5'-CACGGATCCAGAGTTTGGAT(C/T)(A/C)TGGCTCAG-3' for the conserved eubacterial sequence, and primer 1115HindIII for the sequence specific for ineffective strains (Embley *et al.*, 1988; Wolters, Akkermans and Woldendorp, unpublished observations). Polymerase chain reaction (PCR) conditions were 3 min. at 95°C, then 35 cycles of 1 min. at 93°C, 2 min. at 48°C, 3 min. at 72°C, 5 min. at 72°C, then 5 min. at 72°C. An *Bam*HI-*Eco*RI subfragment (corresponding to *E. coli* rRNA positions 7 to 674) of the PCR product was subcloned into Bluescript KS⁺ (Stratagene, La Jolla, CA, USA). For *in vitro* transcription, the resulting plasmid was linearized with *Bam*HI, and antisense RNA was produced using T3 RNA polymerase.

RESULTS AND DISCUSSION

Ineffective nodules of *Alnus glutinosa* are characterized by slow growth and an almost complete deficiency of *Frankia* vesicle development, *i.e.* the absence of mature vesicles (Van Dijk and Sluimer-Stolk, 1990). We have analysed ineffective actinorhizal nodules induced by soil suspensions from a local source on susceptible *A. glutinosa* plants (see Materials and Methods). The soil suspensions led to the induction of ineffective as well as effective nodules, which were harvested eight weeks after inoculation and embedded in paraffin. The symbiotic efficiency of the nodules was investigated by microscopical examination for the presence of nitrogen-fixing vesicles in infected cortical cells in nodule sections. The structures of effective and ineffective nodules were compared (Pl. I, fig. A and D). In ineffective nodules, development of lobes stops very soon, leading to a very compact structure (Pl. I, fig. A). Ineffective nodules contain higher amounts of polyphenols than effective nodules (Pl. I, fig. A and D), and often, infected cells of ineffective nodules

contain polyphenols (Pl. I, fig. B and C), a phenomenon rarely observed in infected cells of effective nodules.

The zonation of the cortex in the lobes of effective nodules is based on nitrogen fixation by *Frankia* in infected cells of the fixation zone (Ribeiro *et al.*, 1995) and therefore not applicable to ineffective nodules. However, infected cells are filled with *Frankia* hyphae from the center outward in ineffective as well as in effective nodules (Pl. I, fig. B and E). Thus, it is possible to distinguish between a zone 2 (infection zone) equivalent in ineffective nodules, containing infected cells partially filled with *Frankia* hyphae, and a zone 3 containing infected cells filled completely with hyphae. A difficulty arises when the senescence zone (zone 4) equivalent has to be defined. Using paraffin sections and light microscopy, it is not possible to distinguish between cells containing viable *Frankia* hyphae (Pl. I, fig. B) and cells displaying senescence (Pl. I, fig. F). Therefore, sections of ineffective nodules were hybridized with a *Frankia* 16S rRNA probe to distinguish between cortical cells with rRNA containing viable *Frankia* hyphae and those with collapsed hyphae. The results are shown in Plate II, fig. A. Only at the tip of the nodule lobe, all infected cells showed hybridization with the *Frankia* rRNA probe. Below that area, non-hybridizing and hybridizing cells were found. Thus, endosymbiont senescence in ineffective nodules seems to start shortly after the cortical cells have been filled with hyphae material, but not in a uniform manner. This variability of reaction of the plant against non-nitrogen fixing *Frankia* is also visible in the differences in polyphenol content of infected cells (see above).

Expression of *ag12* and *ag13* was localized in ineffective *A. glutinosa* nodules by *in situ* hybridization with antisense RNA probes. *ag12* expression was found to be restricted to a few infected cells in an early developmental stage, some of them incompletely and others completely filled with *Frankia* hyphae (Pl. II, fig. D and E). This

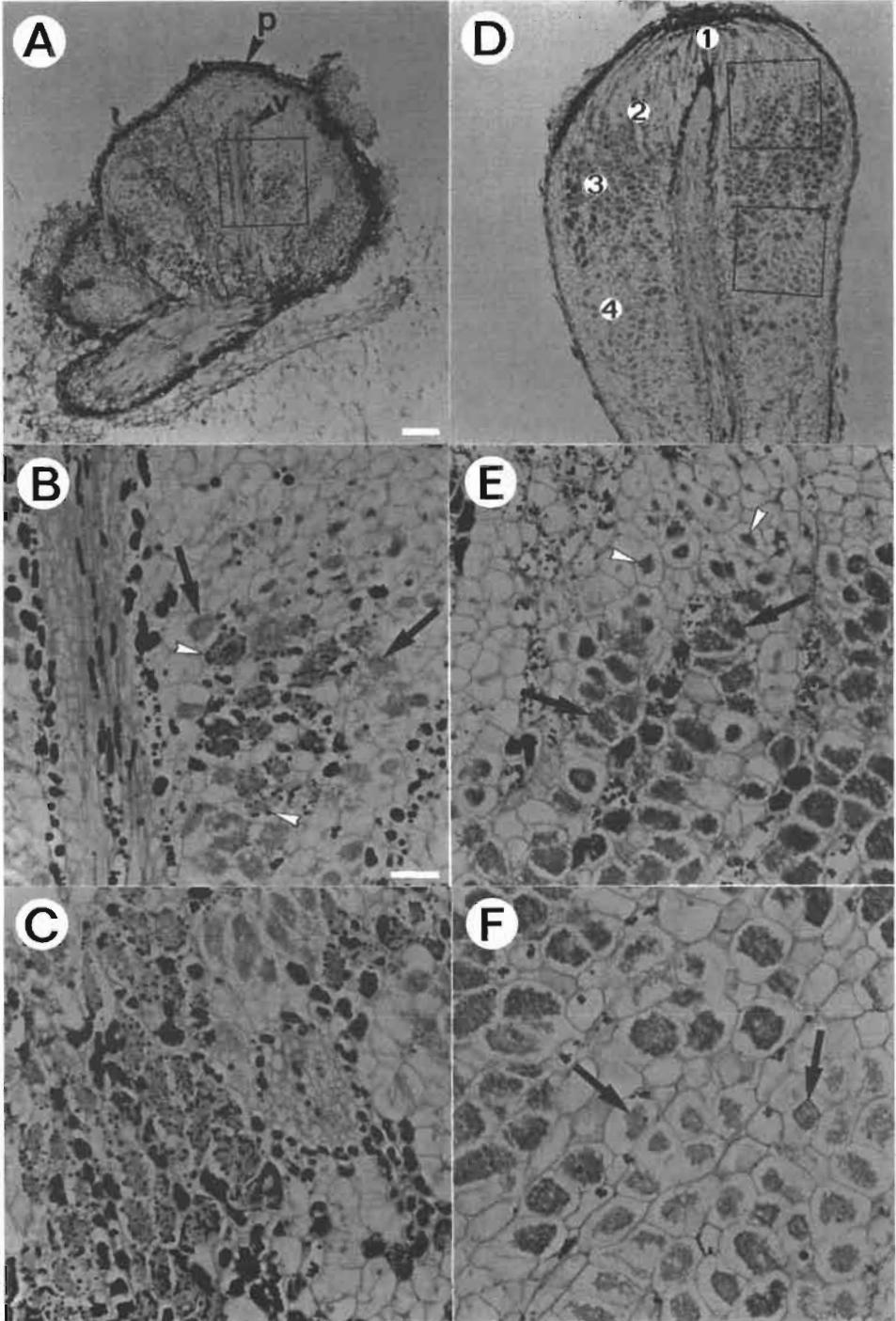


Plate I

pattern could be equivalent to the high levels of *ag12* expression in the infection zone of effective nodules. In effective nodules, *ag13* has been found to be expressed in the pericycle of the central vascular bundles of the nodule lobes, and in the infected cells of zone 4. In the pericycle of the nodule vascular bundles of the ineffective nodules, *ag13* expression was below the detection level (Pl. II, fig. F and G). However, *ag13* expression could be detected in several infected cells of ineffective nodules (Pl. II, fig. F and 2G). Developmentally, these cells were older than those expressing *ag12*, but a clear correlation between endosymbiont degradation and *ag13* expression could not be established (Pl. II, fig. A, 2B and C). Although in cells

expressing *ag13*, no *Frankia* rRNA hybridization could be detected, a considerable amount of infected cells did not hybridize with either probe. No signal was found in hybridizations with sense RNA probes (data not shown). Altogether, the results of localization of *ag12* and *ag13* expression imply that both genes have analogous expression patterns in effective and ineffective *Alnus* nodules, namely in each case depending on the developmental stage of the infected cortical cells. Both *ag12* and *ag13* have been hypothesized to be localized in the cell wall-like matrix surrounding *Frankia* in the infected cells, *ag13* as part of the matrix and *ag12* being involved in the processing of a matrix component (Ribeiro *et al.*, 1995 ; Guan *et al.*, 1996). Thus, the

Plate I.- Cytological comparison between ineffective and effective nodules of *A. glutinosa*. Nodules were harvested eight weeks after inoculation, fixed and embedded in paraffin. 7 μ m thick sections were put on slides, deparaffinized and stained with Ruthenium Red and Toluidine Blue. Magnifications are the same in A, D and in B, C, E, F, respectively. The shift from zone 2 to zone 3 and from zone 3 to zone 4 in effective nodules has been defined by *Frankia nifH* expression in the infected cells, therefore it can here only be approximated based on the presence of *Frankia* vesicles. *Frankia nifH* expression starts some time after vesicles are visible and is switched off some time before vesicles disappear (Pawlowski *et al.*, 1995).

(A) Section of an ineffective nodule. The area magnified in (B) is indicated. V, vascular bundle ; P, periderm. Bar = 500 μ m. (B) Detail of (A) : no vesicles are visible in the infected cells (arrows). Several infected cells contain dark-staining polyphenols (arrowheads). Bar = 125 μ m. (C) Detail of another ineffective nodule : high amounts of polyphenols are present. (D) Longitudinal section of a lobe of an effective nodule. Based on the developmental stage of the infected cortical cells, four zones can be distinguished : 1, the meristem at the tip of the nodule lobe ; 2, the infection zone containing cells which are being filled with *Frankia* hyphae from the center outward ; 3, the fixation zone with nitrogen-fixing cells containing fully differentiated *Frankia* vesicles ; and 4, the senescence zone where *Frankia* material and plant cytoplasm are degraded. The areas magnified in (E) and (F) are indicated by white boxes. (E) Detail of (D) : vesicles can be seen in the infected cells of zone 3 (arrows), but not yet in the infected cells of zone 2 (arrowheads). (F) Detail of (D) : in the infected cortical cells of zone 4 (arrows), *Frankia* vesicles have disappeared.

Planche I.- Comparaison cytologique d'un nodule non-effectif et d'un nodule effectif d'*Alnus glutinosa*. Des nodules prélevés huit semaines après l'inoculation ont été fixés puis inclus dans de la paraffine. Des coupes de 7 microns ont été colorées avec du rouge de Ruthénium et du bleu de Toluidine après avoir été déparaffinées. L'échelle est identique pour A et D et pour B, C, E et F respectivement. Le passage de la zone 2 à la zone 3 et de la zone 3 à la zone 4 dans des nodules effectifs a été défini à partir de l'expression de *nifH* dans les cellules infectées, par conséquent, ici, il ne pourra être défini que de façon approximative sur la base de la présence des vésicules de *Frankia*. L'expression du gène *nifH* de *Frankia* débute peu après l'apparition des vésicules et prend fin un peu avant la disparition des vésicules (Pawlowski *et al.*, 1995).

(A) Coupe d'un nodule non-effectif. La zone agrandie en (B) est indiquée. V, tissus vasculaires ; P, périderme. Traits = 500 μ m. (B) Détail de (A) : aucune vésicule n'est visible dans les cellules infectées (flèches). Plusieurs cellules infectées contiennent des polyphénols donnant une coloration noire (flèches courtes). Trait = 125 μ m. (C) Détail d'un autre nodule non-effectif : une grande quantité de polyphénols est présente. (D) Coupe longitudinale d'un lobe de nodule effectif. Le développement des cellules infectées corticales permet de définir 4 zones : 1, le méristème à l'extrémité du lobe nodulaire ; 2, la zone d'infection qui contient des cellules qui se remplissent d'hyphes de *Frankia* de façon centrifuge ; 3, la zone de fixation avec des cellules fixatrices d'azote qui contiennent des vésicules de *Frankia* différenciées ; et 4, la zone de sénescence où *Frankia* et le cytoplasme de la cellule végétale sont dégradés. Les zones agrandies en (E) et (F) sont indiquées par des rectangles blancs. (E) Détail de (D) : des vésicules peuvent être observées dans les cellules infectées de la zone 3 (flèches), mais pas dans les cellules infectées de la zone 2 (flèches courtes). (F) Détail de (D) : dans les cellules corticales infectées de la zone 4 (flèches), les vésicules de *Frankia* disparaissent.

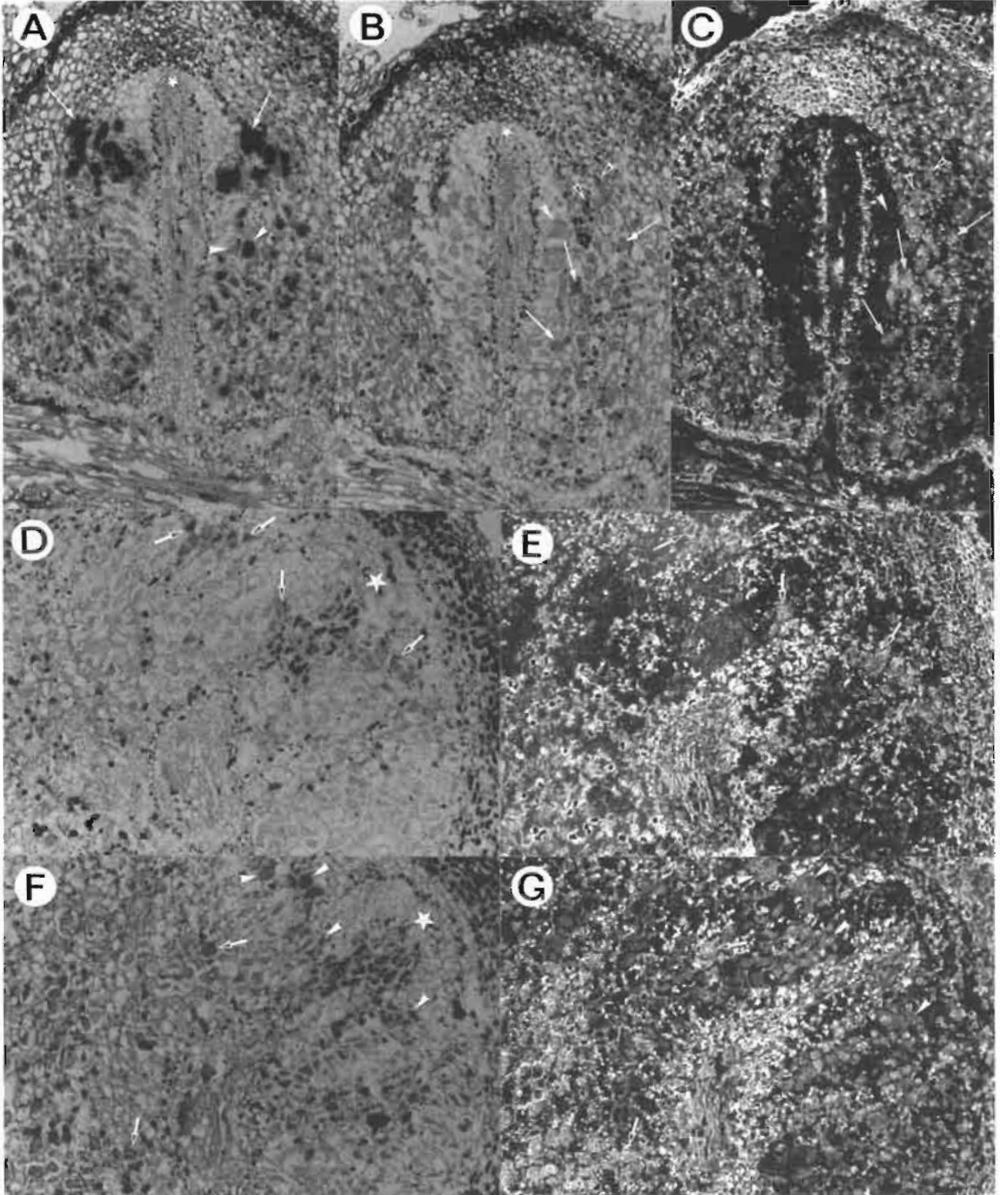


Plate II

structure of the material surrounding intracellular *Frankia* seems to be similar in effective and ineffective symbioses. However, further studies are needed to analyse the structure of this interface and its function in the symbiosis.

A comparison of *ag12* and *ag13* expression levels in effective versus ineffective nodules was not attempted since it cannot be conclusive, regarding the differences in growth and metabolic activity between both types of nodules. However, the relation of expression levels of both genes seems to differ in both types of nodules. In effective

nodules, using both RNA gel blot and *in situ* hybridization techniques, *ag12* expression levels have always been found to be higher than *ag13* expression levels (data not shown), while in two independent *in situ* hybridizations of ineffective nodules, *ag13* expression levels were significantly higher than those of *ag12*. In view of the fact that in effective nodules, *ag12* expression is related to early and *ag13* expression to late developmental stages of infected cells (Ribeiro *et al.*, 1995 ; Guan *et al.*, 1996), this is consistent with the early degradation of the endosymbiont in infected cells in inef-

Plate II.- Gene expression in ineffective nodules of *A. glutinosa*. A, B, D, F represent bright field micrographs ; silver grains denoting hybridization are visible as black dots. C, E, G represent dark field photographs ; silver grains denoting hybridization are visible as white dots. Polyphenols show white fluorescence. (A) Hybridization of the section of an ineffective nodule with a *Frankia* antisense 16S rRNA probe. The nodule lobe meristem is marked by a little white star. At the tip of the nodule lobe, all infected cells show hybridization (arrows). Below, infected cells containing viable bacteria, *i.e.* showing hybridization are intermingled with non-hybridizing cells. Arrowheads point at two adjacent cells, one hybridizing with the *Frankia* probe, the other one not. (B/C) An adjacent section of the same nodule lobe as in (A) was hybridized with an *A. glutinosa ag13* antisense RNA probe. The nodule lobe meristem is marked by a little white star in (B). Arrows point at infected cells showing hybridization. White- and black arrowheads point at infected cells containing polyphenols, but not hybridizing with *ag13*; the white fluorescence of the polyphenols can be mistaken for hybridization but the view under epipolarized light shows that no silver grains have accumulated in these cells (data not shown). A white arrowhead points at a cluster of infected cells hybridizing with *Frankia* 16S rRNA in (A), but showing no hybridization with *ag13*. (D/E) Oblique section of an ineffective nodule hybridized with an *A. glutinosa ag12* antisense RNA probe. A white star marks the approximate position of the nodule lobe meristem in (D). Arrows point at infected cells showing hybridization with *ag12*. (F/G) An adjacent section from the same nodule as in (D/E) was hybridized with an *A. glutinosa ag13* antisense RNA probe. The approximate position of the nodule lobe meristem in (F) is marked by a white star. Arrowheads point at infected cells hybridizing with *ag12* in (D/E), but showing no hybridization with *ag13*. Arrows point at infected cells hybridizing with *ag13*.

Planche II.- Expression de gènes dans des nodules non-effectifs d'*Alnus glutinosa*. A, B, D, F représentent des photographies en fond clair ; les grains d'argent qui marquent l'hybridation apparaissent comme des points noirs. C, E, G représentent des photographies en fond noir ; les grains d'argent correspondent alors aux points blancs. Les polyphénols sont responsables d'une fluorescence blanche. (A) hybridation d'une coupe de nodule non-effectif avec une sonde ARN antisens correspondant à l'ARNr 16S de *Frankia*. Le méristème du lobe nodulaire est indiqué par une petite étoile blanche. A l'extrémité du nodule, toutes les cellules infectées présentent une hybridation (flèches). En dessous, les cellules infectées contenant des bactéries viables, c'est-à-dire présentant une hybridation, sont mélangées avec des cellules sans hybridation. Les flèches courtes indiquent 2 cellules adjacentes, une présentant une hybridation avec la sonde de *Frankia*, l'autre pas. (B/C) Coupe adjacente du même lobe nodulaire qu'en (A) a été hybridée avec une sonde antisens pour *ag13*. Le méristème nodulaire est marqué d'une petite étoile blanche en (B). Les flèches indiquent des cellules infectées présentant une hybridation. Les flèches courtes noires et blanches indiquent des cellules infectées contenant des polyphénols, mais qui ne présentent pas d'hybridation avec *ag13*; la fluorescence blanche due aux polyphénols peut passer pour de l'hybridation mais la vue en lumière épipolarisée montre qu'aucun grain d'argent ne s'est accumulé dans ces cellules (résultat pas présenté). Une flèche blanche courte indique un ensemble de cellules infectées qui hybrident avec l'ARNr 16S de *Frankia* en (A) mais qui ne présentent aucune hybridation avec *ag13*. (D/E) Coupe oblique d'un nodule non-effectif hybridée avec une sonde ARN antisens correspondant au gène *ag12* d'*Alnus glutinosa*. Une étoile blanche indique la position approximative du méristème du lobe nodulaire en (D). Les flèches indiquent des cellules infectées présentant une hybridation avec *ag12*. (F/G) Coupe adjacente du même nodule qu'en (D/E) a été hybridée avec une sonde ARN antisens pour *ag13*. La position approximative du méristème du lobe nodulaire en (F) est marquée par une étoile blanche. Les flèches courtes indiquent des cellules infectées qui présentent une hybridation avec *ag12* en (D/E) mais qui ne présentent pas d'hybridation avec *ag13*. Les flèches indiquent des cellules infectées présentant une hybridation avec *ag13*.

fective nodules, as indicated by the *Frankia* rRNA hybridization results.

While ineffective nodules have been described for several actinorhizal symbioses, it is not clear which bacterial and plant functions are determining symbiotic efficiency. Since in some cases, the same *Frankia* strain has been found to form effective or ineffective symbioses depending on the host plant (Van Dijk *et al.*, 1988 ; Bosco *et al.*, 1992), symbiotic efficiency cannot be so-

lely dependent on the ability of the endosymbiont to fix nitrogen, but must have something to do with the signal exchange between both symbiotic partners. The increased polyphenol content of ineffective nodules (Pl. I) points at a plant defense reaction against *Frankia*, but it is not clear whether this is the reason for or a consequence of symbiotic inefficiency.

Acknowledgements - CG and KP were supported by the Dutch Foundation for Scientific Research (NWO).

BIBLIOGRAPHY

- Allen M.B. & D.I. Arnon, 1955.- Studies on nitrogen fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. *Plant Physiol.*, **90**, 366-372.
- Berry A.M. & L.A. Sunell, 1990.- The infection process and nodule development. In : The Biology of *Frankia* and Actinorhizal Plants. C.R. Schwintzer & J.D. Tjepkema (Eds), Academic Press, New York, 61-81.
- Bosco M., M.P. Fernandez, P. Simonet, R. Materassi & P. Normand, 1992.- Evidence that some *Frankia* sp. strains are able to cross boundaries between *Alnus* and *Elaeagnus* host specificity groups. *Appl. Env. Microbiol.*, **58**, 1569-1576.
- Cox K.H. & R.B. Goldberg, 1988.- Analysis of plant gene expression. In : Plant Molecular Biology : A Practical Approach. C.H. Shaw (Ed.), IRL Press, Oxford, England, 1-34.
- Embley T.M., J. Smida & E. Stackebrandt, 1988.- Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Faenia rectivirgula*, *Pseudonocardia thermophila* and *Saccharopolyspora hirsuta*, three wall type IV actinomycetes which lack mycotic acids. *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 961-966.
- Fontaine M.S., S.A. Lancelle & J.G. Torrey, 1984.- Initiation and ontogeny of vesicles in cultured *Frankia* sp. strain HFPAr13. *J. Bacteriol.*, **160**, 921-927.
- Guan C., A.D.L. Akkermans, A. van Kammen, T. Bisseling & K. Pawlowski, 1996.- *ag13* is expressed in *Alnus glutinosa* nodules in infected cells during endosymbiont degradation and in the nodule pericycle. *Physiol. Plant.*, **99**, 601-607.
- Hahn D., M.J.C. Starrenburg & A.D.L. Akkermans, 1988.- Variable compatibility of cloned *Alnus glutinosa* ecotypes against ineffective *Frankia* strains. *Plant Soil*, **107**, 233-243.
- Hahn D., M. Dorsch, E. Stackebrandt & A.D.L. Akkermans, 1989.- Synthetic oligonucleotide probes for identification of *Frankia* strains. *Plant Soil*, **118**, 211-219.
- Hahn D., M.J.C. Starrenburg & A.D.L. Akkermans, 1990.- Growth increment of *Alnus glutinosa* upon dual inoculation with effective and ineffective *Frankia* strains. *Plant Soil*, **122**, 121-127.
- Huss-Danell, K. & B. Bergman, 1990.- Nitrogenase in *Frankia* from root nodules of *Alnus incana* (L.) Moench : immunolocalization of the Fe- and MoFe proteins during vesicle differentiation. *New Phytol.*, **116**, 443-455.
- Lalonde M., 1979.- Techniques and observations of the nitrogen fixing *Alnus* root nodule symbiosis. In : Recent Advances in Biological Nitrogen Fixation. N.S. Subba Rao (Ed.), Oxford University Press and IBH, New Delhi, India, 421-434.
- Pawlowski K., A.D.L. Akkermans, A. van Kammen & T. Bisseling, 1995.- Expression of *Frankia nif* genes in actinorhizal nodules of *Alnus glutinosa*. *Plant Soil*, **170**, 371-376.
- Quispel A., 1954.- Symbiotic nitrogen fixation in non-leguminous plants. I. Preliminary experiments on the root-nodule symbiosis of *Alnus glutinosa* (L.). *Acta Bot. Neerl.*, **3**, 495-511.
- Ribeiro A., A.D.L. Akkermans, A. van Kammen, T. Bisseling & K. Pawlowski, 1995.- A nodule-specific gene encoding a subtilisin-like protease is expressed in early stages of actinorhizal nodule development. *Plant Cell*, **7**, 785-794.
- Schwintzer C.R., A.M. Berry & L.D. Disney, 1982.- Seasonal patterns of root nodule growth, endophyte morphology, nitrogenase activity, and shoot development in *Myrica gale*. *Can. J. Bot.*, **60**, 746-757.
- Van de Wiel C., B. Scheres, H.J. Franssen, M.J. van Lieerop, A. van Lammeren, A. van Kammen & T. Bisseling, 1990.- The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. *EMBO J.*, **9**, 1-7.
- Van Dijk C., A. Sluimer-Stolk & Weber, 1988.- Host-range differentiation of spore-positive and spore-negative strain types of *Frankia* in stands of *Alnus glutinosa* and *Alnus incana* in Finland. *Physiol. Plant.*, **72**, 349-358.
- Van Dijk C. & A. Sluimer-Stolk, 1990.- An ineffective strain type of *Frankia* in the soil of natural stands of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertner. *Plant Soil*, **127**, 107-121.
- Van Dijk C. & A. Sluimer, 1994.- Resistance to an ineffective *Frankia* strain type in *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *New Phytol.*, **128**, 497-504.
- Wolters D.J., A.D.L. Akkermans & C. Van Dijk, 1996.- Occurrence of ineffective *Frankia* strains in wet stands of *Alnus glutinosa* L. Gaertn. in the Netherlands. *Soil Biol. Biochem.* (in press).

La symbiose *Casuarinaceae-Frankia* : approche moléculaire du rôle de la plante-hôte

par Didier Bogusz⁽¹⁾, Claudine Franche⁽¹⁾, Hassen Gherbi⁽¹⁾, Diaga Diouf⁽¹⁾,
Ateff Nassar, Clothilde Gobé⁽¹⁾, Florence Auguy⁽¹⁾, Jeanne Ahée⁽¹⁾ et Emile Duhoux^(1,2)

⁽¹⁾ Laboratoire de Biotechnologie des Symbioses Forestières Tropicales (BSFT),
(ORSTOM-CIRAD-Forêt), 45bis avenue de La-Belle-Gabrielle, F-94736 Nogent-sur-Marne
⁽²⁾ Université Paris 7-D. Diderot

Résumé. - Les *Casuarinaceae* sont des plantes actinorhiziennes susceptibles d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec le microorganisme actinomycète *Frankia*. Dans le but d'identifier des gènes de *Casuarina* participant au processus symbiotique, une banque d'ADNc, issus d'ARNm de nodules, a été construite. L'hybridation différentielle, par utilisation de sondes d'ADNc de nodules et de racines non nodulées a permis d'isoler plusieurs clones dont certains n'hybrident qu'avec la sonde nodule. Quelques clones ont été séquencés et leurs séquences analysées. Afin d'étudier la régulation de l'expression des gènes symbiotiques, deux systèmes de transformation génétique des *Casuarinaceae* ont été mis au point. Le premier système utilise *Agrobacterium rhizogenes* et le second *Agrobacterium tumefaciens* désarmé. L'analyse de l'expression des gènes symbiotiques est effectuée dans les nodules transformés.

Summary. - Casuarinas are actinorhizal tropical trees belonging to the family *Casuarinaceae* and are capable of forming nitrogen fixing root nodules with an actinomycetal microorganism known as *Frankia*. In order to identify genes involved in *Casuarina-Frankia* symbiosis, a *Casuarina glauca* root nodule cDNAs library was constructed and screened differentially with root and nodule cDNA probes. Here, we present the characterization of several *C. glauca* transcripts identified by sequence analysis of cDNA clones. In order to study the symbiotic genes in *Casuarina glauca* root nodules, two genetic transformation systems were developed in *Casuarinaceae* using *Agrobacterium rhizogenes* and *Agrobacterium tumefaciens*. Expression of symbiotic genes was studied in transgenic root nodules.

Key word : actinorhizal symbiosis - *Casuarina glauca* - *Allocasuarina verticillata* - cDNA library - genetic transformation.

I. INTRODUCTION

Les *Casuarinaceae* sont des plantes actinorhiziennes capables de former des nodules fixateurs d'azote en association avec l'actinomycète du sol *Frankia*. Comme les autres nodules actinorhiziens, les nodules des *Casuarinaceae* sont constitués de lobes nodulaires dont chacun correspond à une structure de racine adventive modifiée (Duhoux *et al.*, ce fascicule). Une des questions fondamentales est de savoir quels sont les mécanismes moléculaires qui président à la modification d'une racine adventive orientée vers la fixation de l'azote atmosphérique.

Chez les Légumineuses, on a pu montrer ces dernières années que l'installation de la symbiose et le développement du nodule impliquent une induction coordonnée et séquentielle d'une part de gènes de la bactérie et d'autre part, de gènes spécifiques de l'hôte. Ainsi, de nombreux gènes de la plante hôte, qui sont préférentiellement ou exclusivement exprimés dans les nodules (gènes de nodulines), ont été isolés et caractérisés grâce à l'analyse de banques d'ADNc réalisées à partir d'ARNm de nodules (Legocki et Verma, 1980 ; Scheres *et al.*, 1990b). L'étude des cinétiques d'apparition des nodulines au cours de la symbiose a permis de les classer en deux catégories : les nodulines précoces qui interviennent dans le processus d'infection et les nodulines tardives impliquées dans le fonctionnement du nodule (van Kammen, 1984 ; Franssen *et al.*, 1992). Comme exemple de nodulines précoces, on peut citer l'isolement, chez le pois (*Pisum sativum*), d'ADNc correspondant à des nodulines qui participent au processus d'infection (PsENOD12 et PsENOD5) (Scheres *et al.*, 1990a et b). Des expériences d'hybridation *in situ* ont permis de localiser les transcrits correspondant à PsENOD12 dans les cellules du cordon d'infection, les poils absorbants, les cortex racinaire et nodulaire et dans plusieurs couches cellulaires situées

en amont du cordon d'infection (Franssen *et al.*, 1992). Parmi toutes les nodulines tardives, la plus abondante et la mieux étudiée est la leghémoglobine (Appleby, 1984), en effet, elle représente 20 à 25 % des protéines cytoplasmiques solubles du nodule. Elle est localisée dans le cytoplasme des cellules infectées (Robertson *et al.*, 1984 ; De Billy *et al.*, 1991). La leghémoglobine est la protéine clé de la symbiose fixatrice d'azote, sa fonction est de faciliter la diffusion de l'oxygène (pour revue, voir Appleby, 1984 ; Appleby *et al.*, 1988).

Chez les plantes actinorhiziennes, les protéines qui sont spécifiquement exprimées au cours de l'établissement de la symbiose ont reçu le nom d'actinorhizines (Tremblay *et al.*, 1986). Bien que les symbioses actinorhiziennes aient été l'objet de nombreux travaux ces dix dernières années (Berry, 1994), on a encore très peu d'informations sur l'interaction plante-*Frankia*. La purification de l'hémoglobine de *Casuarina glauca* a été obtenue par Fleming *et al.*, en 1987 et Jacobsen-Lyon *et al.* (1995) ont cloné un gène symbiotique et non symbiotique de l'hémoglobine de cette même plante. La localisation de l'expression des ARNm correspondants au gène de l'hémoglobine symbiotique a été précisée par une étude histologique en hybridation *in situ* sur des coupes longitudinales de nodules de *C. glauca* (Gherbi *et al.*, sous presse). Des travaux récents ont permis également d'isoler un ADNc correspondant à une cystéine protéinase (Goetting-Minesky et Mullin, 1994), ainsi qu'un ADNc correspondant à une protéase sérine de la famille des subtilisines (Ribeiro *et al.*, 1995). Ces deux dernières actinorhizines sont présentes préférentiellement dans les nodules de l'aulne (plante actinorhizienne de la famille des *Betulaceae*).

Par ailleurs, la transformation génétique a beaucoup contribué à comprendre comment sont régulés les gènes symbiotiques chez les Légumineuses. En effet, des Légumineuses transgéniques ont été obtenues

après transformation par des souches désarmées d'*Agrobacterium tumefaciens* ou de souches sauvages d'*Agrobacterium rhizogenes* et ont été utilisées pour l'étude de promoteur de gènes symbiotiques (Hansen *et al.*, 1989 ; Petit *et al.*, 1987). L'analyse des nodules des Légumineuses transformées avec des gènes chimères a permis ainsi l'étude de la régulation des gènes symbiotiques tels que l'hémoglobine (Stougaard *et al.*, 1987), ou la glutamine synthétase (Forde *et al.*, 1989).

Afin de mieux comprendre la contribution de la plante-hôte dans le processus symbiotique *Casuarina-Frankia*, nous avons développé une stratégie intégrée qui comprend des approches complémentaires de physiologie moléculaire. Une banque d'ADNc a été construite et son analyse nous a permis d'identifier et de caractériser certains gènes symbiotiques (Gherbi *et al.*, sous presse). Parallèlement, l'obtention de *Casuarinaceae* transgéniques (Diouf *et al.*, 1995) nous permettra d'étudier la régulation de gènes symbiotiques grâce à l'utilisation de gènes chimères.

II. CONSTRUCTION ET CRIBLAGE D'UNE BANQUE D'ADNC DE NODULES DE *C. GLAUCA*

La banque d'ADNc a été réalisée dans le phage λ gt10 à partir d'ARN messagers extraits de nodules de *C. glauca* âgés d'environ 4 semaines. A ce stade, les nodules sont totalement différenciés, fonctionnels et sont formés de 1 à 4 lobes nodulaires. La banque d'ADNc a été criblée par hybridation différentielle avec des sondes d'ADNc issues de nodules et de racines non nodulées. Ce criblage permet d'analyser la nature des clones d'ADNc en fonction de leur spécificité racinaire et nodulaire. Les différentes étapes de réalisation de la banque et la méthode de criblage différentiel assisté par PCR sont décrites dans la figure 1.

En résumé, un millier de phages recombinants ont été prélevés aléatoirement et les

fragments d'insertion amplifiés par PCR. Environ 60 % de phages possédaient un fragment d'insertion d'au moins 150 pb. Quelques 240 clones dont la taille était supérieure à 400 pb ont été testés par la technique du criblage différentiel assisté par PCR. La révélation des membranes par chimioluminescence nous a permis d'obtenir des clones d'ADNc spécifiques aux nodules ou fortement exprimés dans ceux-ci (Fig. 2). 20 % des clones hybrident fortement avec la sonde nodule seule et près de 60 % présentent une hybridation à la fois avec la sonde nodule et la sonde racine. Le tableau 1 présente l'ensemble des résultats de l'hybridation différentielle.

Certains de ces clones qui hybrident uniquement ou fortement avec la sonde nodule ont été séquencés en partie ou en totalité. L'analyse de leurs séquences, par interrogation de banques de données, indique que pour certains d'entre eux, il s'agit d'ADNc ayant une très forte homologie de séquences avec les gènes codant pour les protéines suivantes : l'hémoglobine symbiotique (Hb), une chalcone synthase (CHS), une métallothionéine (MT), une α -tubuline, une protéine transporteuse de groupement acyl (ACP) et une sous-unité d'une protéase multicatalytique ainsi que d'autres protéines (Tableau 2). Par contre, certains clones séquencés ne présentent aucune homologie avec des séquences d'ADN enregistrées dans les banques de données (Tableau 2).

L'analyse globale des clones isolés et séquencés a montré que nous avons une banque d'ADNc représentative. En effet, le nombre important de clones *hb* obtenus au hasard est un élément en faveur de la qualité de la banque utilisée, puisque l'hémoglobine est une protéine très abondante dans les nodules (Fleming *et al.*, 1987) ; il est donc normal que le nombre de transcrits *hb* clonés soit important. Toutefois, un fort pourcentage de clones analysés par PCR ne semblent pas posséder de fragments d'insertion (environ 40 %). Cette faible effica-

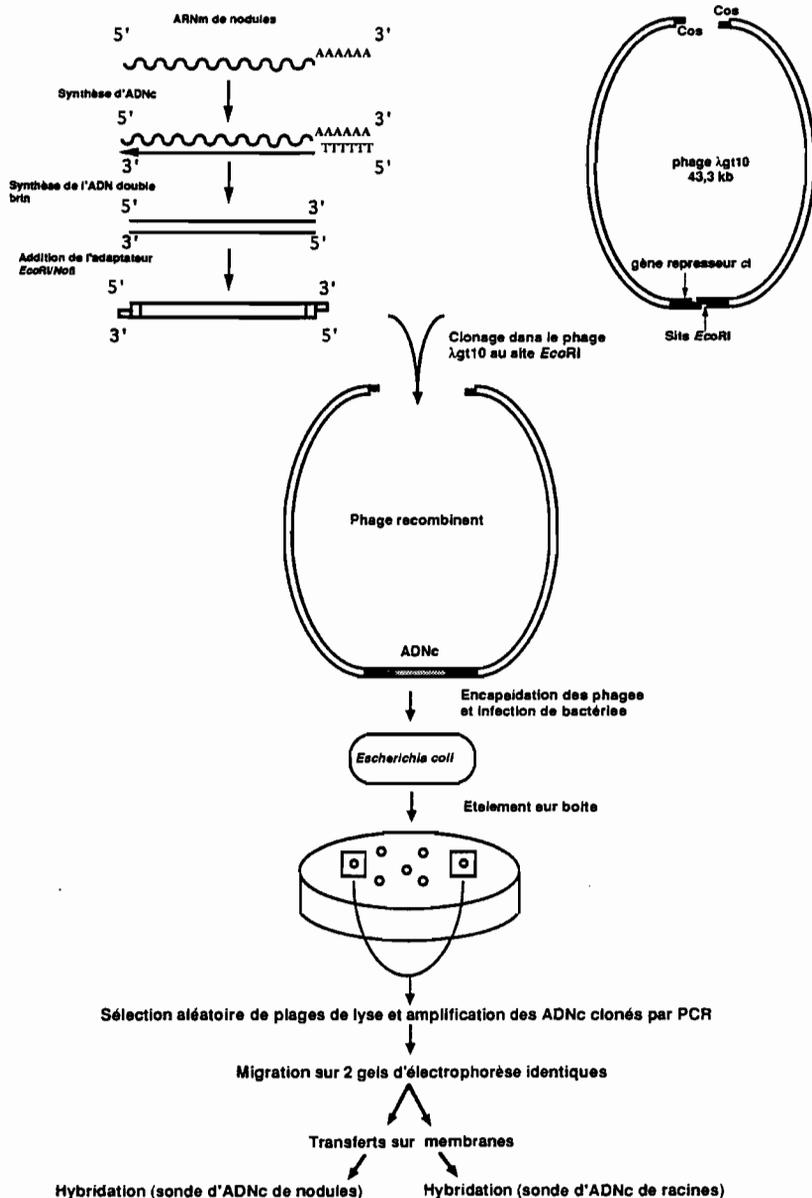


Fig. 1.- Construction et criblage différentiel d'une banque d'ADNc de nodules de *Casuarina glauca*
 Fig. 1.- Construction and differential screening of *Casuarina glauca* nodule cDNA library

Fig. 1.- Construction et criblage différentiel d'une banque d'ADNc de nodules de *Casuarina glauca*
 Fig. 1.- Construction and differential screening of *Casuarina glauca* nodule cDNA library

cité d'insertion suggère l'existence de difficultés au niveau du clonage lors de la construction de la banque. Cela peut être lié à la présence dans la solution de ligation d'inhibiteurs de la ligase. En effet, les végétaux ligneux sont riches en polyphénols, en tannins et en oxydases variées pouvant interférer avec les différentes réactions enzymatiques. En outre, comme le montre le tableau 1, certains clones n'ont hybridé avec aucune des deux sondes, il s'agirait en fait d'ADNc correspondant à des ARNm peu représentés dans les cellules.

Plusieurs clones s'avèrent être de l'hémoglobine, ce qui montre bien que c'est la protéine la plus importante de la symbiose fixatrice d'azote. Chez les Légumineuses

notamment, son rôle est bien connu; il s'agit de permettre le transport et la diffusion de l'oxygène jusqu'au microorganisme symbiote dans un environnement où une faible pression d'oxygène est maintenue afin de préserver l'activité de la nitrogénase (pour revue voir Appleby, 1984 ; Appleby *et al.*, 1988). Chez *Casuarina*, la protéine a été isolée et étudiée (Fleming *et al.*, 1987 ; Kortt *et al.*, 1988) ; elle présente les mêmes propriétés biochimiques que la leghémoglobine de légumineuses comme le poids moléculaire ou l'affinité à l'oxygène; elle remplirait dans ce cas, une fonction similaire (Fleming *et al.*, 1987). Des alignements entre la séquence en acides aminés déduite à partir d'un clone hémoglobine (Cg-1F) et d'autres hémoglobines végétales connues ont révélé 42,5 % d'homologie avec la séquence de la leghémoglobine de soja (*Lba*) et 50 % d'homologie avec l'hémoglobine de *Parasponia* (non Légumineuse symbiotique) (Fig. 3).

Le clone Cg-a51 correspond à la chalcone synthase (CHS) qui est une enzyme dont le rôle chez les plantes est multiple (pour revue voir Martin, 1993). En effet, la chalcone synthase joue un rôle majeur dans la biosynthèse des flavonoïdes (composés phénoliques). Les flavonoïdes interviennent dans les mécanismes de défense de la plante, ce sont aussi des composés qui peuvent activer la division cellulaire (par inhibition du transport des auxines). Dans la symbiose *Rhizobium*-Légumineuses, des études ont montré que lors des premiers stades d'infection entre *Rhizobium* et la plante-hôte, des composés dérivés des flavonoïdes interagissent avec la protéine NodD pour induire l'expression des autres gènes *nod* et permettre ainsi la nodulation (Firmin *et al.*, 1986 ; Peters *et al.*, 1986). D'autre part, il a été montré, chez beaucoup de plantes, que la CHS appartient à une famille multigénique dont la régulation et l'induction sont différentes en fonction des tissus de la plante (Estabrook et Sengupta-Goaplan, 1991 ; Hirsch *et al.*, 1989 ; Recourt *et al.*, 1989 ;

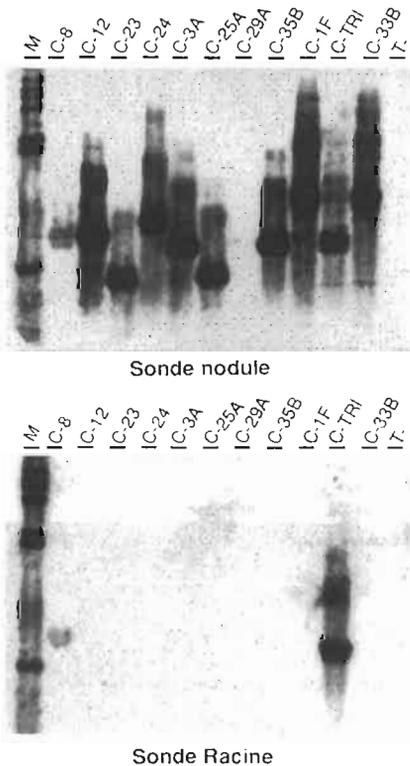


Fig. 2.- Analyse par Southern blot de clones d'ADNc amplifiés par PCR

Fig. 2.- Southern blot analysis of PCR amplified cDNA clones

Tableau 1.- Analyse de clones d'ADNc par criblage différentiel avec des sondes d'ADNc de nodules et de racines
 Table 1.- Analysis of cDNAs clones by differential screening with nodule and root cDNA probes

Nombre de clones analysés	Nombre de clones hybridant avec la sonde racines	Nombre de clones hybridant avec la sonde nodules	Nombre de clones nodule spécifique	Nombre de clones n'hybridant pas avec les 2 sondes
240	89	118	49	102

Tableau 2.- Analyse de séquences de clones d'ADNc
 Table 2.- Sequence analysis of cDNA clones

Clones	Homologie	
	Nature du gène	Source d'homologie
Hybridation avec sonde d'ADNc de nodules seule		
Cg-1F; Cg-24; Cg-12; Cg-55H; Cg-3A; Cg-23; Cg-25A; Cg-35b	Hémoglobine	Soja. <i>Parasponia</i>
Hybridation avec sonde d'ADNc de racines et de nodules		
Cg-a51	Chalcone synthase	Haricot, Petunia, Vigne
Cg-TR1	Métallothionéine	<i>Mimulus</i> , Ricin
Cg-8	Acyl Carrier Protein (ACP)	Epinard, orge.
Cg-55AB	Sous-unité d'une protéase multicatalytique (MCP)	Rat
Cg-M72C	α -Tubuline	Maïs, <i>Arabidopsis</i>
Cg-L96	Protéine ribosomale	<i>Arabidopsis</i>
Cg-b78	Non identifié	
Cg-2A	Non identifié	
Cg- α 1	Non identifié	
Cg-32A	Non identifié	
Cg-82A	Non identifié	
Cg-84A	Non identifié	
Cg-P38	Non identifié	
Cg-P18	Non identifié	
Cg-P42	Non identifié	

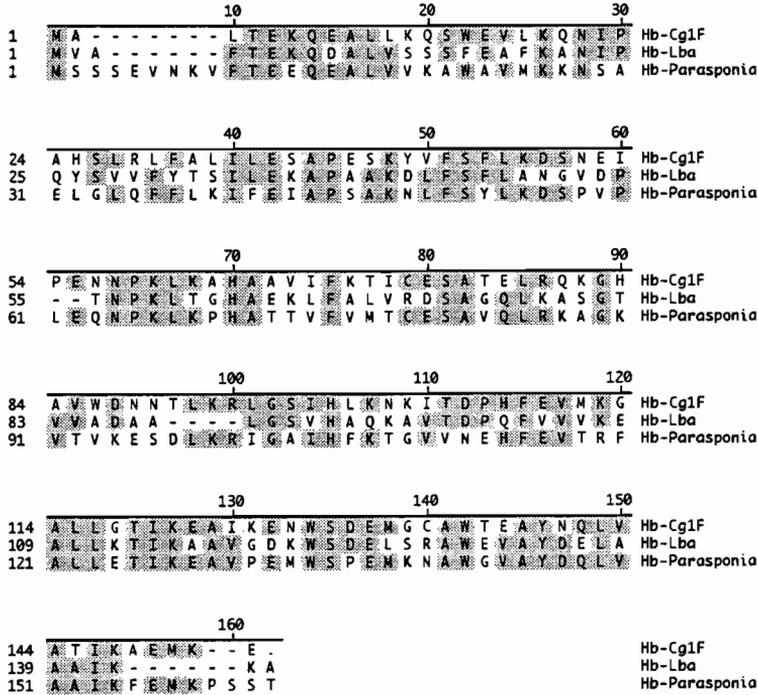


Fig. 3.- Alignement de la séquence en acides aminés du clone HbCg-IF avec celles de la légghémoglobine de soja (Lba) et de l'hémoglobine de *Parasponia*.

Fig. 3.- Amino acid sequence alignment of HbCg-IF clone with soybean leghemoglobin (hbLba) and *Parasponia* hemoglobin.

Yang *et al.*, 1992 ; McKhann et Hirsch, 1994). Chez *Casuarina glauca* l'existence de tels d'isomères de la CHS dont certains limités aux nodules n'est pas à exclure.

L'analyse de la séquence du clone Cg-TRI a montré qu'il s'agissait d'une métallothionéine qui est une petite protéine riche en cystéine dont l'arrangement lui permet de complexer des métaux lourds. Chez les animaux, les métallothionéines sont des chélateurs de métaux et jouent un rôle important dans le métabolisme et la détoxification des certains métaux lourds comme le cuivre, le zinc ou le cadmium (Kägi et Schäffer, 1988 ; Robinson *et al.*, 1993). Elles ont été peu étudiées chez les végétaux même si de telles protéines ont été identifiées, comme chez le pois (Evans *et al.*,

1992), *Mimulus* (de Miranda *et al.*, 1990), le soja (Kawashima *et al.*, 1991) ou l'orge (Okumura *et al.*, 1991). Les *Casuarinaceae* ont la propriété d'être naturellement tolérantes à des quantités élevées de métaux lourds (reboisement de sites miniers de nickel en Nouvelle Calédonie). Par ailleurs, le fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote nécessite l'utilisation de métaux tels que le fer, le molybdène ou le manganèse qui sont présents dans les sites actifs des enzymes et dans la structure des cofacteurs impliqués dans la symbiose (Yates, 1992). Dans la symbiose *Rhizobium-Légumineuses*, les protéines correspondant aux gènes de nodulines précoces ENOD3 et ENOD14 possèdent un domaine cystéine qui suggère un rôle de liaison à métaux (Scheres *et al.*, 1990b).

D'autres clones analysés correspondent à des protéines comme la protéine transporteuse de groupement acyl (ACP) (clone Cg-8) qui intervient dans le métabolisme des lipides (Hansen et Kauppinen, 1991 ; Cahoon et Ohlroge, 1994 ; Voets *et al.*, 1994) ; l' α -tubuline qui joue un rôle important dans les processus cellulaires de base et dans la morphogenèse chez les plantes (Kopczak *et al.*, 1992) ou l'adénylate cyclase (clone Cg-89A) liée à la synthèse de l'AMP cyclique et est associée à la membrane plasmique (Ohkubo *et al.*, 1992) ou encore la protéinase à activité multicatalytique (clone Cg-55AB) qui a non seulement un rôle protéolytique, mais aussi de régulateur cellulaire et de stimulateur de l'ATP dans le catabolisme protéique (Kremp *et al.*, 1986 ; Orłowski, 1990 ; Sorimachi *et al.*, 1990 ; Schliephacke *et al.*, 1991). Toutes ces protéines peuvent intervenir dans l'organogenèse du nodule pour la formation de nouvelles parois de nature lipidique ou polysaccharidique par exemple.

En revanche, certains clones séquencés n'ont pas donné de correspondance à des protéines ou gènes connus par interrogation des banques de données, il pourrait en fait s'agir de nouvelles protéines non identifiées et dont le rôle est inconnu pour l'instant.

III. TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE DES CASUARINACEAE

A. Le système *A. rhizogenes*

Agrobacterium rhizogenes est une bactérie phytopathogène du sol capable d'induire des racines au point d'infection chez plusieurs dicotylédones. Nous avons donc

montré que *Casuarina glauca* est sensible à la souche A4RS (Jouanin *et al.*, 1986) d'*Agrobacterium rhizogenes*. La technique utilisée consiste à enduire une aiguille d'une culture fraîche d'*Agrobacterium rhizogenes* contenant un vecteur binaire dans lequel a été cloné le gène GUS sous le contrôle du promoteur 35S (Odell *et al.*, 1985), et à blesser une plante de *C. glauca* au niveau de l'hypocotyle. Au bout d'une semaine, les plantes blessées développent une tumeur à partir de laquelle émergent des racines. L'élimination de la racine principale et le développement des racines induites par *A. rhizogenes* permet d'obtenir une plante chimère avec une partie aérienne non transformée et une partie racinaire transformée (Pl. I, A).

Afin de déterminer la présence du gène GUS et son niveau d'expression dans les racines, trois approches ont été utilisées. Tout d'abord, grâce à l'amplification en chaîne par polymérase nous avons démontré que ces racines ont intégré dans leur génome les fragments gauche (T_L) et droite (T_R) du plasmide Ri de A4RS de même que le gène GUS. Ensuite, l'analyse histo-chimique de l'activité de la β -glucuronidase nous a permis de localiser l'expression du gène GUS. Enfin, les résultats de l'analyse de l'activité enzymatique par fluorimétrie ont permis une évaluation du niveau d'expression du gène GUS (Diouf *et al.*, 1995). L'analyse de l'expression génique effectuée dans les racines montre que le gène GUS ne s'exprime pas dans la coiffe. Dans la zone méristématique une forte expression du gène GUS a été identifiée. Dans les autres tissus de la racine, cette expres-

Planche I.- Transformation génétique de *Casuarina glauca* et d'*Allocasuarina verticillata*. A : Jeune plante de *C. glauca* inoculée par *Agrobacterium rhizogenes* A4RS. Le site d'inoculation est indiqué par la flèche blanche pleine ; l'autre flèche montre le système racinaire transgénique. B : Nodules induits par *Frankia* sur des racines de *C. glauca* transformées par *A. rhizogenes*. C : Régénération de rameaux transgéniques d'*A. verticillata* sur des cals transformés par *Agrobacterium tumefaciens*.

Plate I.- Genetic transformation of *Casuarina glauca* and *Allocasuarina verticillata*. A : *C. glauca* plantlet inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* A4RS. The inoculated site is indicated by the plain white arrow; the second arrow shows the transgenic root system. B : Nodules induced by *Frankia* on *C. glauca* roots transformed by *A. rhizogenes*. C : Regeneration of transgenic *A. verticillata* shoots from calli transformed by *Agrobacterium tumefaciens*.

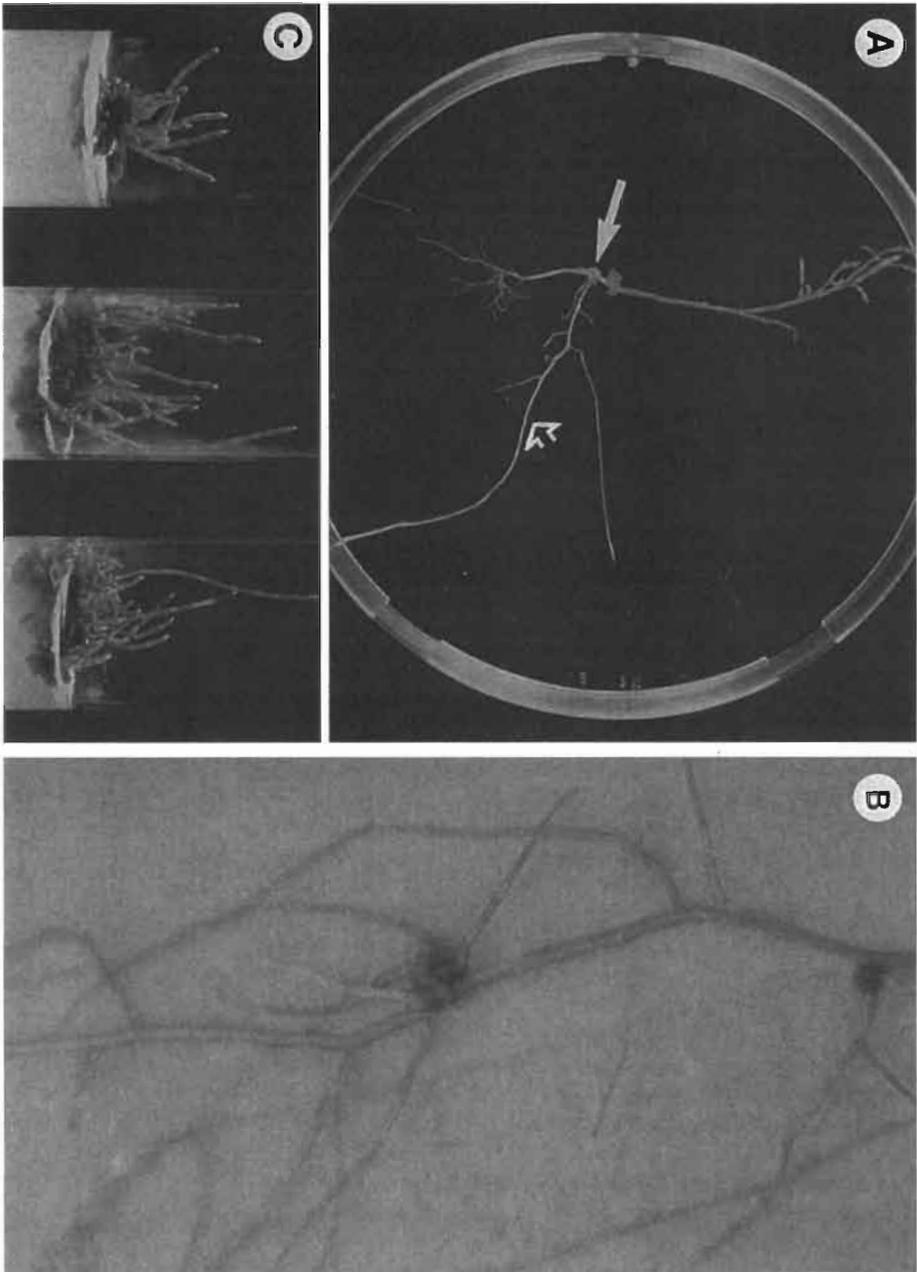


Planche I

sion présente une variabilité assez nette : elle peut être uniquement localisée dans le cylindre central ou s'étendre dans tous les autres tissus. Les résultats obtenus chez *C. glauca* sont comparables à ceux déjà décrits chez le lotier (Forde *et al.*, 1989).

Afin d'analyser l'expression du gène GUS dans les nodules, nous avons procédé à une nodulation des racines transformées. La souche de *Frankia* utilisée est la souche Thr (Girgis *et al.*, 1990). Elle a été cultivée selon la méthode décrite par Schwencke (1991). Un mois après l'inoculation par *Frankia*, 40 % des plantes présentent des nodules multilobés (Pl. I, B). L'analyse histochemique réalisée dans les nodules révèle que l'expression du gène GUS est localisée dans le cylindre central, le cortex, à l'exception des cellules infectées par *Frankia*, et, dans le périoderme. Il est intéressant de noter que chez le lotier, une Légumineuse transformée avec le gène GUS sous le contrôle du promoteur 35S, il a été observé une expression du gène GUS dans tous les tissus du nodule (Forde *et al.*, 1989). Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer la variabilité d'expression du gène GUS dans les racines et dans les nodules de *C. glauca*. Parmi celles-ci nous pouvons citer d'abord l'état physiologique de la racine car le promoteur 35S s'exprime plus fortement dans les tissus en croissance, ensuite, l'intégration du gène GUS dans une zone plus ou moins accessible à l'ARN polymérase et, enfin, la méthylation possible du gène GUS introduit qui pourrait entraîner son inactivation plus ou moins importante.

Si le système *A. rhizogenes* présente un avantage considérable dans la rapidité d'obtention de nodules transformés (au bout de 4 mois), il présente cependant un inconvénient, car l'expression des constructions géniques ne peut pas être étudiée dans les différents organes de la plante. La mise au point d'un deuxième système permettant d'obtenir une plante entièrement transformée s'est avérée nécessaire.

B. Le système *A. tumefaciens*

Afin de remédier à l'inconvénient du système de transformation via *A. rhizogenes*, nous avons développé une stratégie avec *A. tumefaciens* permettant d'obtenir des plantes transgéniques entièrement transformées.

Des embryons zygotiques matures d'*Allocasuarina verticillata* sont cocultivés avec une culture fraîche d'*A. tumefaciens* désarmée C58C1 (GV2260) porteuse du gène GUS sous le contrôle du promoteur 35S (Odell *et al.*, 1985). Des cals résistants à la kanamycine et exprimant l'activité β -glucuronidase apparaissent sur 20 % des embryons zygotiques matures d'*A. verticillata* ; la différenciation de bourgeons, puis de rameaux est observée sur 70 % de ces cals. La présence du gène *uidA* dans les cals transgéniques a été mise en évidence par une analyse PCR et par Southern blot. De ces cals bourgeonnants ont été détachés des rameaux d'environ 2 cm de long qui ont été ensuite enracinés avec un excellent taux d'enracinement (96 %) (Pl. I, C). Les plantes transformées sont semblables phénotypiquement aux plantes sauvages.

L'analyse de l'activité β -glucuronidase dans les plantes transgéniques montre que le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (Odell *et al.*, 1985) peut être utilisé pour exprimer des gènes d'intérêt chez cet arbre fixateur d'azote. Les résultats préliminaires obtenus par analyse histochemique semblent indiquer que le promoteur n'est pas exprimé de façon totalement constitutive. On note en particulier une forte expression dans la racine à l'exception des racines latérales où elle est localisée dans la coiffe, la zone méristématique et dans le tissu vasculaire. Dans la tige, l'expression du gène GUS a été détectée dans tous les tissus tandis qu'elle est absente à l'extrémité des feuilles (résultats non illustrés). La réalisation d'une analyse histologique fine sur différentes plantes transgéniques d'*A. verticillata* sera particulièrement intéressante car actuellement on

dispose de très peu de données bibliographiques sur la spécificité d'expression du promoteur 35S chez les arbres. Environ 65 % des plantes présentent des nodules après inoculation avec la souche Allo2 de *Frankia* (Girgis et Schwencke, 1993). Notons que l'expression du gène GUS dans les nodules transformés d'*A. verticillata* est localisée dans tous les tissus à l'exception du périoderme. Ce résultat pourrait s'expliquer par une forte subérisation des cellules du périoderme. Ces résultats semblent donc être très similaires avec ceux décrits chez le lotier (Forde *et al.*, 1989).

Ce système présente un avantage non négligeable, il permet en effet de suivre l'expression du gène introduit dans tous les organes de la plante. De ce fait, il peut être utilisé également dans un but appliqué pour l'introduction de gènes d'intérêt agronomique.

IV. CONCLUSION

Notre approche pluridisciplinaire de l'étude du rôle de la plante-hôte dans les symbioses *Casuarinaceae-Frankia* nous a permis d'identifier des gènes potentiellement importants pour le fonctionnement de ces symbioses et de mettre au point des outils d'analyse moléculaire.

Le séquençage des ADNc clonés après criblage différentiel, a permis d'identifier un certain nombre de clones correspondant à des gènes qui codent pour des protéines dont le rôle dans la symbiose fixatrice d'azote est primordial (cas de l'hémoglobine symbiotique), ou des protéines qui sont susceptibles d'intervenir dans le processus de nodulation (cas de la chalcone synthase). D'autres clones sont actuellement en cours de séquençage.

En fonction de l'importance des clones identifiés, et de leur rôle possible dans la symbiose, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement aux clones d'hémoglobine (Cg-1F), chalcone synthase (a51) et métallothionéine (Cg-TRI) afin

de les étudier plus en détail. Des expériences d'hybridation de ces trois clones avec l'ADN génomique (Southern blot) de *C. glauca* indiquent que les transcrits correspondants sont issus de familles multigéniques. La spécificité et le niveau d'expression des gènes correspondant à ces trois ADNc est en cours de réalisation grâce à des expériences d'hybridation ADN/ARN (Northern) et d'hybridation *in situ*. Les premiers résultats indiquent que l'hémoglobine n'est exprimée que dans les nodules et plus spécifiquement dans les cellules infectées matures (Gherbi *et al.*, sous presse).

En outre, l'étude des clones dont la séquence ne présente aucune homologie avec des séquences connues va être poursuivie. Pour cela, la séquence complète de ces clones va être déterminée. A partir de cette séquence, les phases ouvertes de lectures possibles seront localisées par traitement informatique. Les séquences des protéines ainsi obtenues seront étudiées pour localiser des domaines connus et en déduire les éventuelles fonctions.

Grâce à la transformation génétique, nous disposons d'un outil indispensable pour étudier la régulation de l'expression des gènes symbiotiques homologues ou hétérologues chez les plantes actinorhiziennes comme les gènes symbiotiques qui interviennent dans le processus d'infection ou dans le fonctionnement des nodules des légumineuses. Cette approche s'avère indispensable pour mieux comprendre les symbioses actinorhiziennes. De même, la transgénie nous permettra d'utiliser des constructions antisens avec les clones isolés et de les introduire dans les *Casuarinaceae* afin d'observer les effets physiologiques de la sous-expression de ces gènes sur l'établissement et le fonctionnement de la symbiose. En plus de cette approche fondamentale, il est envisageable d'utiliser la transformation génétique pour introduire des gènes d'intérêt agronomique comme des gènes de résistance aux insectes.

BIBLIOGRAPHIE

- Appleby C. A., D. Bogusz, E. Dennis & W. J. Peacock, 1988.- A role of haemoglobin in all plant roots. *Plant Cell Environ.*, **11**, 359-367.
- Appleby C.A., 1984.- Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Rev. Plant Physiol.*, **35**, 443-478.
- Berry A.M., 1994.- Recent development in the actinorhizal symbiosis. *Plant Soil*, **161**, 135-145.
- Cahoon E.B. & J.B. Ohlrogge, 1994.- Metabolic evidence for involvement of Δ^1 -Palmitoyl-acyl carrier protein desaturase in petroselinic acid synthesis in coriander endosperm and transgenic tobacco cells. *Plant Physiol.*, **104**, 827-837.
- De Billy F., D.G. Barker, P. Gallusci & G. Truchet, 1991.- Leghemoglobin gene transcription is triggered in a single cell layer in the indeterminate nitrogen-fixing root nodule of alfalfa. *Plant J.*, **1**, 27-35.
- De Miranda J.R., M.A. Thomas, D.A. Thurman & A.B. Tommsetti, 1990.- Metallothionein genes from the flowering plant *Mimulus guttatus*. *Febs Lett.*, **260**, 277-280.
- Diouf D., H. Gherbi, C. Franche, E. Duhoux & D. Bogusz, 1995.- Hairy root nodulation of *Casuarina glauca*: a system for the study of symbiotic gene expression in an actinorhizal tree. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **8**, 532-537.
- Estabrook E.M. & C. Sengupta-Goaplan, 1991.- Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during soybean nodule development. *Plant Cell*, **3**, 299-308.
- Evans K.M., J.A. Gatehouse, W.P. Lindsay, J. Shi, A.M. Tommey & N.J. Robinson, 1992.- Expression of a pea metallothionein-like gene P_sMT_A in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: Implications for P_sMT_A function. *Plant Mol. Biol.*, **20**, 1019-1028.
- Firmin J.L., K.E. Wilson, L. Rossen & A.W.B. Johnston, 1986.- Flavonoid activation of nodulation gene in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plant. *Nature*, **324**, 90-92.
- Fleming A. I., J.B. Wittenberg, B.A. Wittenberg, W.F. Dudman & C.A. Appleby, 1987.- The purification, characterization and ligand-binding kinetics of hemoglobins from root nodules of the non-leguminous *Casuarina glauca*-*Frankia* symbiosis. *Biochim. Biophys. Acta*, **911**, 209-220.
- Forde B.G., H.M. Day, J.F. Turton, S. Wenjun, J.V. Cullimore & J.E. Oliver, 1989.- Two glutamine synthetase genes from *Phaseolus vulgaris* L. display contrasting developmental and spatial pattern of expression in transgenic *Lotus corniculatus* plants. *Plant Cell*, **1**, 391-401.
- Franssen H.J., I. Vijn, W.C. Yang & T. Bisseling, 1992.- Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol.*, **19**, 89-107.
- Gherbi, H., E. Duhoux, C. Franche, K. Pawlowski, A Berry & D. Bogusz.- Cloning of a full-length symbiotic hemoglobin cDNA and *in situ* localization of the corresponding mRNA in *Casuarina glauca* root nodule. *Physiol. Plant.* (sous presse).
- Girgis M.G.Z & J. Schwencke, 1993.- Differentiation of *Frankia* by their electrophoretic patterns of intracellular estrases and aminopeptidases. *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 2225-2232.
- Girgis M.G.Z., Y.Z. Ishac, M. El-Haddad, E.A. Saleh, H.G. Diem & Y.R. Dommergues, 1990.- First report on isolation and culture of effective *Casuarina*-compatible strains of *Frankia* form Egypt. In: *Advances in Casuarina* research and utilization. El-Lakany M.H. *et al.* (Eds), Desert Development Center, Cairo, Egypt. 156-164.
- Goetting-Minesky M.P. & B.C. Mullin, 1994.- Differential expression in an actinorhizal symbiosis: Evidence for a nodule-specific cysteine proteinase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **91**, 9891-9895.
- Hansen J., J.E. Jorgensen, J. Stougaard & K.A. Marcker, 1989.- Hairy roots - a short cut to transgenic root nodules. *Plant Cell Rep.*, **8**, 12-15
- Hansen L. & S. Kauppinen, 1991.- Barley acyl carrier protein II: nucleotide sequence of cDNA clones and chromosomal location of the *Ac12* gene. *Plant Physiol.*, **97**, 472-474.
- Hirsch A.M., T.V. Bhuvaneshwaru, J.G. Torrey & T. Bisseling, 1989.- Early nodulin genes and induced in alfalfa root growth elicited by auxin transport inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.*, **86**, 1244-1248.
- Jacobsen-Lyon K., E.O. Jensen, J. Jorgensen, K.A. Marcker, W.J. Peacock, & E.S. Dennis, 1995.- Symbiotic and nonsymbiotic hemoglobin genes of *Casuarina glauca*. *Plant Cell*, **7**, 213-223.
- Jouanin L., J. Tourneur, C. Tourneur & F. Casse-Delbart, 1986.- Restriction maps and homologies of the three plasmids of *Agrobacterium rhizogenes* strains A4. *Plasmid*, **16**, 124-134.
- Kägi J.H.R. & A. Schäffer, 1988.- Biochemistry of metallothioneins. *Biochemistry*, **27**, 8509-8515.
- Kawashima I., Y. Inokuchu, M. Chino, M. Kimura & N. Shimizu, 1991.- Isolation of a gene for a metallothionein-like protein from soybean. *Plant Cell Physiol.*, **32**, 913-916.
- Kopczak S.D., N.A. Haas, P.J. Hussey, C.D., Siflow & D.P. Snustad, 1992.- The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed α -tubulin genes. *Plant Cell*, **4**, 539-547.
- Kort A.A., A.S. Inglis, A.I. Flemming & C.A. Appleby, 1988.- Amino acid sequence of hemoglobin I from root nodules of the non-leguminous *Casuarina glauca*-*Frankia* symbiosis. *Febs Lett.*, **231**, 341-346.
- Kremp A., M. Schliephacke, U Kull & H.P. Schmid, 1986.- Prosomes exist in plant cells too. *Exp. Cell. Res.*, **166**, 553-557.
- Legocki R.P. & D.P.S. Verma, 1980.- Identification of « nodule-specific » host protein (nodulins) involved the development of *Rhizobium*-legume symbiosis. *Cell*, **20**, 153-163.
- Martin C.R., 1993.- Structure, function, and regulation of the chalcone synthase. *Int. Rev. Cytol.*, **147**, 233-284.

- McKahn H.I. & A.M. Hirsch, 1994.- Isolation of chalcone synthase and chalcone isomerase cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.) : Highest transcript level occur in young roots and root tips. *Plant Mol. Biol.*, **24**, 767-777.
- Odell T.J., F. Nagy & H.N. Chua, 1985.- Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, **313**, 810-812.
- Ohkubo S., C. Kimura, K. Ogi, K. Okazaki, M. Hosoya, H. Onda, A. Miyata, A. Arimura & M. Fujino, 1992.- Primary structure and characterization of the precursor to human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *DNA Cell Biol.*, **11**, 21-30
- Okumura N., N.K. Nishizawa, Y. Umehara & S. Mori, 1991. - An iron deficiency-specific cDNA from barley roots having two homologous cysteine-rich MT domains. *Plant Mol. Biol.*, **17**, 531-533.
- Orlowski M., 1990.- The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry*, **29**, 10289-10297.
- Peters N.K., J.W. Frost & S.R. Lonf, 1986. - A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science*, **233**, 977-980.
- Petit A., J. Stougaard, A. Kühle, K.A. Marcker & J. Tempé, 1987.- Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus* : A system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.*, **207**, 245-250
- Recourt K., A.A.N. Van Brussel, A.J.M. Driessen & B.J.J. Lugtenberg, 1989.- Accumulation of a *nod* gene inducer, the flavonoid naringenin, in the cytoplasmic membrane of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* is caused by the pH-dependent hydrophobicity of naringenin. *J. Bacteriol.*, **171**, 4370-4377.
- Ribeiro A., A.D.L. Akkermans, A. Van Kammen, T. Bisseling & K. Pawlowski, 1995.- A nodule-specific gene encoding a subtilisin-like protease is expressed in early stage of actinorhizal nodule development. *Plant Cell*, **7**, 785-794.
- Robertson J.G., B. Wells, T. Bisseling, K.J.F. Farnden & A.W.B. Johnson, 1984.- Immuno-gold localization of leghaemoglobin in cytoplasm in nitrogen-fixing root nodules of pea. *Nature*, **311**, 254-256
- Robinson N.J., A.M. Tommey, C. Kuske & P.J. Jackson, 1993.- Plant metallothioneins. *Biochem. J.*, **295**, 1-10
- Scheres B., C. Van de Wiel, A. Zalenski, B. Horvath, H. Spaink, H. Van Eck, F. Zwartkruls, A.M. Wolters, T. Gloudemans, A Van Kammen & T. Bisseling, 1990a.- The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the Pea-*Rhizobium* interaction. *Cell*, **60**, 281-294.
- Scheres B., F. Van Engelen, E. Van Der Knaap, C. Van De Wiel, A. Van Kammen & T. Bisseling, 1990b.- Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell*, **2**, 687-700.
- Schliephacke M., A. Kremp, H.P. Schmid, K. Köhler & U. Kull, 1991.- Prosomes (proteasomes) of higher plants. *Eur. J. Cell Biol.*, **55**, 114-121.
- Schwencke J., 1991.- Rapid exponential growth and increased biomass yield for some *Frankia* strains in buffered and stirred mineral medium (BAP) with phosphatidyl choline. *Plant & Soil*, **137**, 37-41.
- Sorimachi H., T. Tsukahara, H. Kawasaki, S. Ishiura, Y. Emori, H. Sugita & K. Suzuki, 1990.- Molecular cloning of cDNAd for two subunits of rat multicatalytic proteinase. *Eur. J. Biochem.*, **193**, 775-781.
- Stougaard J., N.N. Sandal, A. Gron, A. Kühle & K.A. Marcker, 1987.- Regulatory elements required for promoter activity and organ specificity. *EMBO J.*, **6**, 3565-3569.
- Tremblay F.M., P. Périnet & M. Lalonde, 1986.- Tissue culture of *Alnus* spp. with regard to symbioses. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Y.P.S. Bajaj (Ed.), Springer-Verlag, Berlin. 87-100.
- Van Kammen A., 1984.- Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **2**, 43-45.
- Vancanney T G., R. Schmidt, A. O'Connor-Sanchez, L. Willmitzer & M. Rocha-Sosa, 1990.- Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.*, **220**, 245-250.
- Voets M., B. Klein, J. Schell & R. Töpfer, 1994.- Three different cDNAs encoding acyl carrier proteins from *Cuphea lanceolata*. *Plant Physiol.*, **106**, 785-786.
- Yang W.C., H.C.J. Canter-Cramers, P. Hogendijk, P. Katinakis, C.A., Wijffelmàn, H. Franssen, A. Van Kammen & T. Bisseling, 1992.- *In situ* localization of chalcone synthase mRNA in pea root nodule development. *Plant J.*, **2**, 143-151.
- Yates M.G., 1992.- The enzymology of molybdenum-dependent nitrogen fixation. In: *Biological nitrogen fixation*. Stacey G. et al. (Eds), Chapman & Hall, New York, 685-735.

The evolution of the actinorhizal symbiosis through phylogenetic analysis of host plants

by Alice Roy and Jean Bousquet

Centre de recherche en Biologie forestière, Faculté de Foresterie et de Géomatique, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Canada, G1K 7P4

Summary.- Phylogenetic analysis of actinorhizal plant families is now possible due to the availability of numerous angiosperm sequences of the plastid gene *rbcl*. A sampling of a 100 *rbcl* sequences, including representatives of all eight actinorhizal families, was conducted to estimate their phylogenetic relationships. The phylogeny was estimated by neighbor-joining analysis of a matrix of pairwise substitution rates. Bootstrap and double-bootstrap values were estimated. In order to assess the divergent hypotheses of unique or recurrent evolution of actinorhizal symbiosis, character state changes were traced along the branches of the phylogenetic consensus trees obtained, and the number of character changes for each of the two scenarios was calculated. The most parsimonious scenario favored the recurrent evolution of actinorhizal symbiosis. This scenario is supported by the morphophysiological diversity of actinorhizal symbioses and by the relaxed coevolutionary relationships between the host plants and the microsymbiont.

Résumé.- L'étude de la phylogénie de l'ensemble des familles de plantes actinorhiziennes est rendue possible grâce aux nombreuses données de séquences du gène chloroplastique *rbcl* disponibles pour l'ensemble des plantes angiospermes. Un échantillonnage de séquences du gène *rbcl* de 100 angiospermes incluant les huit familles actinorhiziennes a été réalisé afin d'estimer la proximité phylogénétique de ces dernières. La phylogénie de ces 100 taxons a été estimée par analyse « neighbor-joining » à partir d'une matrice de taux de substitution. Des valeurs de rééchantillonnage et de double-rééchantillonnage ont été calculées. Afin d'évaluer les hypothèses divergentes d'évolution unique ou multiple de la symbiose actinorhizienne, l'évolution de ce caractère a été reconstruit le long des branches des arbres consensus obtenus, et le nombre de changements requis pour chacun des deux scénarios a été calculé. Il est apparu que le scénario évolutif le plus parcimonieux favorisait l'évolution récurrente de la symbiose actinorhizienne. Ce scénario est supporté par la diversité morphophysiological des symbioses actinorhiziennes et par la relation coévolutive peu stringente entre les plantes-hôtes et le microsymbionte.

Key words : *Frankia* - actinorhizal symbiosis - coevolution - molecular phylogeny - host plants - *rbcl*.

INTRODUCTION

Nitrogen-fixation symbiosis in root nodules has been recognized in a large number of dicotyledonous angiosperms. It involves two main microsymbionts : *Frankia*, a Gram-positive filamentous bacteria, belonging to the Actinomycetales, nodulates the roots of more than 200 species of perennial plants grouped into 8 actinorhizal families and more than 20 genera (Baker and Schwintzer, 1990), and *Rhizobium*, which nodulates the roots of two other families including many genera of the *Fabaceae* and one genus of the *Ulmaceae* (*Parasponia*).

These two symbiotic associations have been compared and several important anatomical and physiological differences have been described (Dixon and Wheeler, 1986 ; Mylona *et al.*, 1995). When examining the *Frankia* symbiosis, differences among actinorhizal genera and families are observed. The infection process, the nodule structure, and the presence and forms of *Frankia* vesicles within nodules vary and seem largely determined by the host plant (Lalonde, 1979 ; Lalonde *et al.*, 1988 ; Benson and Silvester, 1993). Whereas infection proceeds *via* root hair deformation and penetration in the actinorhizal plants belonging to « higher » *Hamamelidae* (*Alnus*, *Myrica*, *Comptonia*, *Casuarina*, *Gymnostoma*), it is *via* intercellular penetration of the epidermis and cortex for other actinorhizal plants, whether or not root hairs are present. Depending on their host, vesicles may be septate or not, rounded or elliptical or absent such as in *Casuarina*. The form in which nitrogen is exported to the plant differs as well among actinorhizal plants. In indeterminate nodules, it is generally amides that are exported, although the nodules of *Alnus* sp. and *Casuarina* are citrulline exporters (Mylona *et al.*, 1995). Actinorhizal plants also display a variable degree of sensitivity to infection by *Frankia* strains. Phylogenetic and host infectivity analysis have shown that in « higher » *Hamameli-*

dae, ancient plants such as the *Myricaceae* and *Betulaceae* (*Alnus*) are highly promiscuous while more recent plants such as *Casuarina* and *Allocasuarina* are less promiscuous (Maggia and Bousquet, 1994).

It has been recently suggested from phylogenetic analysis of nucleotide sequences of the chloroplast gene *rbcL* (large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase) that the ten families of dicots containing nodulating taxa including all actinorhizal families analysed might be phylogenetically close enough to suggest that a predisposition for nodular nitrogen fixation was ancestral to a large clade comprising these 10 families and 26 other non nitrogen-fixing families (Soltis *et al.*, 1995). Maggia and Bousquet (1994) have suggested possible shared ancestry of the actinorhizal state within the closely related actinorhizal families of the « higher » *Hamamelidae*. Nonetheless, the actinorhizal symbiosis involves members of the families *Betulaceae*, *Casuarinaceae*, *Myricaceae*, *Elaeagnaceae*, *Rosaceae*, *Rhamnaceae*, *Datisceae*, and *Coriariaceae*, encompassing four of the six different subclasses of dicots, as defined by Cronquist (1988). The wide taxonomic diversity of the different families involved in the actinorhizal symbiosis could be indicative of independent, multiple evolution of this symbiosis, at least among distantly related families (Bond, 1983). The hypothesis of recurrent evolution is supported in part by Doyle (1994) who presented phylogenetic evidence for independent evolution of the legume symbiosis within the *Fabaceae*.

This study aimed at evaluating whether the actinorhizal state is ancestral to the different groups of actinorhizal plants or if this symbiosis has resulted from multiple, distinct evolutionary events. We estimated consensus phylogenetic trees derived from phylogenetic analysis of *rbcL* sequences representative of the different actinorhizal families and have reconstructed the character evolution of actinorhizal nitrogen fixa-

tion by tracing character state changes along the branches of these trees. We discuss here the most parsimonious reconstruction of character evolution which favors the recurrent evolution of actinorhizal nitrogen fixation among dicotyledonous plants.

MATERIALS AND METHODS

Taxa sampling

rbcL gene sequences from 98 dicotyledonous plants belonging to the four subclasses *Dilleniidae*, *Hamamelidae*, *Magnoliidae*, and *Rosidae* were analysed (Appendix 1). *Lilium superbum* et *Zea mays*, two monocotyledonous plants, were used as the outgroup, for a total of 100 taxa being analysed. This was the maximum number of taxa that could be handled given the power of the softwares available and the complexity of phylogenetic analyses. The sequence sampling strategy (Fig. 1) was dependent on the availability of *rbcL* gene sequences from the GenBank database. It was also designed to center around actinorhizal genera and for that reason, was more intense in their respective families or orders,

and much less exhaustive as taxonomic relatedness decreased. Thus, within each subclass, all orders comprising an actinorhizal genus were identified for further sampling. In non actinorhizal orders belonging to a given subclass, one species per order was sampled. Within actinorhizal orders, all actinorhizal families were identified for further sampling, while only one species per family was sampled from the non actinorhizal families. Finally, in each actinorhizal family, actinorhizal and non actinorhizal genera were identified and sampled at a rate of one species per genus. In every case, the species with the most complete sequence was chosen. The only exceptions to this sampling scheme were in the *Casuarinaceae*, where the genus *Allocasuarina* was not sampled because of its close relatedness to the genus *Casuarina* (Maggia and Bousquet, 1994), and in the *Betulaceae* where only two of the four non actinorhizal genera were sampled, they being representative of the two subfamilies *Betuleae* and *Coryleae* (Bousquet *et al.*, 1992a). Sampling was also less exhaustive in the *Rosidae* subclass, specifically in the *Rosaceae* family where an important number of genera can be found. Following the classification of Schulze-Menz (1964) (cited in Morgan *et al.*, 1994), this family is subdivided into the four subfamilies *Spiraeoideae*, *Rosoideae* - which comprises

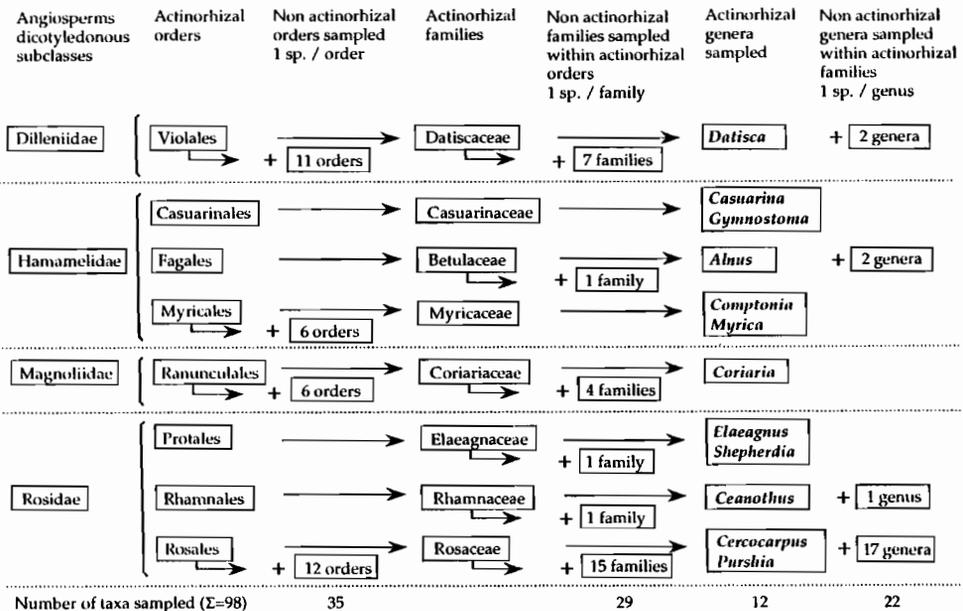


Fig. 1. - Sampling strategy of *rbcL* gene sequences for estimating the phylogeny of actinorhizal plants. Sampling was more intense in the actinorhizal families or orders but less intensive as taxonomic relatedness decreased. To this total sampling of 98 dicotyledonous taxa were added two monocots, *Lilium* and *Zea* used as outgroup.

Fig. 1. - Stratégie d'échantillonnage des séquences du gène *rbcL* pour l'étude de la phylogénie des plantes actinorhiziennes. L'échantillonnage a porté principalement sur les familles ou les ordres actinorhiziens et était moins exhaustif dans les familles ou les ordres non actinorhiziens apparentés. A cet échantillonnage total de 98 taxons dicotylédones, se sont ajoutés deux taxons monocotylédones *Lilium* et *Zea* utilisés comme groupe externe.

all actinorhizal genera - *Maloideae*, and *Amygdaloideae*. The first three subfamilies are divided into different tribes. Due to the large number of genera in the *Rosaceae* family, of which few are actinorhizal, only a single member was sampled for the non actinorhizal tribes *Quillajeae*, *Sorbarieae*, *Neillieae*, *Spiraceae* (subfamily *Spiraeoideae*); *Ulmariae*, *Kerrieae*, *Rubeae*, *Roseae*, *Sanguisorbeae*, *Adenostomatae*, and *Potentilleae* (subfamily *Rosoideae*); and *Maleae*, and *Cratageae* (subfamily *Maloideae*). Within the subfamily *Amygdaloideae*, only the genus *Prunus* was sampled. Members of the tribes *Exochordeae* and *Holodisceae* (subfamily *Spiraeoideae*) were omitted due to the limitation in the number of taxa that could be simultaneously analysed. In the *Rosoideae* tribe *Dryadeae*, which comprises the two actinorhizal genera of the *Rosaceae* (*Cercocarpus* and *Purshia*) herein analysed, all related genera with available *rbcl* sequences were sampled.

Phylogenetic analysis of *rbcl* sequences

Phylogenetic analyses were conducted using MEGA 1.0 (Kumar *et al.*, 1993). Numbers of pairwise substitutions were estimated using the two-parameter method of Kimura (1980). The matrix of pairwise substitution rates was then submitted to the neighbor-joining method of phylogenetic tree reconstruction (Saitou and Nei, 1987), which performs relatively well and sometimes better than parsimony under heterogeneity of substitution rates such as observed for *rbcl* (Bousquet *et al.*, 1992b; Savard *et al.*, 1994). Bootstrap confidence values were calculated from 500 replicates. To correct for the conservative bias of the standard bootstrap procedure, when applied to large numbers of taxa, a double-bootstrapping method was used (Zharkikh and Li, 1995). This technique estimates the effective number of competing alternative topologies and gives confidence levels of monophyly to clades or inferred tree topology. With this method, corrected bootstrap values that can be interpreted in terms of confidence, were calculated from 5000 replicates as recommended (Zharkikh and Li, 1995). The significance level for these bootstrap values was set at $1 - \alpha = 95\%$. Parsimony or maximum likelihood analyses could not be conducted efficiently with current phylogenetic softwares available, due to the large number of taxa being analysed, and if bootstrap confidence limits or other methods of assessing confidence on tree topology were to be used.

Evolutionary study of actinorhizal symbiosis

To evaluate if the actinorhizal symbiosis is ancestral or has been derived several times among actinorhizal plants along their evolution, we reconstructed character evolution of the actinorhizal condition along the branches of the consensus trees obtained from neighbor-joining analysis, from the origin of the clade comprising all actinorhizal plants to the external branches of the tree. To do so, the tree topologies were submitted to MacClade 3.01 (Maddison and Maddison, 1992) assuming two different scenarios: 1) that the ancestor of the clade was not actinorhizal; 2) that the ancestor of the clade was

actinorhizal. Total number of changes were calculated for each scenario. We also tested two hypotheses for each scenario, that the number of changes was multiple or unique at polytomies, therefore obtaining possible ranges of changes for each scenario if the topology was more or less resolved.

RESULTS

Estimated phylogenies

Phylogenetic analysis of 13 actinorhizal genera representative of the eight actinorhizal families revealed three major groups supported by high non-corrected bootstrap values (Fig. 2). Taxa representative of the « higher » *Hamamelidae* [*Myricaceae* (*Comptonia*, *Myrica*), *Betulaceae* (*Alnus*), and *Casuarinaceae* (*Casuarina*, *Allocasuarina*, *Gymnostoma*)] ; taxa of the *Magnoliidae* [*Coriariaceae* (*Coriaria*)] and *Dilleeniidae* [*Datisceae* (*Datisca*)] subclasses ; and taxa of the *Rosidae* subclass [(*Elaeagnaceae* (*Elaeagnus* and *Shepherdia*), *Rhamnaceae* (*Ceanothus*), and *Rosaceae* (*Cercocarpus*, *Purshia*)] constituted these three major groups. Because of limited taxa sampling, parsimony analysis could be conducted (Fig. 2A) and the results are generally congruent with those obtained from the neighbor-joining analysis (Fig. 2B). However, the actinorhizal clade emerged from the root (R) of the neighbor-joining tree as a poorly resolved trichotomy, and the grouping of the *Coriaria-Datisca* clade with the *Rosidae* clade, as shown by parsimony analysis, was not supported by a high level of confidence considering the relatively low bootstrap value (58 %), and the small number of taxa analysed. Due to the close relatedness of *Allocasuarina* to *Casuarina* and to the limitation in the number of taxa, *Allocasuarina* was not included in subsequent analyses.

When other non actinorhizal taxa more or less taxonomically related to the actinorhizal ones are added to the analysis and that a minimum rule of 50 % bootstrap is used to define the consensus tree, the actinorhizal taxa were dispersed into four

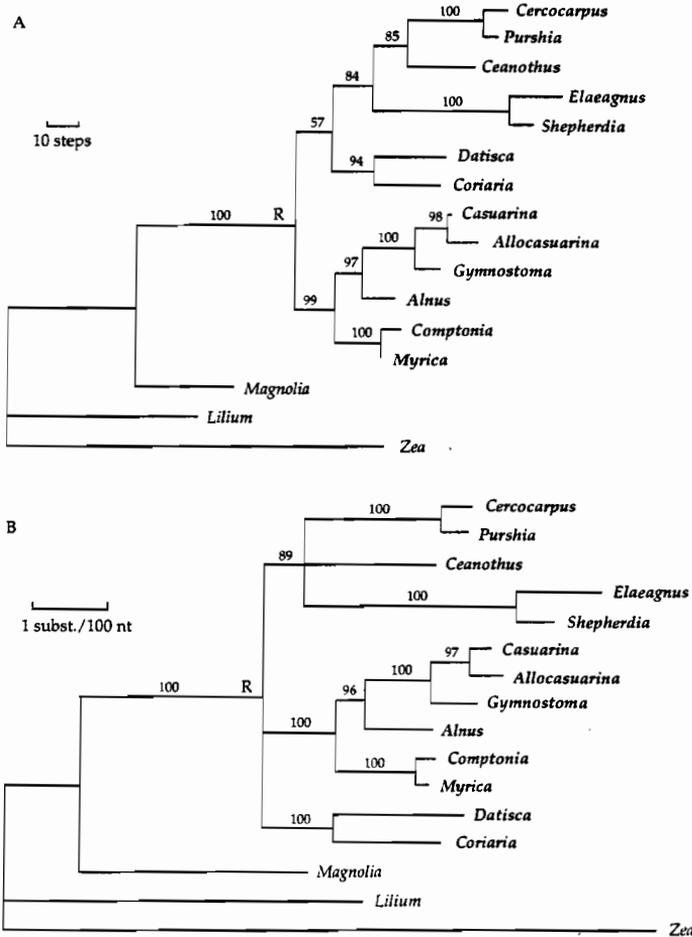


Fig. 2.- Phylogeny of 13 actinorhizal genera based on the analysis of *rbcl* sequences. Actinorhizal genera are shown in bold types, outgroups in standard types. « R » is the root of the actinorhizal clade. A : tree resulting from parsimony analysis using PAUP 3.1.1 (Swofford, 1993). B : neighbor-joining analysis of two-parameter substitution rates using MEGA 1.0 (Kumar *et al.*, 1993). For both methods (A and B), bootstrap values were calculated from 500 replicates and branches showing bootstrap values less than 50 % were collapsed.

Fig. 2.- Phylogénie de 13 genres actinorhiziens basée sur l'analyse des séquences *rbcl*. Les genres actinorhiziens sont indiqués en caractères gras, les taxons externes, en caractères réguliers. « R » est la racine du regroupement actinorhizien. A : arbre découlant de l'analyse de parcimonie effectuée à l'aide du logiciel PAUP 3.1.1 (Swofford, 1993). B : arbre découlant de l'analyse « neighbor-joining » de la matrice de taux de substitutions à deux paramètres, à l'aide du logiciel MEGA 1.0 (Kumar *et al.*, 1993). Pour les deux méthodes d'analyse (A and B), les valeurs de rééchantillonnage ont été calculées à partir de 500 répétitions et les noeuds pour lesquels ces valeurs étaient inférieures à 50 % ont été fusionnés.

groups found interspersed among several other dicotyledonous families (Fig. 3). The actinorhizal *Rosidae* group was subdivided into two subgroups (*Rosaceae* versus *Elaeagnaceae* and *Rhamnaceae*), while the

actinorhizal *Hamamelidae* and the actinorhizal *Dilleniidae* and *Magnoliidae* constituted the third and fourth group, respectively. This clustering pattern was similar to the phylogenetic arrangement observed

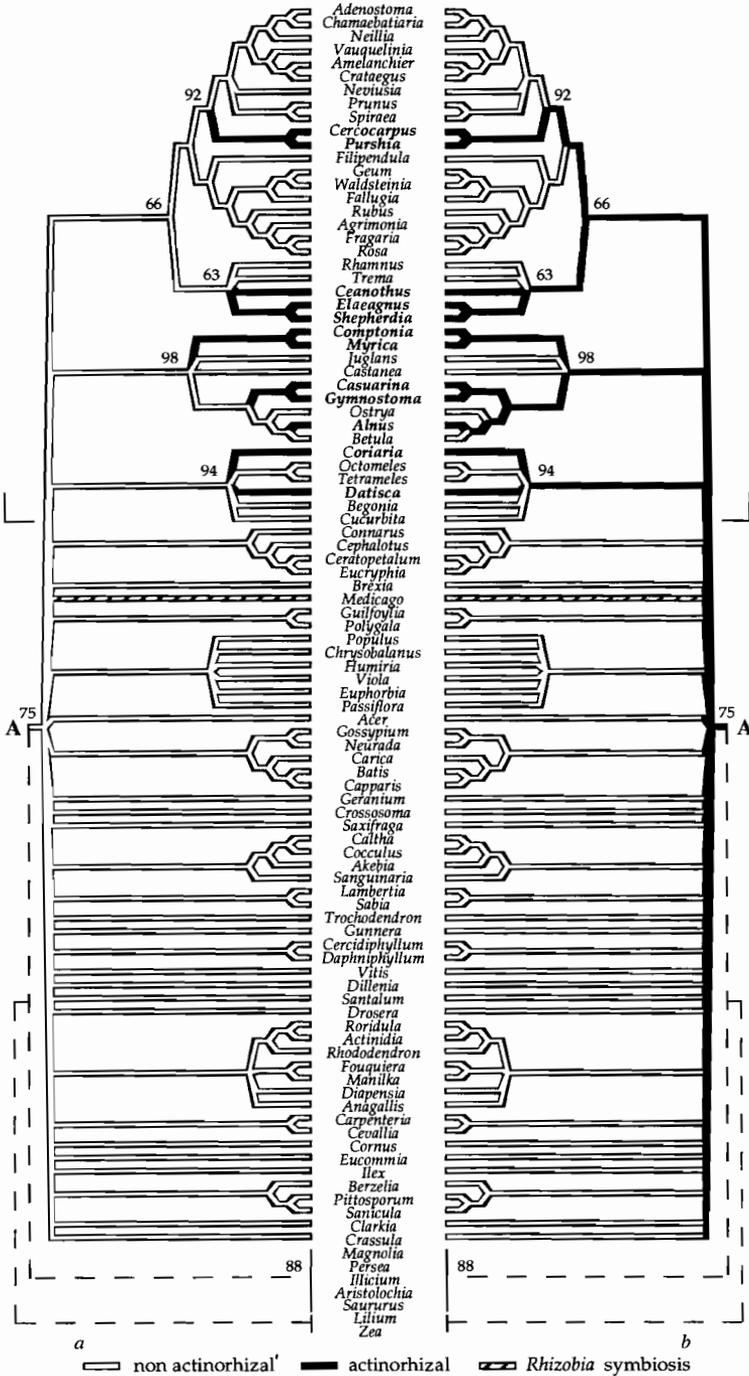


Figure 3

when analysing actinorhizal taxa without their non actinorhizal allies (Fig. 2), except for *Ceanothus*, which clustered with the *Elaeagnaceae* instead of the *Rosaceae* as shown on the parsimony tree of actinorhizal taxa (Fig. 2A). In Fig. 3, the large unresolved clade comprising the eight nitrogen-fixing families also included the legume family (represented by *Medicago*), the *Ulmaceae* (which comprises *Parasponia*, a nitrogen-fixing plant associated with *Rhizobium*, but represented here by *Trema*), and the *Gunneraceae* (represented by *Gunnera*, a stem nitrogen-fixing plant associated with *Nostoc*), as well as 56 non nitrogen-fixing families, and 78 non nitrogen-fixing genera (this last number was biased downward because of limitations in the sampling of non nitrogen-fixing genera).

When examining groups supported by less than 50 %-bootstrap values, the most restricted clade comprising all the actinorhizal taxa sampled was supported by a bootstrap value of 28 % (Fig. 4). The corrected bootstrap value obtained *a posteriori*

by double-bootstrapping for this most restricted clade was much higher (91 %), but failed to reach the significance level of 95 %. In this clade, the eight actinorhizal families were intermixed with only five non actinorhizal families and 27 non actinorhizal genera (the last number is again biased downward due to limitations in the sampling of non nitrogen-fixing genera). The topology of this tree resembles the topology of a parsimony tree derived by Soltis *et al.* (1995), from a different set of taxa, except that the actinorhizal clade obtained in this neighbor-joining analysis is taxonomically less diverse and that the legume family (here represented by *Medicago*) was excluded from this clade. The inclusion of this family within the actinorhizal clade was supported by an even lower bootstrap value of 14 %, which also brought seven other non nitrogen fixing families into the clade. The corrected bootstrap value obtained by double-bootstrapping for this extended nodular nitrogen-fixing clade was 97 % and therefore significant.

Fig. 3.- Reconstruction of the evolution of the actinorhizal symbiosis character on the clade of actinorhizal dicotyledonous taxa obtained when a minimum rule of 50 % bootstrap was applied to the tree resulting from neighbor-joining analysis. Values above branches are selected bootstrap values in percentage. (A) is the latest common ancestor to all actinorhizal plants on the 50 %-bootstrap consensus tree. Actinorhizal taxa are shown in bold types. Dotted lines show a sister group to the actinorhizal clade composed of *Magnoliidae* taxa and the monocots were used as outgroup. In brackets, enlarged portion shown in Fig. 4. Two scenarios are considered for reconstruction of character evolution. The first scenario (a) assumes that the ancestor (A) was not actinorhizal (recurrent evolution of actinorhizal symbiosis). The second scenario (b) assumes that the ancestor (A) was actinorhizal (unique origin). Total number of character state changes for scenario (a), towards the gain of the actinorhizal state during evolution, is 6 or 8, depending if state changes at polytomies were considered as unique or as multiple evolutionary events. For scenario (b), the corresponding numbers for the loss of the actinorhizal state during evolution are 34 or 38.

Fig. 3.- Reconstruction de l'évolution du caractère de symbiose actinorhizienne à partir de la topologie du regroupement comprenant tous les taxons actinorhiziens et obtenu en appliquant une règle minimale de valeur de rééchantillonnage de 50 % à l'arbre découlant de l'analyse « neighbor-joining ». Les valeurs au-dessus des branches représentent des valeurs de rééchantillonnage en pourcentage. (A) est le dernier ancêtre commun à l'ensemble des plantes actinorhiziennes, sur l'arbre consensus défini par une valeur minimale de rééchantillonnage de 50 %. Les taxons actinorhiziens sont montrés en caractères gras. Les lignes pointillées représentent un groupe frère composé de taxons appartenant aux *Magnoliidae* et des monocotylédones ont été utilisées comme groupe externe. Entre crochets, partie agrandie reproduite à la Fig. 4. Deux scénarios sont considérés en ce qui concerne la reconstruction de l'évolution du caractère. Le premier scénario (a) assume que l'ancêtre commun (A) n'était pas actinorhizien (évolution récurrente de la symbiose actinorhizienne). Le second scénario (b) assume que l'ancêtre commun (A) était actinorhizien (origine unique). Pour le scénario (a), le nombre total de changements vers le gain de la symbiose actinorhizienne durant l'évolution est de 6 ou 8 si l'on considère qu'une polytomie représente un seul ou plutôt de multiples événements évolutifs. Pour le scénario (b), les nombres correspondants à la perte de la symbiose actinorhizienne durant l'évolution sont 34 ou 38.

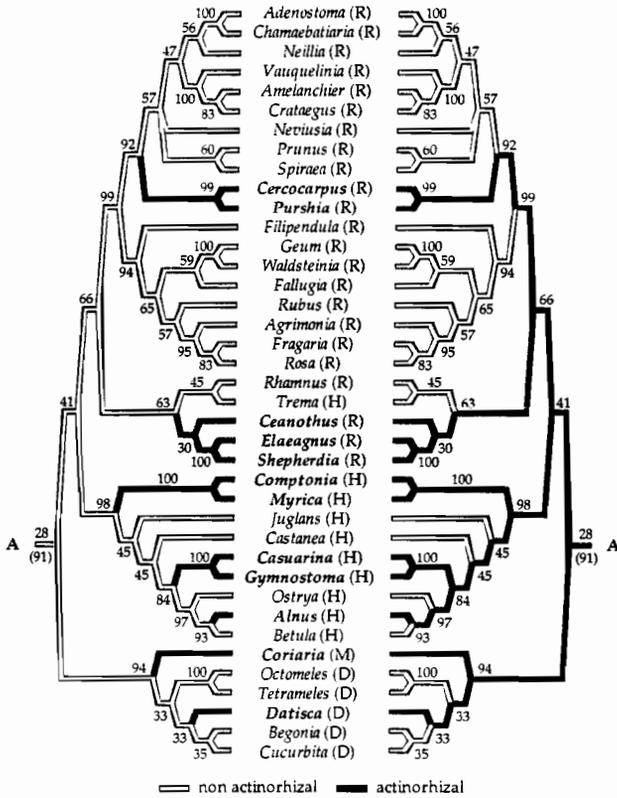


Fig. 4.- Portion of the phylogenetic tree obtained by neighbor-joining analysis and showing the most restricted clade regrouping all studied actinorhizal taxa, which was supported by a non corrected bootstrap value of 28 % and a parametric bootstrap value of 91 % (corrected bootstrap value obtained *a posteriori* by double-bootstrapping). Other bootstrap values are not corrected and are indicated for each internal branch. For this clade, (A) is the latest common ancestor to all actinorhizal plants. Actinorhizal taxa are shown in bold types. Subclass affiliation is indicated after each taxon (R = *Rosidae*, H = *Hamamelidae*, D = *Dilleniidae*, M = *Magnoliidae*). Two scenarios are considered for reconstruction of evolution of the actinorhizal symbiosis character. The first scenario (a) assumes that the common ancestor (A) was not actinorhizal (recurrent evolution of actinorhizal symbiosis). The second scenario (b) assumes that the ancestor (A) was actinorhizal (unique origin). Total number of character state changes for scenario (a), towards the gain of the actinorhizal state during evolution, is 7. For scenario (b), the corresponding number for the loss of the actinorhizal state during evolution is 9.

Fig. 4.- Portion de l'arbre phylogénétique obtenu par analyse « neighbor-joining » et montrant le regroupement le plus restreint de l'ensemble des taxons actinorhiziens étudiés, regroupement supporté par une valeur de rééchantillonnage non corrigée de 28 % et une valeur paramétrique de rééchantillonnage de 91 % (valeur de rééchantillonnage corrigée, obtenue *a posteriori* par double rééchantillonnage). Les autres valeurs de rééchantillonnage sont non corrigées et sont indiquées pour chaque branche interne. Pour ce regroupement restreint, (A) est le dernier ancêtre commun des plantes actinorhiziennes étudiées. Les taxons actinorhiziens sont montrés en caractères gras. La sous-classe à laquelle appartient chaque taxon est indiquée par une lettre (R = *Rosidae*, H = *Hamamelidae*, D = *Dilleniidae*, M = *Magnoliidae*). Deux scénarios sont considérés en ce qui concerne la reconstruction de l'évolution du caractère de la symbiose actinorhizienne. Le premier scénario (a) assume que l'ancêtre commun (A) n'était pas actinorhizien (évolution récurrente de la symbiose actinorhizienne). Le second scénario (b) assume que l'ancêtre commun (A) était actinorhizien (origine unique). Pour le scénario (a), le nombre total de changements vers le gain de la symbiose actinorhizienne durant l'évolution est de 7. Pour le scénario (b), le nombre correspondant à la perte de la symbiose actinorhizienne durant l'évolution est de 9.

Evolutionary study of actinorhizal symbiosis

To determine the most parsimonious scenario of character evolution of the actinorhizal symbiosis, character state changes were traced on the tree topologies previously presented (Figs. 3 and 4), assuming that the ancestor at the root of the clade containing all actinorhizal plants was (a) non actinorhizal or (b) actinorhizal. Scenario (a) implies that actinorhizal nitrogen fixation was acquired independently during evolution while scenario (b) implies that actinorhizal nitrogen fixation has been lost during evolution. When the 50 %-bootstrap consensus topology shown in Fig. 3 was used under scenario (a), the total number of character changes was 6 or 8, depending whether state changes at polytomies were considered as unique or as multiple evolutionary events, respectively. Under scenario (b), the corresponding numbers of character changes were 34 or 38, respectively, for this topology. When the most restricted clade of actinorhizal taxa (supported by a bootstrap value of 28 % and a corrected bootstrap value of 91 %) was used (Fig. 4), the corresponding numbers of changes were 7 for scenario (a) and 9 for scenario (b). There was no polytomy effect for this tree topology. When the topology derived by Soltis *et al.* (1995) from parsimony analysis was used (Fig. not shown), the corresponding numbers of changes varied from 7 to 8 for scenario (a) and from 11 to 17 for scenario (b). Thus, scenario (a), assuming that the ancestor at the root of the actinorhizal clade was non actinorhizal, was the most parsimonious with every one of the tree topologies tested.

DISCUSSION

Molecular phylogeny of actinorhizal plants and their relatives

The 50 %-bootstrap consensus tree obtained by neighbor-joining analysis involved 72 families of dicotyledonous plants and showed mainly a large polytomy flanked by a cluster of *Magnoliidae* taxa (*Ma-*

gnolia, *Persea*, *Illicium*, *Aristolochia*, and *Saururus*) as a sister group. Basically, the actinorhizal genera analysed segregated into four groups : (1) the *Coriaria-Datisca* group, (2) the « higher » *Hamamelidae* group, (3) the *Ceanothus-Elaeagnaceae* group and (4) the *Cercocarpus-Purshia* group. Presumably, the 50 %-bootstrap level is a very conservative measure of confidence level with respect to the large number of taxa involved (Zharkikh and Li, 1995), resulting in a poorly resolved topology near the root of the tree. However, it should be noted that when many non actinorhizal genera are included in the analysis (Fig. 4), *Ceanothus* (*Rhamnaceae*) is grouped with *Rhamnus* (*Rhamnaceae*) and close to the *Elaeagnaceae*, rather than being grouped at a lower level of confidence with *Cercocarpus* and *Purshia* (*Rosaceae*), as suggested by parsimony analysis of the 13 actinorhizal taxa (Fig. 2A). The close relationship between the *Elaeagnaceae* and the *Rhamnaceae* was also supported by parsimony analysis of a large number of taxa (Soltis *et al.*, 1995).

Despite the reduced resolution of the 50 %-bootstrap consensus tree, some groups were supported by high bootstrap values and were in agreement with previous studies. The « higher » *Hamamelidae* appeared in a coherent cluster supported by a very high bootstrap estimate (98 %), which was congruent with the results of Maggia and Bousquet (1994). Similar to other parsimony analyses of the gene *rbcL* (Chase *et al.*, 1993 ; Morgan *et al.*, 1994), the 50 %-bootstrap consensus tree indicated a closer relationship of the *Rosaceae* (*Rosales*, *Rosidae*) with the *Rhamnaceae* (*Rhamnales*, *Rosidae*) and *Ulmaceae* (*Urticales*, *Hamamelidae*) than with all other represented families belonging to the order *Rosales*. Given the number of taxa involved, this topology was also well supported (66 % bootstrap value). Contrary to current taxonomical treatment, *Coriaria* (*Magnoliidae*) was placed close to *Datisca* (*Dilleniidae*), and this topology was supported by a high

bootstrap estimate (94 %). This grouping has also been obtained by parsimony analysis of the gene *rbcL* (Swensen *et al.*, 1994), and is also supported by observations of similar nodule morphology between the two taxa (Dixon and Wheeler, 1986).

As the number of taxa being analysed is increased, the number of possible tree topologies increases exponentially, causing bootstrap values to become too conservative. By computing complete and partial bootstrap values (double bootstrapping), a confidence interval is obtained and the resulting bootstrap values can be interpreted as parametric test values (Zharkikh and Li, 1995). The most restricted clade grouping all actinorhizal taxa (Fig. 4), which was supported by a non-corrected bootstrap value of 28 %, had a confidence level of 91 %, which is close to the confidence level of 95 %. From a statistical point of view, this clade should be rejected. However, it is surprising that such a taxonomically diverse collection of actinorhizal genera intermingled with relatively few non-actinorhizal families was supported by such a relatively high level of confidence. This clade is reminiscent of the slightly more diverse clade of nitrogen-fixing dicotylenous taxa obtained from parsimony analysis by Soltis *et al.* (1995), which was supported by a decay value of 2. This would suggest that the evolution of actinorhizal nitrogen fixation has been limited to a set of dicotylenous taxa, among which some have diverged more than 100 million years ago (Maggia and Bousquet, 1994), at a period of possible nitrogen deficiency during the early Cretaceous era (Bond, 1983), implying that the early divergence among major actinorhizal phylla is quite ancient.

Evolution of actinorhizal symbiosis

The most parsimonious reconstruction of character evolution with any of the topologies presented favored the recurrent evolution of actinorhizal nitrogen fixation. In this

study, the clade supported by a minimum bootstrap value of 50 %, contained all actinorhizal taxa as well as representatives of 56 non nitrogen-fixing families, which far exceeded the number of families containing root nitrogen-fixing genera (10). The nitrogen-fixing clade proposed by Soltis *et al.* (1995) comprised 26 non nitrogen-fixing families of dicots. Moreover, the taxa of the 10 nitrogen-fixing families were interspersed among 9 of the 26 non nitrogen-fixing families, with several nitrogen-fixing genera being a minor component of their respective family (as in the *Rosaceae*).

Even with the most restricted clade of actinorhizal taxa obtained in this study (non corrected bootstrap value of 28 %), which did not reach the confidence level of 95 %, and which excluded the legume family, the independent evolution of actinorhizal symbiosis was still favored, because of the large number of non actinorhizal genera within several actinorhizal families (Fig. 4). When considering all these observations, it is unlikely that the common ancestor to all actinorhizal plants was in fact actinorhizal, even if it had a « predisposition » for nodular nitrogen fixation (Soltis *et al.*, 1995). A similar rationale has been held for the ancestor of the legume family, underlying recurrent evolution of the *Rhizobia* symbiosis, although many of the members of this family are nitrogen-fixing (Doyle, 1994). However, these results should not be interpreted as for a distinct evolution of the actinorhizal symbiosis for each actinorhizal family or genus. As previously shown (Maggia and Bousquet, 1994), evidence exists that among closely related actinorhizal genera or families, the actinorhizal symbiosis or the plant attributes allowing the symbiosis to take place might be ancestral.

Morphological differences among nitrogen-fixing taxa

Several morphological characteristics point to the repeated evolution of nodular nitrogen-fixing systems. There are a num-

ber of important differences in nodule development and morphology between the *Rhizobia*-legumes symbiosis and the actinorhizal symbiosis involving the actinomycete *Frankia* (Dixon and Wheeler, 1986). Nodules of the *Rhizobia*-legume symbiosis have a stem-like anatomy while nodules of the *Frankia* symbiosis have a root-like anatomy. Vascular bundles are peripheral and surround the infected and non-infected cells in *Rhizobia* nodules and the situation is reverse in actinorhizal nodules. The sites of nitrogen fixation also differ. In the *Rhizobia*-symbiosis, bacteroids are the nitrogen-fixing forms of the bacteria, while in actinorhizal plants, vesicles formed in the nodules are the main site of nitrogen fixation. Adequate oxygen protection is thus provided differently in each symbiosis. In the legume nodule, the infected zone where bacteroids occur lies within a diffusion-resistant barrier providing a consistent oxygen protection structure for the nitrogenase enzyme. The mechanism of oxygen protection is apparently more diverse in actinorhizal symbiosis where *Frankia* produces a diversity of structures for this function (Benson and Silvester, 1993) (see below).

Furthermore, in the actinorhizal symbiosis, different infection processes and nodule structures have been described, which correspond to different dicot families. Some of these traits have been shown to be under the control of the host plant (Lalonde, 1979). Infection proceeds through root hair deformation and penetration in « higher » *Hamamelidae* (*Alnus*, *Myrica*, *Comptonia*, *Casuarina*, *Gymnostoma*) and through intercellular penetration of the epidermis and cortex for the *Elaeagnaceae* and other actinorhizal plants (Benson and Silvester, 1993). The generally central stele found in actinorhizal nodules is acentric in nodules of *Coriaria* (*Coriariaceae*) and *Datisca* (*Datisceae*). For these taxa, the distribution of infected cells in the cortex and the position of *Frankia* vesicles within infec-

ted cells are distinct from other actinorhizal symbioses (Dixon and Wheeler, 1986). *In vivo*, vesicle shape and structure are variable among and within actinorhizal families. They are club-shaped and septate in *Myrica* and *Comptonia* (*Myricaceae*), spherical and septate in nodules of *Alnus* (*Betulaceae*), *Hippophae* (*Elaeagnaceae*), *Colletia*, *Discaria* (*Rhamnaceae*), and *Dryas* (*Rosaceae*), and elliptical and aseptate in nodules of *Ceanothus* (*Rhamnaceae*) (Dixon and Wheeler, 1986). Vesicles are very ill-defined in *Coriaria* (*Coriariaceae*) nodules and apparently absent in *Casuarina* and *Allocasuarina* (*Casuarinaceae*) (Benson and Silvester, 1993) although septate, club-shaped tips to some hyphae in nodules of *Casuarina* have been found (Dixon and Wheeler, 1986). From this description, it is likely that the mechanism of oxygen protection is more variable in actinorhizal plants.

It is not clear what attributes could be uniquely shared by the various actinorhizal taxa and their close non actinorhizal relatives if we assume that their common ancestor was predisposed for nodular nitrogen fixation or had indeed the capacity to establish a symbiosis. Many of the plant genes normally involved in the establishment of a nitrogen-fixing symbiosis (such as those identified in the *Rhizobia* association, coding for flavonoids, or early and late nodulins), are also involved in other functions, and they are not exclusive to nitrogen-fixing genera or to their close non nitrogen-fixing allies (Peters *et al.*, 1986 ; Doyle, 1994). This is well illustrated by the haemoglobin genes, a generally multigene family, considered at first exclusive to nodules of nitrogen-fixing members of the legume family, yet subsequently found in *Parasponia* (Appleby *et al.*, 1983) and in actinorhizal taxa (Roberts *et al.*, 1985 ; Fleming *et al.*, 1987 ; Pathirana and Tjepkema, 1995 ; Suharjo and Tjepkema, 1995 ; Bogusz *et al.*, 1995) as well as in non nitrogen-fixing plants (Bogusz *et al.*, 1988 ; Taylor *et al.*, 1994), and

thought to have a monophyletic origin with the haemoglobin genes of animals (Landsmann *et al.*, 1986).

For actinorhizal genera, recent studies on plant gene expression in nodules have shown that most genes involved are members of multigene families and are also implicated in other functions or expressed in other tissues, making unlikely the hypothesis of distinct gene factors being shared only by actinorhizal taxa, their non-actinorhizal relatives and their common ancestor. Such examples are genes coding for subtilase-like proteins (Ribeiro *et al.*, 1995), cysteine protease (Goetting-Minesky and Mullin, 1995), chalcone synthase, α -tubulin, and metalloproteins (Bogusz *et al.*, 1995). These genes are known to be involved in degradative, detoxifying, sequestering, or plant development functions, and some of them might be expressed in response to *Frankia* invasion (Goetting-Minesky and Mullin, 1995).

Frankia is not an obligate symbiont and its presence in the rhizosphere as demonstrated with *Betula*, can be beneficial to a plant without the intimate association of the symbiont with the roots of the host plant (Rönkkö *et al.*, 1993). The apparent control of the plants towards infection processes and nitrogen-fixing structures of *Frankia*, the development of the membrane surrounding the symbiont, and the production of cell wall-like material encapsulating the membrane as a result of cell wall degradation (or other mechanisms) could all be interpreted as defense mechanisms of the plant host towards invasion by *Frankia*. Genes involved in nodule formation or development have been suggested to be recruited or duplicated for nitrogen fixation purposes instead of new genes being expressed in the nodule (Doyle, 1994).

These observations support the hypothesis of recurrent evolution of nitrogen-fixing symbiosis among actinorhizal plants. Unlike the presence of an actinorhizal symbiosis, which can be tested, and has been shown

to have likely evolved in a recurrent manner in the actinorhizal clade, a predisposition for nodular nitrogen fixation (Soltis *et al.*, 1995) cannot be tested until morphological, biochemical, or genetic evidence is provided in support of this hypothesis.

Coevolutionary relationships between *Frankia* and host plants

If the actinorhizal symbiosis has evolved several times as suggested by the most parsimonious reconstruction of evolution for this character, there should be little correlation between the phylogeny of *Frankia* strains and that of their host plants. A broad comparison between the phylogenetic trees of the hosts (Figs. 2 and 4) and the most complete phylogenetic tree of *Frankia* (Normand *et al.*, 1996) shows little correlation in the patterns of diversification of the two symbiotic partners, which indicates a lack of stringent co-evolutionary relationships. In the host phylogenetic tree, four broadly defined groups of actinorhizal genera can be circumscribed, the *Coriaria-Datisca* group, the « higher » *Hamamelidae* group (*Myrica*, *Casuarina*, *Alnus*), the *Ceanothus-Elaeagnaceae* group and the *Cercocarpus-Purshia* group. In the *Frankia* phylogenetic tree (Normand *et al.*, 1996), strains from the *Elaeagnus* and strains from *Coriaria-Datisca* each form distinct coherent groups, and strains from *Alnus*, *Myrica*, and *Casuarina* are mostly gathered in one large cluster, but do not form host-defined natural groups (the strains from *Alnus* are actually polyphyletic). When comparing host plant and *Frankia* phylogenetic trees, exceptions to a stringent coevolution are numerous, including examples where a strain from *Purshia* (*Rosaceae*) and a strain from *Alnus* gather with strains from *Datisca* and *Coriaria*, or where a strain from *Dryas* (*Rosaceae*) is a sister group to all other *Frankia* strains, away from the *Purshia* strain.

Studies of the coevolution of *Frankia* strains and their host plants have shown that for « higher » *Hamamelidae*, evolution has

likely proceeded towards a narrower promiscuity. Promiscuity differences noted among actinorhizal plants result in variable stringency of coevolutionary relationship and lack of tight relations between the phylogenies of both symbiotic partners (Maggia and Bousquet, 1994). For instance, a high degree of genetic and biochemical diversity was particularly evident among *Frankia* strains infective on very promiscuous genera such as *Myrica* and *Alnus* (Gardes *et al.*, 1987 ; Normand *et al.*, 1996), and this diversity was reduced on less promiscuous taxa such as *Casuarina* (Nazarret *et al.*, 1991 ; Maggia *et al.*, 1992). Strains exhibiting large biochemical and genetic diversity on very promiscuous actinorhizal plants generally failed to form coherent taxonomic groups (Gardes *et al.*, 1987 ; St-Laurent *et al.*, 1987 ; Simon *et al.*, 1989 ; Normand *et al.*, 1996). A study of the phylogeny of *Rhizobia* also showed that they are taxonomically diverse and that there is little correlation between the bacterial and host phylogenies, giving support to the recurrent evolution of this symbiosis (Doyle, 1994).

The bulk of current evidence supports the hypothesis of several distinct origins of actinorhizal nitrogen fixation, even though actinorhizal plants show quite a high degree of phylogenetic relatedness. The most parsimonious reconstruction of character evolution on the host plant phylogenies, directly supports this hypothesis. The current picture is more one of complexity, where actinorhizal nitrogen fixation was likely acquired independently in several lineages, to be apparently lost later in some of them, reflecting various long-term mutualistic and antagonistic interactions between actinorhizal plants and *Frankia*.

Acknowledgements - This research was supported by grants from the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC-CRSNG) and Fonds québécois pour la formation et l'aide à la recherche (FCAR) to J. Bousquet. We wish to thank J. Laroche (CRBF, Univ. Laval) and Y. Boudreau (RSVS, Univ. Laval) for their help with implementation of the double-bootstrapping procedure, and K. Dewar (Department of Biology, Univ. of Pennsylvania) for comments on a previous draft of this manuscript.

BIBLIOGRAPHIE

- Albert V.A., M.W. Chase & S.E. Williams, 1992.- Carnivorous plants : Phylogeny and structural evolution. *Science*, **257**, 1491-1495.
- Aldrich J., B. Cherney, E. Merlin & J. D. Palmer, 1986.- Sequence of the *rbcl* gene for the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase from alfalfa. *Nucl. Acids Res.*, **14**, 9535 [erratum 1987 *Nucl. Acids Res.*, **15**, 868].
- Appleby C.A., J.D. Tjepkema & M.J. Trinick, 1983.- Hemoglobin in a nonleguminous plant, *Parasponia* : possible genetic origin and function in nitrogen fixation. *Science*, **220**, 951-953.
- Baker D.D. & C.R. Schwintzer, 1990.- Introduction. In : The Biology of *Frankia* and Actinorhizal Plants. Schwintzer C.R. & J.D. Tjepkema, Academic Press, New York, 1-33.
- Benson D.R. & W.B. Silvester, 1993.- Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol. Rev.*, **57**, 293-319.
- Bogusz D., C.A. Appleby, J. Landsmann, E.S. Dennis, M.J. Trinick & W.J. Peacock, 1988.- Functioning hemoglobin genes in non-nodulating plants. *Nature*, **331**, 178-180.
- Bogusz D., C. Franche, H. Gherbi, D. Diouf, C. Gobé, F. Auguy, J. Ahée & E. Duhoux, 1995.- La symbiose *Casuarina-Frankia* : approche moléculaire du rôle de la plante-hôte. Abstract. In : Les Plantes Actinorhizien-nes. Duhoux E. & H.G. Diem, Symposium de la Société française de Physiologie végétale et de la Société botanique de France, Université Paris VII.
- Bond G., 1983.- Taxonomy and distribution of non-legume nitrogen-fixing systems. In : Biological Nitrogen Fixation in Forest Ecosystems: Foundations and Applications. Gorden J.C. & C.T. Wheeler, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, Boston, 55-87.
- Bousquet J., S.H. Strauss & P. Li, 1992a.- Complete congruence between morphological and *rbcl*-based molecular phylogenies in birches and related species (*Betulaceae*). *Mol. Biol. Evol.*, **9**, 1076-1088.
- Bousquet J., S.H. Strauss, A.H. Doerksen & R.A. Price, 1992b.- Extensive variation in evolutionary rate of *rbcl* gene sequences among seed plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7844-7848.
- Chase M.W., D.E. Soltis, R.G. Olmstead *et al.*, (39 other authors), 1993.- DNA sequence phylogenetics of seed plants : an analysis of the plastid gene *rbcl*. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **80**, 528-580.
- Cronquist A., 1988.- The Evolution and Classification of Flowering Plants, 2nd ed. The New York Botanical Garden, New York, 555p.
- Dixon R.O.D. & C.T. Wheeler, 1986.- Nitrogen Fixation in Plants. Chapman & Hall, Boston, 157p.
- Doyle J.J., 1994.- Phylogeny of the legume family : an approach to understanding the origins of nodulation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **25**, 325-349.
- Fernando E.S., P.A. Gadek, D.M. Crayn & C.J. Quinn,

- 1993.- Rosid affinities of *Surianaceae*: molecular evidence. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **2**, 344-350.
- Fleming A.I., J.B. Wittenberg, B.A. Wittenberg, W.F. Dudman & C.A. Appleby, 1987.- The purification, characterization and ligand-binding kinetics of hemoglobin from root nodules of the non-leguminous *Casuarina glauca*-*Frankia* symbiosis. *Biochim. Biophys. Acta*, **911**, 209-220.
- Frascaria N., L. Maggia, M. Michaud & J. Bousquet, 1993.- The *rbcl* gene sequence from chestnut indicates a slow rate of evolution in the *Fagaceae*. *Genome*, **36**, 668-671.
- Gardes M., J. Bousquet & M. Lalonde, 1987.- Isozyme variation among 40 *Frankia* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1596-1603.
- Gaut B.S., S.V. Muse, W.D. Clark & M.T. Clegg, 1992.- Relative rates of nucleotide substitution at the *rbcl* locus of monocotyledonous plants. *J. Mol. Evol.*, **35**, 292-303.
- Goetting-Minesky M.P. & B.C. Mullin, 1995.- Differential gene expression in an actinorhizal symbiosis: evidence for a nodule-specific cysteine proteinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9891-9895.
- Gunter L.E., G. Kochert & D.E. Giannasi, 1994.- Phylogenetic relationships of the *Juglandaceae*. *Plant Syst. Evol.*, **192**, 11-29.
- Hempel A.L., P.A. Reeves, R.G. Olmstead & R.K. Jansen, 1995.- Implications of *rbcl* sequence data for higher order relationships of the *Loasaceae* and the anomalous aquatic plant *Hydrostachys* (*Hydrostachyaceae*). *Plant Syst. Evol.*, **194**, 25-37.
- Kron K.A. & M.W. Chase, 1993.- Systematics of the *Ericaceae*, *Empetraceae*, *Epacridaceae* and related taxa based upon *rbcl* sequence data. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **80**, 735-741.
- Kimura M., 1980.- A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, **16**, 111-120.
- Kumar S., K. Tamura & M. Nei, 1993.- MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 1.0. The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania.
- Lalonde M., 1979.- Immunological and ultrastructural demonstration of nodulation of the European *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. host plant by an actinomycetal isolate from the North American *Comptonia perigrina* (L.) Coult. root nodule. *Bot. Gaz.*, **140**, S35-S43.
- Lalonde M., L. Simon, J. Bousquet & A. Séguin, 1988.- Advances in the taxonomy of *Frankia*: recognition of species *alni* and *elaegni* and novel subspecies *pomerii* and *vandijkii*. In: Nitrogen Fixation: Hundred Years After. Bothe H. et al., Gustav Fisher, Stuttgart, 671-680.
- Landsmann J., E.S. Dennis, T.J.V. Higgins, C.A. Appleby, A.A. Kortt & W.J. Peacock, 1986.- Common evolutionary origin of legume and non-legume plant haemoglobins. *Nature*, **324**, 166-168.
- Maddison W.P. & D.R. Maddison, 1992.- MacClade - Analysis of Phylogeny and Character Evolution, Version 3.01. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Maggia L., S. Nazaret & P. Simonet, 1992.- Molecular characterization of *Frankia* isolates from *Casuarina equisetifolia* root nodules harvested in West Africa (Senegal and Gambia). *Acta Oecologica*, **13**, 453-461.
- Maggia L. & J. Bousquet, 1994.- Molecular phylogeny of the actinorhizal *Hamamelidaceae* and relationships with host promiscuity towards *Frankia*. *Mol. Ecol.*, **3**, 459-467.
- Morgan D.R. & D.E. Soltis, 1993.- Phylogenetic relationships among members of *Saxifragaceae sensu lato* based on *rbcl* sequence data. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **80**, 631-660.
- Morgan D.R., D.E. Soltis & K.R. Robertson, 1994.- Systematic and evolutionary implications of *rbcl* sequence variation in *Rosaceae*. *Amer. J. Bot.*, **81**, 890-903.
- Mylona P., K. Pawlowski & T. Bisseling, 1995.- Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell*, **7**, 869-885.
- Nazaret S., B. Cournoyer, P. Normand & P. Simonet, 1991.- Phylogenetic relationships among *Frankia* genomic species determined by use of amplified 16S rDNA sequences. *J. Bacteriol.*, **173**, 4072-4078.
- Nickrent D.L. & D.E. Soltis, 1995.- A comparison of angiosperm phylogenies from nuclear 18S rDNA and *rbcl* sequences. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **82**, 208-234.
- Normand P., S. Orso, B. Cournoyer, P. Jeannin, C. Chapelon, J. Dawson, L. Evtushenko & A.K. Misra, 1996.- Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of the family *Frankiaceae*. *Int. J. Syst. Bact.*, **46**, 1-9.
- Olmstead R.G., H.J. Michaels, K.M. Scott & J.D. Palmer, 1992.- Monophyly of the Asteridae and identification of their major lineages inferred from DNA sequences of *rbcl*. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **79**, 249-265.
- Olmstead R.G., B. Bremer, K.M. Scott & J.D. Palmer, 1993.- A parsimony analysis of the Asteridae *sensu lato* based on *rbcl* sequences. *Ann. Missouri Bot. Garden*, **80**, 700-722.
- Pathirana S.M. & J.D. Tjepkema, 1995.- Purification of hemoglobin from the actinorhizal root nodules of *Myrica gale* L. *Plant Physiol.*, **107**, 827-831.
- Peters N.K., J.W. Frost & S.R. Long, 1986.- A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science*, **233**, 977-980.
- Qiu Y.-L., M.W. Chase, D.H. Les & C.R. Parks, 1993.- Molecular phylogenetics of the *Magnoliidae*: cladistic analyses of nucleotide sequences of the plastid gene *rbcl*. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **80**, 587-606.
- Ribeiro A., A.D.L. Akkermans, A. van Kammen, T. Bisseling & K. Pawlowski, 1995.- A nodule-specific gene encoding a subtilisin-like protease is expressed in early stages of actinorhizal nodule development. *Plant Cell*, **7**, 785-794.
- Roberts M.P., S. Jafar & B.C. Mullin, 1985.- Leghemoglobin-like sequences in the DNA of four actinorhizal plants. *Plant Molecular Biology*, **5**, 333-337.
- Rodman J.E., R.A. Price, K.G. Karol, E. Conti, K. Sytsma & J. Palmer, 1993.- Nucleotide sequences of the *rbcl* gene indicate monophyly of mustard oil plants. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **80**, 686-699.
- Rodman J.E., K.G. Karol, R.A. Price, E. Conti & K.J. Sytsma, 1994.- Nucleotide sequences of *rbcl* confirm the Capparalean affinity of the Australian endemic *Gyrostemonaceae*. *Aust. Syst. Bot.*, **7**, 57-69.

- Rönkkö S., A. Smolander, E.-L. Nurmiaho-Lassila & K. Haahtela, 1993.- *Frankia* in the rhizosphere of non-host plants : a comparison with root-associated N₂-fixing *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Pseudomonas*. *Plant and Soil*, **153**, 85-95.
- Saitou N. & M. Nei, 1987.- The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **2**, 112-118.
- Savard L., P. Li, S.H. Strauss, M.W. Chase, M. Michaud & J. Bousquet, 1994.- Chloroplast and nuclear gene sequences indicate Late Pennsylvanian time for the last common ancestor of extant seed plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5163-5167.
- Simon L., S. Jabaji-Hare, J. Bousquet & M. Lalonde, 1989.- Confirmation of *Frankia* species using cellular fatty acids analysis. *Syst. Appl. Microbiol.*, **11**, 229-235.
- Soltis D.E., P.S. Soltis, M.T. Clegg & M. Durbin, 1990.- *rbcl* sequence divergence and phylogenetic relationships in *Saxifragaceae sensu lato*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4640-4644.
- Soltis D.E., D.R. Morgan, A. Grable, P.S. Soltis & R. Kuzoff, 1993.- Molecular systematics of *Saxifragaceae sensu stricto*. *Amer. J. Bot.*, **80**, 1056-1081.
- Soltis D.E., P.S. Soltis, S.R. Morgan, S.M. Swensen, B.C. Mullin, J.M. Dowd & P.G. Martin, 1995.- Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2647-2651.
- St-Laurent L., J. Bousquet, L. Simon & M. Lalonde, 1987.- Separation of various *Frankia* strains in the *Alnus* and *Elaeagnus* host specificity groups using sugar analysis. *Can. J. Microbiol.*, **33**, 764-772.
- Suharjo U.K.J. & J.D. Tjepkema, 1995.- Occurrence of hemoglobin in the nitrogen-fixing root nodules of *Alnus glutinosa*. *Physiologia Plantarum*, **95**, 247-252.
- Swensen S.M., B.C. Mullin & M.W. Chase, 1994.- Phylogenetic affinities of *Datisceae* based on an analysis of nucleotide sequences from the plastid *rbcl* gene. *Syst. Bot.*, **19**, 157-168.
- Swofford D.L., 1993.- PAUP-Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1.1. Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.
- Taylor E.R., X.Z. Nie, A.W. MacGregor & R.D. Hill, 1994.- A cereal haemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions. *Plant Mol. Biol.*, **24**, 853-862.
- Zharkikh A. & W.H. Li, 1995.- Estimation of confidence in phylogeny: complete-and-partial bootstrap technique. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **44**, 49-63.

Appendix 1.- Classification of taxa used in the phylogenetic analysis (according to Cronquist, 1988). The subfamilial classification of the *Rosaceae* is the one proposed by Schulze-Menz (1964) (cited in Morgan *et al.*, 1994). Actinorhizal species are shown in bold type. Accession numbers correspond to *rbcl* gene sequences from the GenBank database.

Appendice 1.- Classification des taxons utilisés dans l'analyse phylogénétique (selon Cronquist, 1988). La division des *Rosaceae* en sous-familles suit le traitement de Schulze-Menz (1964) (cité dans Morgan *et al.*, 1994). Les espèces actinorhiziennes sont en caractères gras. Les numéros d'accèsion correspondent aux séquences du gène *rbcl* tirées de la banque de séquences GenBank.

SUBCLASS Order	Family Subfamily	Species	Sequence length	Accession nb.	Reference
ROSIDAE					
Apiales	Apiaceae	<i>Sanicula gregari</i>	31-1407	L11170	Chase <i>et al.</i> , 93
Celastrales	Aquifoliaceae	<i>Ilex crenata</i>	31-1428	L01928	Albert <i>et al.</i> , 92
Cornales	Cornaceae	<i>Cornus canadensis</i>	31-1407	L01898	Soltis <i>et al.</i> , 90
Euphorbiales	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia polychroma</i>	27-1428	L13185	Chase <i>et al.</i> , 93
Fabales	Fabaceae	<i>Medicago sativa</i>	1-1428	X04975	Aldrich <i>et al.</i> , 86
Geraniales	Geraniaceae	<i>Geranium grandiflorum</i>	26-1428	L01920	Albert <i>et al.</i> , 92
Halogerales	Gunneraceae	<i>Gunnera manicata</i>	31-1407	L11186	Morgan & Soltis 93
Linales	Humiriaceae	<i>Humiria balsaminifera</i>	31-1428	L01926	Albert <i>et al.</i> , 92
Myrtales	Onagraceae	<i>Clarkia xantiana</i>	10-1428	L01896	Albert <i>et al.</i> , 92
Polygalales	Polygalaceae	<i>Polygala cruciata</i>	29-1428	L01945	Albert <i>et al.</i> , 92
Protiales	Elaeagnaceae	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	1-1398	U17038	Morgan & Soltis 93
		<i>Shepherdia canadensis</i>	1-1398	U17039	Morgan & Soltis 93
	Proteaceae	<i>Lambertia inermis</i>	31-1407	L11190	Morgan & Soltis 93
Rhamnales	Rhamnaceae	<i>Ceanothus sanguineus</i>	1-1398	U06795	Soltis <i>et al.</i> , 93
		<i>Rhamnus catharticus</i>	30-1428	L13189	Chase <i>et al.</i> , 93
	Vitaceae	<i>Vitis aestivalis</i>	27-1428	L01960	Albert <i>et al.</i> , 92
Rosales	Byblidaceae	<i>Roridula gorgonias</i>	31-1407	L01950	Albert <i>et al.</i> , 92
	Cephalotaceae	<i>Cephalotus follicularis</i>	31-1407	L01894	Soltis <i>et al.</i> , 90
	Connaraceae	<i>Connarus conchocarpus</i>	19-1428	L29493	Fernando <i>et al.</i> , 93
	Chrysobalanaceae	<i>Chrysobalanus icaco</i>	31-1407	L11178	Morgan & Soltis 93
	Crossosomataceae	<i>Crossosoma californicum</i>	31-1407	L11179	Morgan & Soltis 93
	Cunoniaceae	<i>Ceratopetalum gumiferum</i>	31-1407	L01895	Soltis <i>et al.</i> , 90
	Crassulaceae	<i>Crassula marnierana</i>	31-1407	L01899	Albert <i>et al.</i> , 92
	Eucryphiaceae	<i>Eucryphia lucida</i>	31-1407	L01918	Soltis <i>et al.</i> , 90
	Greyiaceae	<i>Berzelia lanuginosa</i>	1-1402	L14391	Olmstead <i>et al.</i> , 93

APPENDIX (suite)

	Grossulariaceae	<i>Brexia madagascarensis</i>	31-1407	L11176	Soltis <i>et al.</i> , 90	
	Hydrangeaceae	<i>Carpenteria californica</i>	31-1407	L11177	Soltis <i>et al.</i> , 90	
	Neuradaceae	<i>Neurada procumbens</i>	1-1398	U06814	Soltis <i>et al.</i> , 93	
	Pittosporaceae	<i>Pittosporum japonicum</i>	31-1407	L11202	Morgan & Soltis 93	
	Rosaceae					
	Spiraeoideae	<i>Vauquelinia corymbosa</i>	1-1398	U06829	Soltis <i>et al.</i> , 93	
		<i>Chamaebatiaria millefolium</i>	1-1398	U06797	Soltis <i>et al.</i> , 93	
		<i>Neillia sinensis</i>	1-1398	U06813	Soltis <i>et al.</i> , 93	
		<i>Spiraea vanhouttei</i>	31-1407	L11206	Morgan & Soltis 93	
	Rosoideae	<i>Filipendula purpurea</i>	1-1398	U06803	Soltis <i>et al.</i> , 93	
		<i>Nevisia alabamensis</i>	1-1398	U06815	Soltis <i>et al.</i> , 93	
		<i>Rubus idaeus</i>	1-1398	U06825	Soltis <i>et al.</i> , 93	
		<i>Rosa woodsii</i>	1-1398	U06824	Soltis <i>et al.</i> , 93	
		<i>Agrimonia parviflora</i>	1-1398	U06791	Soltis <i>et al.</i> , 93	
		<i>Adenostoma sparsifolium</i>	1-1398	U06790	Soltis <i>et al.</i> , 93	
		<i>Cercocarpus ledifolium</i>	1-1398	U06796	Soltis <i>et al.</i> , 93	
		<i>Fallugia paradoxa</i>	1-1398	U06802	Soltis <i>et al.</i> , 93	
		<i>Geum chilense</i>	31-1407	L01921	Albert <i>et al.</i> , 92	
		<i>Purshia tridentata</i>	1-1398	U06821	Soltis <i>et al.</i> , 93	
		<i>Waldsteinia fragarioides</i>	1-1417	U06830	Soltis <i>et al.</i> , 93	
		<i>Fragaria ananassa</i>	1-1398	U06805	Soltis <i>et al.</i> , 93	
	Maloideae	<i>Amelanchier alnifolia</i>	1-1398	U06793	Soltis <i>et al.</i> , 93	
		<i>Crataegus columbiana</i>	1-1398	U06799	Soltis <i>et al.</i> , 93	
	Amygdaloideae	<i>Prunus emarginata</i>	1-1423	U06820	Soltis <i>et al.</i> , 93	
	Saxifragaceae	<i>Saxifraga cernua</i>	1-1398	U06215	Soltis <i>et al.</i> , 93	
	Surianaceae	<i>Guilfoylia monostylis</i>	1-1428	L29494	Fernando <i>et al.</i> , 93	
Sapindales	Aceraceae	<i>Acer saccharum</i>	31-1428	L13181	Chase <i>et al.</i> , 93	
Santalales	Santalaceae	<i>Santalum album</i>	7-1425	L26077	Nickrent & Soltis 95	
DILLENIIDAE						
	Batales	Bataceae	<i>Batis maritima</i>	27-1455	L22438	Rodman <i>et al.</i> , 94
	Capparales	Capparaceae	<i>Capparis hastata</i>	27-1428	M95754	Rodman <i>et al.</i> , 93
	Diapensiales	Diapensiaceae	<i>Diapensia lapponica</i>	29-1428	L12612	Kron & Chase 93
	Dilleniiales	Dilleniaceae	<i>Dillenia indica</i>	31-1428	L01903	Albert <i>et al.</i> , 92
	Ebenales	Sapotaceae	<i>Manilkara zapota</i>	29-1428	L01932	Albert <i>et al.</i> , 92
	Ericales	Ericaceae	<i>Rhododendron hippophaeoides</i>	29-1428	L01949	Albert <i>et al.</i> , 92
	Malvales	Malvaceae	<i>Gossypium robinsonii</i>	27-1428	L13186	Chase <i>et al.</i> , 93
	Nepenthales	Droseraceae	<i>Drosera binata</i>	28-1428	L01906	Albert <i>et al.</i> , 92
	Primulales	Primulaceae	<i>Anagallis arvensis</i>	1-1428	M88343	Chase <i>et al.</i> , 93
	Salicales	Salicaceae	<i>Populus tremuloides</i>	1-1428	M58392	Bousquet <i>et al.</i> , 92a
	Theales	Actinidiaceae	<i>Actinidia chinensis</i>	31-1428	L01882	Albert <i>et al.</i> , 92
	Violales	Begoniaceae	<i>Begonia metallica X sanguinea</i>	27-1350	L12670	Chase <i>et al.</i> , 93
		Caricaceae	<i>Carica papaya</i>	27-1428	M95671	Rodman <i>et al.</i> , 93
		Cucurbitaceae	<i>Cucurbita pepo</i>	27-1428	L21938	Swensen <i>et al.</i> , 94
		Datisceae	<i>Datisca glomerata</i>	27-1428	L21940	Swensen <i>et al.</i> , 94
			<i>Octomeles sumatrana</i>	27-1428	L21942	Swensen <i>et al.</i> , 94
			<i>Tetrameles nudiflora</i>	27-1428	L21943	Swensen <i>et al.</i> , 94
		Fouquieriaceae	<i>Fouquieria splendens</i>	103-1428	L11675	Olmstead <i>et al.</i> , 92
		Loasaceae	<i>Cevallia sinuata</i>	27-1395	U17873	Hempel <i>et al.</i> , 95
		Passifloraceae	<i>Passiflora quadrangularis</i>	26-1428	L01940	Albert <i>et al.</i> , 92
		Violaceae	<i>Viola sororia</i>	103-1428	L11674	Olmstead <i>et al.</i> , 92
HAMAMELIDAE						
	Casuarinales	Casuarinaceae	<i>Casuarina cunninghamiana</i>	1-1428	X69528	Maggia & Bousquet 94
			<i>Allocasuarina verticillata</i>	1-1428	X69527	Maggia & Bousquet 94
			<i>Gymnostoma webbiana</i>	1-1428	X69531	Maggia & Bousquet 94
	Daphniphyllales	Daphniphyllaceae	<i>Daphniphyllum sp</i>	29-1428	L01901	Albert <i>et al.</i> , 92
	Eucommiales	Eucommiaceae	<i>Eucommia ulmoides</i>	31-1428	L01917	Albert <i>et al.</i> , 92
	Fagales	Betulaceae	<i>Alnus incana</i>	1-1428	X56618	Bousquet <i>et al.</i> , 92b
			<i>Betula papyrifera</i>	1-1428	X56617	Bousquet <i>et al.</i> , 92b
			<i>Ostrya virginiana</i>	1-1428	X56620	Bousquet <i>et al.</i> , 92b
		Fagaceae	<i>Castanea sativa</i>	1-1428	M94936	Frascaria <i>et al.</i> , 93
Juglandales	Juglandaceae	<i>Juglans nigra</i>	1-1428	U00437	Gunter <i>et al.</i> , 94	
Hamamelidales	Cercidiphyllaceae	<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	27-1428	L11673	Olmstead <i>et al.</i> , 92	
Myricales	Myricaceae	<i>Myrica gale</i>	1-1428	X69530	Maggia & Bousquet 94	

Diversité et écologie des plantes actinorhiziennes

par André Moiroud

Ecologie Microbienne, bât. 405, Université Lyon I,
43 boulevard du 11-novembre-1918, F-69622 Villeurbanne Cedex

Résumé. - On compte actuellement environ 260 espèces actinorhiziennes qui se répartissent dans 24 genres eux-mêmes groupés en 8 familles. Ce sont essentiellement des plantes ligneuses, arbres ou arbustes. Espèces pionnières et espèces améliorantes grâce à leurs symbioses fixatrices d'azote et mycorhiziennes, elles constituent souvent le stade initial de diverses séries dynamiques de végétation. On les rencontre pratiquement sous tous les climats, depuis les tropiques jusqu'au cercle polaire arctique. Elles sont cependant plus nombreuses dans les zones tempérées de l'hémisphère Nord.

Summary. - Actinorhizal plants belong to 24 genera within eight plant families. All are perennial dicots and all except one genus are woody trees and shrubs. They are pioneer species able to colonize severely disturbed sites, and are thought to contribute to early succession in these sites by stabilizing the soil and building its nitrogen content. Actinorhizal plant genera are distributed worldwide but they are more numerous and more diverse in temperate regions.

Key words : actinorhizal plants - ecology.

1. HISTORIQUE

Depuis la plus haute Antiquité, l'Homme a su reconnaître, parmi les nombreux végétaux qui l'entouraient, ceux qui pouvaient restaurer rapidement la fertilité des sols épuisés ou stimuler la croissance de ses cultures. En Europe, si en 1613 le poète célébrait déjà « l'ombre grasse de l'aulne qui nourrissait la plante poussant près de lui », ce n'est que beaucoup plus tard, vers 1829, que la présence de structures origi-

nales, les nodules, fut reconnue sur les racines de cette plante (Bond, 1983).

A la fin du 19^{ème} siècle, de telles nodosités avaient aussi été observées sur déjà 12 espèces appartenant aux genres *Alnus*, *Hippophae*, *Myrica*, *Ceanothus* et *Casuarina*.

C'est encore sur l'aulne que fut établie, en 1895, la première corrélation incontestable entre nombre de nodules, vitesse de croissance et teneur en azote des feuilles. Entre 1895 et 1904, cette corrélation fut

aussi établie pour d'autres espèces. Le rôle des nodules racinaires dans le processus de fixation de l'azote atmosphérique était ainsi établi et démontré. A cette époque également fut reconnue la nature filamenteuse de l'endophyte. Il était considéré comme appartenant au groupe des Actinomycètes.

Au cours de la première moitié du 20^{ème} siècle, la liste des espèces fixatrices n'appartenant pas à la famille des Légumineuses, et alors appelées non-Légumineuses fixatrices d'azote, s'enrichit progressivement, surtout d'espèces nord-américaines.

Mais c'est surtout depuis une époque relativement récente, grâce à la mise au point des méthodes de mesure de la fixation par les techniques isotopiques qui permettent de démontrer sans ambiguïté le caractère fixateur des nodosités, que de nouvelles espèces fixatrices ont été découvertes.

Depuis 1978, l'expression « plantes actinorhiziennes », de « actino » = rayon, terme qui caractérise les Actinomycètes, et de « rhiza » = racine, est utilisée en lieu et place des termes non-Légumineuses fixatrices.

Seront donc considérées comme plantes actinorhiziennes, celles portant sur leur système racinaire des structures particulières, appelées actinorhizes, où des cellules végétales hébergent des bactéries filamenteuses appartenant au genre *Frankia*.

2. DIVERSITÉ TAXONOMIQUE

Actuellement de 260 à 280 espèces sont considérées comme actinorhiziennes. Elles appartiennent à 24 genres groupés en 8 familles, elles-mêmes réparties en 8 ordres différents (Tableau 1). Le nombre d'espèces considérées comme actinorhiziennes varie, souvent avec le même auteur (Baker et Schwintzer, 1990 ; Baker et Mullin, 1992). Ces différences sont liées aux incertitudes concernant la systématique de bon nombre de ces plantes et au fait que certaines d'entre elles ont été, à tort, considérées comme fixatrices d'azote.

Considérées dans leur ensemble, les plantes actinorhiziennes constituent un

groupe disparate. Elles ne dériveraient pas d'un ancêtre commun mais appartiendraient à divers phylums, sans lien étroit entre eux. Cette diversité pourrait cependant se montrer moins importante qu'il n'y paraît à première vue. Ainsi, dans des familles telles que les Rosacées et les Rhamnacées, l'essentiel des genres comptant des plantes fixatrices se regroupent dans une seule tribu, respectivement les Dryadées et les Collettiées. Des études récentes (Maggia et Bousquet, 1994) ont aussi montré que dans la famille des Casuarinacées, les genres *Allocasuarina* et *Casuarina* se seraient différenciés à partir d'un même genre, le genre *Ceuthostoma*. Cette étude montre aussi que les Casuarinacées auraient émergées à partir des Bétulacées, elles-mêmes provenant des Myricacées. Pour plus de renseignement, le lecteur est renvoyé à un autre chapitre de cet ouvrage.

Le caractère fixateur n'apparaît ni comme une caractéristique de la famille, ni même du genre. Ainsi chez les Datisacées et plus encore chez les Rosacées et les Rhamnacées, seuls quelques rares genres comptent des plantes actinorhiziennes. Dans certains genres (*Ceanothus*, *Rubus*, *Colletia* ...) seul un petit nombre d'espèces sont fixatrices d'azote.

3. DIVERSITÉ MORPHOLOGIQUE

Les plantes actinorhiziennes sont, à deux exceptions près, des plantes ligneuses. Elles se présentent sous la forme d'arbre, d'arbuste ou d'arbrisseau plus ou moins bas. Certaines espèces, comme *Dryas drummondii* ou *Discaria nana* affectent même des formes prostrées, constituant des « assiettes » ou des « carpettes » appliquées fortement sur la surface du sol. D'autres, comme *Ceanothus prostratus* ont simplement un port rampant. Sous la forme arborescente, les plantes actinorhiziennes peuvent atteindre une taille imposante. C'est le cas de certains *Casuarina* (*sensu lato*) ou de diverses espèces d'aulne. *Casuarina cunninghamiana* par exemple se présente souvent comme un arbre dépassant 35 m de

Tableau 1.- Ordres, familles et genres d'Angiospermes comprenant des plantes actinorhiziennes
 Table 1.- Currently identified actinorhizal orders, families and genera

Ordres	Nombre de familles dans l'ordre	Familles comptant des plantes actinorhiziennes	Genres comptant des plantes actinorhiziennes	Nombre d'espèces actinorhiziennes	Nombre d'espèces dans le genre
Myricales	1	Myricaceae	Myrica Comptonia	28 1	35 1
Fagales	3	Betulaceae	Alnus	47 ?	42-47
Casuarinales	1	Casuarinaceae	Allocauarina Casuarina Gymnostoma Ceuthostoma	54 18 18 2 ?	59 17-18 18 2
Violales	19	Daliscaceae	Datisca	2	2
Rasales	11	Rosaceae	Cercocarpus Chamaebatia Cowania Dryas Purshia	4 1 1 1 2	20 2 5 3 4
Proteales	2	Elaeagnaceae	Elaeagnus Hippophaë Shepherdia	35 ? 2 ? 2	45 3 3
Rhamnales	2	Rhamnaceae	Ceanothus Colletia Discaria Kenthrothamnus Retanilla Talgueña Trevoa	31 4 5 1 2 1 2	55 17 10 2 2 1 6
Sapindales	16	Coriariaceae	Coriaria	16 ?	15

haut. Dans son aire d'origine, les Balkans, *Alnus subcordata* peut dépasser 35 m pour un diamètre de 1 m. Dans l'état de Washington, il n'est pas rare que l'aulne rouge dépasse 25 m et une circonférence supérieure à 4 m (Furrow, 1979).

Parmi les espèces à port d'arbrisseau celles vivant dans les zones semi-désertiques (diverses Rhamnaceae d'Amérique du Sud par exemple) sont pratiquement aphyllées et couvertes d'épines vigoureuses. Leur taille ne dépasse pas, parfois, 50 cm.

Les deux espèces herbacées de plantes actinorhiziennes appartiennent au même genre, le genre *Datisca*. Ces deux espèces ont des aires très disjointes l'une, *D. glomerata*, se rencontre en Californie alors que l'autre, *D. cannabina*, a une aire plus vaste et se rencontre en abondance dans la région Himalayenne du Pakistan.

D. cannabina est une herbacée pérenne, dioïque, dont les pieds femelles peuvent atteindre 1,80 m à maturité. Les pieds mâ-

les, plus grêles ne dépassent pas 1,50 m. Cette espèce était autrefois utilisée car elle contient une substance particulière employée comme colorant (Hafez *et al.*, 1984).

Les deux espèces de *Datisca* présentent également une autre singularité qui les distingue nettement de la plupart des autres plantes actinorhiziennes. En effet, au niveau des actinorhizes, les vésicules différenciées par l'endophyte, ont une orientation centripète à l'intérieur des cellules infectées alors qu'elle est centrifuge chez toutes les autres espèces à l'exception des Corroyères.

4. DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE

Les espèces actinorhiziennes, considérées dans leur ensemble, sont présentes à l'état spontané sur tous les continents (Silvester, 1977 ; Bond, 1983) à l'exception de l'Antarctique. On peut donc rencontrer ce type de plantes fixatrices sous pratiquement

tous les climats, du climat arctique au climat subtropical. Elles sont cependant plus fréquentes dans les zones tempérées froides.

La richesse en plantes actinorhiziennes varie notablement d'un continent à l'autre. Ainsi, le continent américain, avec 19 genres, dont 12 pour la seule Amérique du Nord, apparaît-il comme un des plus riches. A l'opposé, l'Afrique, avec seulement un à deux genres serait parmi les plus pauvres. Les espèces actinorhiziennes indigènes en Europe sont peu nombreuses. On compte en effet dix espèces (Wheeler et Miller, 1990) réparties en six genres (Tableau 2). Le genre *Alnus* comprend le plus d'espèces et occupe l'aire la plus vaste. En France, *A. glutinosa* est l'espèce la plus répandue. On le rencontre essentiellement sous forme de peuplements linéaires le long du réseau hydrographique. Seuls, le département des Landes avec plus d'un million de mètres cubes sur pied et quelques départements de l'Est de la France comptent des peuplements importants en surface. Le volume total sur pied de bois d'aulne glutineux est estimé à 15700000 m³.

L'aire naturelle de certains genres est parfois difficile à délimiter avec certitude. C'est le cas de ceux comptant des plantes utilisées par l'homme dans ses pratiques culturelles et culturelles et qui ont été abon-

damment, et parfois depuis fort longtemps, disséminés hors de leur aire naturelle. Les exemples de telles introductions abondent. Ainsi plusieurs espèces de *Casuarina* (*C. equisetifolia*, *C. cunninghamiana*, *C. glauca*) ont été largement plantés en Asie, en Afrique (Diem et Dommergues, 1990) et même (*C. cunninghamiana*) en Floride et à Nice. Par contre, des essais d'introduction portant sur 19 espèces au total de *Casuarina* dans les Maures et l'Estérel se sont soldés par des échecs (Allemand, 1983). D'autres exemples d'introduction sont fournis par les aulnes. Ainsi *A. rubra*, originaire de la côte ouest des Etats Unis, a été beaucoup planté en Grande-Bretagne et en France par les forestiers. A l'inverse, l'espèce européenne *A. glutinosa* a été largement introduite aux USA et au Canada où elle est devenue parfois subplantée.

L'implantation en Europe de l'aulne rouge ne va pas sans quelques difficultés. En effet, cette espèce ne trouve pas toujours dans les sols où elle est plantée des souches de *Frankia* pleinement compatibles. Les plants infectés avec de telles souches présentent tous les signes d'une forte déficience en azote. Les plants ainsi carencés montrent au bout de quelques années des signes de dépérissement et bon nombre d'entre eux meurent.

Tableau 2.- Les espèces actinorhiziennes européennes et leur distribution générale
Table 2.- Distribution of indigenous actinorhizal species in Europe

Famille	Espèces	Distribution géographique
Coriariacées	<i>Coriaria myrtifolia</i>	France (sud-ouest; sud-est), Espagne, Portugal, Italie
Daticacées	<i>Datisca cannabina</i>	Crète
Myricacées	<i>Myrica gale</i> <i>Myrica faya</i>	France (marais du Sud-Ouest et de l'Ouest), Grande-Bretagne, N-W de l'Europe Portugal
Bétulacées	<i>Alnus glutinosa</i> <i>Alnus incana</i> <i>Alnus cordata</i> <i>Alnus viridis</i> <i>A. viridis</i> var. <i>suaveolens</i>	Toute l'Europe France (Alpes et Alsace); Europe du Nord et de l'Est Corse, Sud de l'Italie Tout l'arc alpin endémique de Corse
Elaeagnacées	<i>Elaeagnus angustifolia</i> <i>Hippophaë rhamnoides</i> s.sp. <i>rhamnoides</i> s.sp. <i>fluvialilis</i>	Sud de l'Europe, Russie Côtes de l'atlantique du Nord de la France à la Scandinavie, Ecosse Alpes françaises, Suisse, Autriche, Italie, Roumanie, Russie

Certaines espèces à caractère ornemental (*Elaeagnus umbellata*, *E. angustifolia* ...) ont aussi été largement répandues et font l'objet d'un commerce actif. Ainsi aux USA seulement, 5 millions de plants d'*E. umbellata* et 1400000 d'*E. angustifolia* ont été produits par les pépinières d'état en 1978.

Une étude plus détaillée de la répartition des plantes actinorhiziennes montre des différences remarquables qui traduisent une diversité manifeste des espèces au sein d'un même genre.

Ainsi les espèces d'aulne, dans leur ensemble, se rencontrent dans l'hémisphère Nord, sous des latitudes comprises entre le 72° et le 30° parallèle et jusqu'au 25° dans l'hémisphère Sud. Au sein de cet ensemble, une espèce arbustive, *A. crispa*, s'étend sur un immense territoire, circumpolaire et continu depuis l'Alaska jusqu'au Kamtchatka, à l'exception de la Scandinavie (où elle est remplacée par *A. incana*). Par contre, l'espèce très proche taxonomiquement et d'écologie comparable, *A. viridis*, a une répartition beaucoup plus restreinte. Elle reste en effet localisée aux Alpes, Carpates et Balkans (Richard, 1967) ; sa sous-espèce (ou variété selon les auteurs), *suaveolens*, est endémique de Corse. *A. maritima* occupe une aire encore plus réduite. Cette espèce n'est représentée que par deux populations disjointes, l'une localisée dans la péninsule du Delaware, l'autre dans la zone centrale de l'Etat d'Oklahoma.

Les corroyères montrent aussi une disjonction d'aire remarquable, témoignant vraisemblablement de leur ancienneté. Les différentes espèces se répartissent entre l'Asie (*Coriaria sinica*, *C. nepalensis*, *C. japonica*), la Nouvelle Zélande (*C. arborescens*, *C. sarmentosa*), l'Amérique centrale et du Sud (*C. ruscifolia*, *C. thymifolia*) et l'Europe du pourtour de la Méditerranée (*C. myrtifolia*).

Cette très vaste répartition des plantes actinorhiziennes peut s'expliquer de deux façons opposées :

- certaines, douées d'une très large amplitude écologique liée sans doute à leur forte variabilité génétique (qui se traduit parfois par la reconnaissance de provenances, sous-espèces ou variétés), peuvent survivre dans des conditions s'éloignant nettement de celles correspondant à l'optimum de l'espèce. Ainsi, pourrait s'expliquer la réussite des implantations d'*A. cordata*, dont l'aire naturelle est nettement méditerranéenne, en forêt de Saou (Drôme) ou à proximité de Nancy ;

- d'autres, d'exigences beaucoup plus strictes, restent confinées, dans chaque zone climatique, à des stations particulières où ces exigences sont satisfaites. Ainsi, *Myrica gale*, présente depuis le cercle polaire jusqu'au sud du Portugal, se rencontre à peu près exclusivement dans les marais, les étangs très acides et les tourbières.

5. DONNÉES ÉCOLOGIQUES GÉNÉRALES

L'écologie de l'ensemble des plantes actinorhiziennes peut se résumer par deux traits essentiels :

- ce sont des plantes pionnières.

- ce sont des plantes que l'on peut qualifier « d'édificatrices », car jouant un rôle très marqué au cours des premiers stades d'évolution de la roche-mère vers un sol véritable.

5. 1. Caractère pionnier

Les plantes actinorhiziennes, grâce à leur association avec *Frankia*, peuvent, au moins au cours des premiers stades de leur croissance, obtenir tout l'azote nécessaire à leur développement de l'azote atmosphérique. En conditions naturelles, elles sont aussi toujours associées avec des champignons mycorhiziens ecto- ou endotrophes (Daft *et al.*, 1985 ; Gardner 1986 ; Gianinazzi-Pearson et Diem, 1982). Parfois, comme chez l'aulne (Hall *et al.*, 1979) ou *C. myrtifolia* (observation personnelle), les deux types peuvent être simultanément présents. Les mycorhizes assurent à la fois une

meilleure nutrition minérale et une meilleure résistance à la sécheresse (Rose et Youngberg, 1981). L'efficacité de la fixation est aussi renforcée (Gardner *et al.*, 1984 ; Isopi *et al.*, 1994).

Ce sont aussi des plantes à caractère héliophile très marqué, qui supportent mal de vivre en sous-étage (Crocker et Major, 1955 ; Tapper, 1993). Lorsqu'elles sont dominées, elles sont généralement assez vite éliminées (Crocker et Major, 1955 ; Dawson 1990).

Ces caractéristiques expliquent le comportement de plantes pionnières de la grande majorité des plantes actinorhiziennes et leur capacité à coloniser les sols les plus ingrats, comme les délaissées torrentielles (Danière *et al.*, 1986), les moraines abandonnées par le retrait des glaciers (Crocker et Major, 1955), les dépôts volcaniques (Silvester, 1977).

Cette capacité a été largement utilisée par l'homme pour réhabiliter de nombreux sols dégradés par les agents naturels ou l'industrie humaine (pour de nombreuses références, voir Wheeler et Miller, 1990 ; Diem et Dommergues, 1990). L'avantage écologique conféré par l'aptitude à fixer l'azote atmosphérique peut parfois être considéré comme un inconvénient par l'Homme. En effet, dans certaines situations - sols nus à proximité de semenciers, destruction du couvert initial par un incendie, reboisement après préparation du sol - le développement des plantes actinorhiziennes peut prendre un caractère explosif, avec des densités de plants de plusieurs milliers à l'hectare (dans les Alpes, nous avons pu dénombrer sur un éboulis torrentiel une densité de 480000 plants/ha). Ces peuplements très denses se montrent particulièrement agressifs du fait de leur croissance rapide et éliminent en peu de temps toutes les autres espèces ligneuses. C'est pourquoi certaines espèces telles que l'aulne rouge ou des ceanothos ont été pendant longtemps considérées comme des mauvaises herbes et combattues à coup d'herbicides.

5. 2. Caractère édificateur

Par apport d'une litière souvent très abondante, atteignant au moins 2 t/ha/an et jusqu'à près de 30 t/ha/an parfois (Silvester, 1977), riche en azote et composés azotés hydrosolubles (Domenach *et al.*, 1994) et rapidement dégradée (Cromack *et al.*, 1979 ; Danière *et al.*, 1986), les espèces actinorhiziennes enrichissent rapidement le sol où elles poussent (Crocker et Major, 1955). Elles initient ainsi et favorisent le développement des processus pédogénétiques. Lorsque les conditions de sol seront devenues plus favorables, d'autres espèces s'installeront. Elles finiront même par éliminer les espèces fixatrices. Les plantes actinorhiziennes constituent donc souvent le stade initial de séries progressives de végétation qui aboutissent, en peu d'années, à un climax forestier. Les exemples de telles séries sont nombreux et sous toutes les latitudes. Ainsi, en Alaska, une dizaine d'années après le retrait de la langue du Glacier Bay, *Dryas drummondii* s'installe sur les dépôts morainiques. Dans des conditions climatiques très sévères, cette espèce est capable de construire, en une quarantaine d'années, des « assiettes circulaires » d'une surface de l'ordre de 30 m² et d'accumuler des quantités de matière organique très importantes (Lawrence *et al.*, 1967). Ce stade à *Dryas* permet l'installation puis le développement de *Populus trichocarpa*. Celui-ci puise l'azote qui lui est nécessaire à partir de la matière organique accumulée par le *Dryas*. Après un certain temps, le couvert de *Populus* est suffisant pour faire périr puis éliminer les derniers pieds de *Dryas*.

Dans les Alpes, nous avons pu suivre une chronoséquence de même type sur délaissées torrentielles très calcaires (pH de 8,4). Sur ce type de matériau et à l'étage montagnard, c'est l'aulne blanc qui s'installe d'emblée et qui domine tous les stades de la séquence (Danière *et al.*, 1986). Très rapidement, un fourré dense se développe, éliminant toutes les autres espèces pionnières.

res, notamment le bouleau, et apportant annuellement au sol l'équivalent de 70 kg d'azote par hectare. En quelques décennies on passe d'un sol nu à une forêt à peu près pure d'aulne blanc de plus de 10 m de hauteur, avec une strate herbacée fermée, développée sur un sol riche en matière organique et à forte activité nitrifiante.

Des séries dynamiques comprenant un stade initial à plantes actinorhiziennes ont aussi été décrites sur des dépôts volcaniques sous climat tropical. Un exemple bien connu est relatif à la recolonisation de l'île de Krakatoa dont la végétation avait été détruite par l'explosion de son volcan, en 1883. Treize ans plus tard, de petits bosquets de *C. equisetifolia* s'étaient déjà développés. En moins de cinquante ans, les conditions permettant la réinstallation de la forêt tropicale humide étaient réunies (Silvester, 1977).

Diverses espèces actinorhiziennes auraient aussi joué un rôle éminent lors de la reconquête des terres abandonnées par le retrait des grands glaciers quaternaires. En Scandinavie, *Hippophae rhamnoides* pourrait être le précurseur de la forêt actuelle (Silvester, 1974). Au Canada, *Shepherdia* aurait probablement joué le même rôle. *H. rhamnoides* était présente dans l'Est de la France, une partie de la Belgique et de l'Allemagne il y a 10 à 12000 ans. Du pollen de cette espèce a aussi été trouvé dans les couches organiques du fond du marais des Echets, à proximité de Lyon.

6. COMPORTEMENT VIS-À-VIS DES PRINCIPAUX FACTEURS DE L'ENVIRONNEMENT

Du fait de leur vaste répartition à la surface du globe, les plantes actinorhiziennes présentent des comportements différents à l'égard des facteurs du milieu.

6. 1. eau du sol

Parmi l'ensemble des plantes actinorhiziennes, l'espèce la plus hygrophile sem-

ble, sans conteste, *Myrica gale*. Cette espèce vient en effet dans les marais et étangs acides avec un système racinaire constamment submergé (Sprent et Scott, 1979). Dans ces milieux asphyxiques, la présence de racines nodulaires, à géotropisme négatif et comportant un aérénchyme très développé (Torrey et Callahan, 1978) apparaît comme une adaptation assurant aux actinorhizes un approvisionnement en oxygène suffisant pour permettre une activité métabolique satisfaisante (Tjepkema, 1978).

Toutes les espèces d'aulne présentent aussi un caractère d'hygrophilie assez marqué. Dans les conditions naturelles, elles se rencontrent principalement le long des cours d'eau, en bordure d'étangs ou de marais, dans les plaines alluviales inondées ou sur les pentes humides des montagnes (Furlow, 1979 ; Richard et Pautou 1982). Parmi les 4 espèces d'aulne que compte la flore française, 2, *A. glutinosa* et *A. viridis* sont franchement hygrophiles alors qu'*A. incana* et *A. cordata* sont plutôt mésohygrophiles. Toutefois, l'habitat marécageux si caractéristique de l'aulne glutineux ne serait pas un optimum primaire (Lhote, 1986). Dans ces milieux asphyxiques, il n'est jamais de belle venue et sa longévité est faible, malgré le développement de nombreuses « racines-échasse » à tissu aérifère bien développé.

L'amplitude écologique de certaines espèces d'aulne vis-à-vis du facteur eau est suffisamment large pour permettre leur introduction dans des stations très différentes de celles correspondant à leur optimum écologique. Ainsi, dans le but de revégétaliser des talus de carrières d'extraction de granulats, nous avons installé, directement sur des alluvions fluvioglaciaires exposées au sud, de jeunes plants d'*A. incana*, *A. cordata* et *A. subcordata*. Sur ces sols secs et filtrants, le taux de reprise a été très satisfaisant et la croissance vigoureuse.

A l'opposé, certaines espèces actinorhiziennes présentent une bonne résistance

à la sécheresse. Diverses espèces de Rosacées, appartenant aux genres *Purshia*, *Cowania* et *Cercocarpus*, colonisent en effet les pentes arides des montagnes et canyons de Californie, Arizona et Nouveau-Mexique. Divers *Cercocarpus* à feuilles persistantes (*C. betuloides*, *C. brevifolius*, *C. traskiae*) et quelques *Ceanothus* (*C. cuneatus*, *C. spinosus*, *C. divaricatus*, *C. soediiatus*) sont même les éléments essentiels du chaparral, équivalent américain du maquis méditerranéen. En Australie, *Allocasuarina decasneana* est aussi une espèce considérée comme particulièrement résistante à la sécheresse (Diem et Dommergues, 1990).

Toutefois les espèces qui présentent la meilleure adaptation à la sécheresse sont représentées par diverses Rhamnacées. Ces plantes qui appartiennent aux genres *Colletia*, *Discaria*, *Kentrothamnus* et *Trevoa*, se présentent sous la forme de buissons plus ou moins bas. Pratiquement aphyllés et couvertes d'épines vigoureuses (Medan et Tortosa, 1976 ; Gauthier *et al.*, 1984), ces plantes sont localisées à l'Amérique du Sud (Bolivie, Chili, Argentine), dans des zones arides, sur substrat rocheux ou sableux. Certaines peuvent encore se rencontrer à des altitudes de 3000 à 4000 mètres.

Toutefois, en conditions de fort stress hydrique, la fixation symbiotique est nulle (Danière *et al.*, 1986). La nodulation est aussi affectée. Ainsi, au cours d'études systématiques portant sur plusieurs espèces actinorhiziennes vivant en zones très arides, Nelson (1983) a constaté qu'un pourcentage élevé de plants ne portaient aucune actinorhize. Pourtant les sols n'étaient pas dépourvus d'inoculum comme le montraient des expériences menées en serre et au cours desquelles les plants étaient régulièrement arrosés (Nelson, 1983).

6. 2. Température

Les plantes actinorhiziennes manifestent à l'égard de ce facteur de milieu aussi des comportements très variés. Certaines espèces telles que *D. drummondii* ou *A. crispa*,

présentes dans des zones situées au-delà du cercle polaire, sont capables de supporter de longues périodes de froids rigoureux. *A. crispa* est présent dans les îles Kouriles et Sakhaline où la température moyenne annuelle est de 3°C. Dans ces régions, son port se modifie, devenant plus trapu ou rampant (Richard, 1967). Dans les Alpes, *A. viridis* occupe l'étage subalpin où il forme souvent des brousses dans la zones de combat. Il peut même atteindre, à l'état de pieds isolés, 2800 m d'altitude. Par contre, ces deux espèces sont difficilement acclimatables dans les zones de plaine à étés chauds, et y survivent difficilement.

Certains aulnes se rencontrent aussi en zones subtropicales ou tropicales. Ainsi, *A. acuminata* descend jusqu'au nord de l'Argentine, à une latitude inférieure à celle du tropique du Cancer (Furlow, 1979). En Asie, *A. nepalensis* et *A. cremastogyne* ont aussi une répartition subtropicale. Il est cependant à noter que toutes ces espèces ne subsistent dans ces zones que si elles peuvent s'élever en altitude [2000 à 2800 m dans les Andes (Furlow, 1979) ; plus de 2000 m dans les régions est du massif de l'Himalaya (Sharma et Ambasht, 1986)]. Ces espèces ne sont pas rustiques sous nos climats. Elles ont en commun avec certaines provenances d'*A. firma* et d'*A. formosana* de continuer à faire de jeunes pousses même lorsque la photopériode et le température baissent à la fin de l'été. Les phénomènes d'aoûtement ne se produisant pas, les jeunes pousses, encore herbacées lorsque surviennent les premiers gels, sont détruites. Au printemps, leur débourrement très précoc les expose aussi aux derniers gels.

Lorsqu'une espèce, comme l'aulne glutineux par exemple occupe une aire suffisamment vaste pour être soumise à des conditions climatiques très différentes, on observe généralement une corrélation entre résistance au froid et latitude d'origine. Ainsi, dans une étude portant sur la résistance au froid de 23 populations d'*A. glutinosa* couvrant à peu près toute l'étendue

de l'aire, De Walk et Steiner (1986) observaient que les températures entraînant des lésions cellulaires importantes étaient de - 30°C à - 34°C pour les populations d'Europe du Sud et de - 39°C à - 43°C pour les populations d'Europe du Nord. Toutefois, pour certaines populations, cette corrélation ne se vérifiait pas, des populations d'Europe du Sud se montrant plus résistantes que celles de latitude plus nordique. Des différences nettes de résistance étaient aussi observables entre individus d'une même population.

Certaines espèces peuvent tolérer des amplitudes thermiques importantes. Par exemple, les plants d'*H. rhamnoides*, poussant sur des marnes noires mises à nu par l'érosion dans les Alpes du Sud, subissent des températures aussi basses que - 20 à - 25°C en hiver et + 30°C en été.

6. 3. Nature de la roche-mère

Les plantes actinorhiziennes s'installant directement sur les sols bruts seront directement soumises aux influences liées à la nature chimique et physique de la roche-mère.

La distinction classique plantes calcicoles-plantes calcifuges s'applique aussi globalement aux plantes fixatrices. Certaines, comme les espèces de *Ceanothus* dans leur ensemble (y compris les cultivars horticoles) préfèrent les sols acides et craignent l'excès de calcaire. L'aune glutineux connaît son meilleur développement sur sol acide et résiste bien sur sols très acides (pH compris entre 3,5 et 4). Sur sols calcaires, il résiste mal à la concurrence des autres espèces et se réfugie dans les dépressions marécageuses (Lhote, 1986).

Les deux espèces de plantes actinorhiziennes les plus plantées aux USA, *E. umbellata* et *E. angustifolia*, ont des exigences complémentaires. Alors qu'*E. umbellata* préfère les sols acides, *E. angustifolia* sera plantée sur sols calcaires, voire alcalins.

Beaucoup d'espèces ne manifestent pas d'exigences très strictes et peuvent s'acco-

moder de sols nettement différents. Ainsi, *C. myrtifolia* peut se rencontrer aussi bien sur les graviers du lit majeur de certaines rivières du sud-est de la France que sur les sables colmatés par des limons très fins et asphyxiques de certaines berges. Lorsqu'une espèce a une aire de répartition très vaste, elle peut coloniser des types de sols opposés. Par exemple, alors que dans les Alpes *A. incana* se rencontre sur les cônes de déjection torrentiels, les sols alluvionnaires à texture grossière et à pH nettement basique (de l'ordre de 8 - 8,4) par suite de la présence d'une forte proportion de carbonate de calcium dans la fraction fine, en Scandinavie, cette même espèce colonise des anciennes tourbières dont le pH est de l'ordre de 3,5 (Smolander *et al.*, 1988).

H. rhamnoides est une plante que l'on rencontre sur des sols aussi radicalement différents que les sables côtiers, soumis aux embruns, sur la façade ouest de l'Europe, et les marnes compactes et éboulis calcaires, dans les Alpes. En fait, cette capacité de se développer sur deux types de sols distincts se feraient grâce à la différenciation de deux sous-espèces.

Quelques espèces actinorhiziennes présentent une bonne résistance à la salinité et se rencontrent sur les côtes, à proximité immédiate de la mer.

Diverses espèces de *Myrica*, telles que *M. cerifera*, *M. heterophylla*, *M. pusilla*, communes près des côtes atlantiques des USA, résistent à des aérosols salés entraînant des dépôts de sels de l'ordre de 3 mg/m²/24h (Tiffney *et al.*, 1979).

E. angustifolia et *E. umbellata* sont aussi plantées en bord de mer pour servir d'écran aux embruns et protéger les cultures. Divers *Casuarina* (*C. equisetifolia*, *C. obesa*, *C. glauca*) sont connus pour leur forte résistance à la salinité et utilisés dans les sols salés (El Lakany et Luard, 1982 ; Ng, 1987). Sur certaines plages du Pacifique, *C. equisetifolia* pousse à proximité immédiate de la mer. En conditions expérimentales, la croissance de jeunes

plants de *C. equisetifolia* était stimulée lorsqu'ils étaient arrosés deux fois par semaine avec des solutions contenant jusqu'à 100 mM de NaCl. Ces jeunes plants survivaient encore lorsque la solution d'arrosage contenait près de 30 g de NaCl par litre (Ng, 1987).

7. COMPORTEMENT VIS-À-VIS DE L'INCENDIE

Bien que des espèces actinorhiziennes soient largement utilisées pour la revégétalisation de terrains dégradés dans des zones soumises à incendie, très peu d'études concernant leur combustibilité ou leur possibilité de régénération ont été réalisées. En région méditerranéenne, *C. myrtifolia* reconstitue rapidement sa partie aérienne détruite par les flammes si la température du sol ne s'est pas trop élevée. Certaines espèces de *Ceanothus* (*C. velutinus* et sa variété *laevigatus*) deviennent très envahissantes après incendie. La germination de leurs semences est très faible tant qu'elles n'ont pas été portées pendant quelques instants à haute température. *Comptonia peregrina* peut aussi devenir très gênante pour d'autres espèces dans les zones récemment incendiées. En Australie, *C. torulosa* est une espèce qui survit dans les zones où les incendies d'origine naturelle sont fréquents (Kellman, 1984). La survie est d'autant meilleure que le temps séparant deux incendies successifs est plus long car elle paraît liée

à la possibilité pour cette espèce de pouvoir reconstituer des réserves carbonées suffisantes (Kellman, 1984).

8. CONCLUSION

Au cours des dernières décennies, les connaissances sur les plantes actinorhiziennes ont certainement plus progressé qu'au cours des 70 années qui ont précédé. Malgré cela, les plantes actinorhiziennes constituent encore un champ d'investigation à la fois original et vaste car les données récemment acquises ont porté essentiellement sur le symbiote microbien et moins sur le partenaire végétal et la symbiose. Ainsi, de nouvelles plantes actinorhiziennes restent sans doute à découvrir. D'autres peuvent aussi être créées par hybridation. Plus fondamentalement, l'ensemble des mécanismes qui lient les deux partenaires et ceux qui régissent le processus de fixation sont encore loin d'être compris.

Néanmoins et dans l'état actuel, les plantes actinorhiziennes, de par leur diversité, leur capacité à se développer sous des climats différents, leur amplitude écologique et les quantités d'azote qu'elles peuvent faire entrer dans les écosystèmes, constituent des « solutions bon marché » à de nombreux problèmes qui se posent à l'homme tant dans le domaine de l'érosion ou la conservation des paysages que celui de la production ligneuse et même agricole.

BIBLIOGRAPHIE

- Allemand P., 1983.- Espèces exotiques utilisables pour la reconstitution du couvert végétal en région méditerranéenne. INRA, 147p.
- Baker D.B. & C. MULLIN, 1992.- Actinorhizal symbioses. In: Biological Nitrogen Fixation. Schwintzer C.R. et al. Chapman et Hall, 7, 259-292.
- Baker D.D. & C.R. Schwintzer, 1990.- Introduction. In: The biology of *Frankia* and Actinorhizal plants. Schwintzer C.R. et al. Academic Press, 1, 1-13.
- Bond G., 1983.- Taxonomy and distribution of non-leguminous nitrogen-fixing systems. In: Biological Nitrogen Fixation in Forest Ecosystems. Wheeler C.T. et al., Martinus Nijhoff, 3, 55-87.
- Crocker R.L. & J. Major, 1955.- Soil development in relation to vegetation and surface age at Glacier Bay, Alaska. *J. Ecol.*, 43, 427-448.
- Cromack K., C. Delwiche & D.H. McNabb, 1979.- Prospects and problems of nitrogen management using symbiotic nitrogen fixers. In: Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests. Gordon J.C. et al., Oregon State University, 210-223.
- Daft M.J., D.M. Clelland & I.C. Gardner, 1985.- Symbiosis with endomycorrhizas and nitrogen-fixing organisms. *Proc. R. Society, Edinburg*, 85, 283-298.
- Danière C., A. Capellano & A. Moiroud, 1986.- Dynamique de l'azote dans un peuplement naturel d'*Alnus incana* (L.) Moench. *Oecol. Plant.*, 7, 165-175.
- Dawson J.O., 1990.- Interactions among actinorhizal and

- associated plants species. In : The Biology of *Frankia* and Actinorhizal Plants. Schwintzer C.R. et al., Academic Press, **15**, 299-316.
- Dewald L.E. & K.C. Steiner, 1986.- Phenology, height increment, and cold tolerance of *Alnus glutinosa* populations in a common environment. *Silvae Genetica*, **35**, 205-211.
- Diem H.G., Y.R. Dommergues, 1990.-Current and potential uses and management of *Casuarinaceae* in the tropics and subtropics. In : The biology of *Frankia* and Actinorhizal Plants. Schwintzer C.M. et al., Academic Press, **16**, 317-342.
- Domenach A. M., A. Moiroud & L. Jocteur-Monrozier, 1994.- Leaf carbon and nitrogen constituents of some actinorhizal trees species. *Soil Biol. Biochem.*, **26**, 649-654.
- Ei-Lakany M.H. & E.J. Luard, 1982.-Comparative salt tolerance of selected *Casuarina* species. *Aust. For. Res.*, **13**, 11-20.
- Furlow J.J., 1979.- The systematic of the American species of *Alnus* (*Betulaceae*). *Rhodora*, vol. **81**, 1-121.
- Furlow J.J., 1979.- The systematic of the American species of *Alnus* (*Betulaceae*). *Rhodora*, **81**, 151-247.
- Gardner I.C., 1986.- Mycorrhizae of actinorhizal plants. *Mircen J.*, **2**, 147-160.
- Gardner I.C., D.M. Clelland & A. Scott, 1984.- Mycorrhizal improvement in non-leguminous nitrogen fixing associations with particular reference to *Hippophae rhamnoides* L. *Plant and Soil*, **78**, 189-199.
- Gauthier D., L. Frionoi, H.G. Diem & Y.R. Dommergues, 1984.- The *Colletia spinosissima*-*Frankia* symbiosis. *Oecol. Plant.*, **5**, 231-239.
- Gianinazzi-Pearson V. & H.G. Diem, 1982.-Endomycorrhizae in the tropics. In : Microbiology of Tropical Soils and Plant Productivity. Dommergues Y.R. et al., Martinus Nijhoff, **8**, 209-251.
- Hafeez F., A.H. Chaudary & A.D.L. Akkermans, 1984.- Physiological studies on N₂-fixing root nodules of *Datisca cannabina* and *Alnus nitida* Endl. from Himalaya region in Pakistan. *Plant and Soil*, **78**, 129-146.
- Hall R.B., H.S. McNabb, C.A. Maynard & T.L. Green 1979.- Toward development of optimal *Alnus glutinosa* symbiosis. *Bot. Gaz.*, **140** (Suppl.), S120-S126.
- Isopi R., E. Lumini, M. Frattagiani, G. Puppi, M. Bosco, F. Favilli & E. Buresti, 1994.- Inoculation of *Alnus cordata* with selected microsymbionts : effects of *Frankia* and *Glomus* sp. on seedlings growth and development. *Symbiosis*, **17**, 237-245.
- Kellman M., 1986.- Fire sensitivity of *Casuarina torulosa* in North Queensland, Australia. *Biotropica*, **18**, 107-110.
- Lawrence D.B., R.E. Schoenike, A. Quispel & G. Bond, 1967.-The role of *Dryas drummondii* in vegetation development following ice recession at Glacier Bay, Alaska, with special reference to its nitrogen fixation by root nodules. *J. Ecol.*, **55**, 793-813.
- Lhote P., 1986.- Aperçu sur l'écologie des aulnes arborescents en France. *IDF-ENGREF-Université de Franche-Comté*, 12p.
- Maggia L. & J. Bousquet, 1994.- Molecular phylogeny of the actinorhizal *Hamamelidaceae* and relationships with host promiscuity towards *Frankia*. *Molecular Ecology*, **3**, 459-467.
- Medan D. & R.D. Tortosa, 1976.- Nodulo radicales en *Discaria* y *Colletia* (*Ramnaceae*). *Bol. Soc. Argen. Bot.*, **18**, 323-336.
- Nelson D., 1983.- Occurrence and nature of actinorhizae on *Cowania stansburiana* and other rosaceae. In : Proceeding - Research and Management of Bitterbush and Cliffrose in Western North America. *USDA, Tech. Report*, 225-239.
- Ng B.H., 1987.- The effects of salinity on growth, nodulation and nitrogen fixation of *Casuarina equisetifolia*. *Plant and Soil*, **103**, 123-124.
- Radwan M.A., A.C. Harrington & J.M. Kraft, 1984.- Litterfall and nutrients returns in red alder stands in western Washington. *Plant and Soil*, **79**, 343-351.
- Richard L., 1967.- L'aire de répartition de l'aulne vert (*Alnus viridis* Chaix). *Doc. Carte Vég. Alpes*, **V**, 81-112.
- Richard L. & G. Pautou, 1982.- Documents pour la Carte de la Végétation de la France. Alpes du Nord et Jura Méridional. CNRS, 316p.
- Rose S.L. & C.F. Younberg, 1981.-Tripartite associations in snowbrush (*Ceanothus velutinus*) : effects of vesicular-arbuscular mycorrhizae on growth, nodulation and nitrogen fixation. *Can. J. Bot.*, **59**, 34-39.
- Sharma E. & R.S. Ambasht, 1986.- Root-nodules age-class transition, production and décomposition in an age sequence of *Alnus nepalensis* plantation stands in the Eastern Himalayas. *J. Appl. Ecology*, **23**, 689-701.
- Silvester W.B., 1974.- Ecological and economic significance of the non-Legume symbioses. In : Proceeding First International Symposium on Nitrogen Fixation. Newton W. E. et al., Washington. State Univ. Press, 489-506.
- Silvester W.B., 1977.- Dinitrogen fixation by plant associations excluding Legumes. In : A Treatise on Dinitrogen Fixation, IV, Agronomy and Ecology. Hardy R.W.F. et al., John Wiley et Sons, **4**, 141-190.
- Smolander A., C. Van Dijk & V. Sundmann, 1988.- Survival of *Frankia* strains introduced into soil. *Plant and Soil*, **106**, 65-72.
- Sprent J.I. & R. Scoyett, 1979.- The nitrogen economy of *Myrica gale* and its possible significance for the afforestation of peat soils. In : Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests. Gordon J.C. et al., Oregon State University, 243-242.
- Tapper R.G., 1993.- The replacement of *Alnus glutinosa* by *Fraxinus excelsior* during succession related to regenerative differences. *Ecography*, **16**, 212-218.
- Tiffney W., D. Eveleigh, J. Barrea & S. Mitchell, 1979.- Evaluation of some nitrogen plants for coastal zone management applications. In : Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests. Gordon J.C. et al., Oregon State Univ., 420-428.
- Tjepkema J., 1978.- The role of oxygen diffusion from the shoot and nodule roots in nitrogen fixation by root nodule of *Myrica gale*. *Can. J. Bot.*, **56**, 1365-1371.
- Torrey J.G. & D. Callaham, 1978.- Determinate development of nodule roots in actinomycete-induced root nodule of *Myrica gale*. *Can. J. Bot.*, **56**, 1357-1364.
- Wheeler C.T. & I.M. Miller, 1990.- Current and potential uses of actinorhizal plants in Europe. In : The Biology of *Frankia* and Actinorhizal Plants. Schwintzer C.R. et al., Academic Presse, **18**, 365-389.

La fixation d'azote chez les plantes actinorhiziennes et ses applications

par Y. R. Dommergues

BFST (ORSTOM-CIRAD-Forêt), 45bis avenue de La-Belle-Gabrielle, F-94736 Nogent-sur-Marne

Résumé. - Les plantes actinorhiziennes (PA) qui possèdent le potentiel fixateur de N₂ le plus élevé appartiennent aux genres *Alnus* et *Casuarina*. Ainsi des plants de *Casuarina equisetifolia* âgés de 2 ans sont capables de fixer jusqu'à 116 kg N₂ ha⁻¹ an⁻¹, ce qui est assez considérable. En fait, la quantité de N₂ fixé réellement est plus faible que le potentiel fixateur de N₂ car elle est limitée par diverses contraintes de nature physique, chimique ou biologique. C'est pourquoi il est nécessaire de mettre au point des stratégies permettant non seulement d'optimiser les potentialités des symbioses entre *Frankia* et les plantes-hôtes, mais aussi de réduire l'impact des facteurs limitants. On a présenté brièvement les stratégies les mieux adaptées. Si l'on sait exploiter convenablement leurs potentialités les PA peuvent être intégrées dans de nombreux systèmes d'aménagement : forêts de production, systèmes agroforestiers, forêts de protection, plantations de réhabilitation et plantations urbaines ou ornementales.

Summary. - The actinorhizal plants (AP) that exhibit the highest N₂-fixing potential belong to two genera : *Alnus* and *Casuarina*. Thus the N₂-fixing potential of 2-year old *Casuarina equisetifolia* is 116 kg N₂ ha⁻¹ an⁻¹, which is fairly high. In fact, the actual amount of N₂ fixed is often lower or much lower than the N₂-fixing potential because it is limited by various physical, chemical and biological constraints. Therefore, it is necessary to develop strategies aiming not only at optimizing the potentialities of « host plants x *Frankia* » symbioses but also at alleviating the impact of limiting factors. Most relevant strategies are briefly described. Provided that their N₂-fixing potential is fully exploited, AP are ideal candidates in many systems of land use : production forestry (especially mixed-tree plantations), agroforestry (such as enriched fallows, alley cropping, intercropping, living fences) protective forestry (especially sand dune stabilisation and windbreaks), reclamation forestry (especially reclamation of eroded, salinized or wasted lands and phytoremediation), urban forestry and amenity plantations.

Key words : *Alnus* - *Casuarina* - N₂-fixing potential - *Frankia* - actinorhizal plants.

INTRODUCTION

Les plantes associées symbiotiquement à l'actinomycète fixateur de N_2 , *Frankia* - que l'on désigne maintenant sous le terme général de plantes actinorhiziennes (PA) - appartiennent à 24 genres répartis dans huit familles, d'où l'impression d'une grande disparité taxonomique. En fait, les récentes analyses moléculaires suggèrent que les PA sont beaucoup plus proches les unes des autres que ne le laissaient supposer les classifications basées essentiellement sur des caractères morphologiques ((Berry, 1994 ; Swensen et Mullin, 1995). Il faut noter que, si toutes les espèces d'un même genre portent des nodules actinorhiziens (par exemple *Alnus*), il existe par contre des genres (par exemple *Ceanothus* ou *Elaeagnus*) dont seulement certaines espèces sont nodulées.

Les PA ne sont pas distribuées uniformément à la surface du globe. S'il en existe de nombreuses espèces en Australie, Asie, Europe, Amérique, le continent Africain et, semble-t-il, Madagascar en sont pratiquement dépourvus à l'exception de plusieurs *Myrica* (Baker et Mullin, 1992) qui n'ont d'ailleurs pas été examinés au point de vue de leur aptitude à former des nodules actinorhiziens (Tableau 1).

Les PA les plus importantes sur le plan pratique (c'est-à-dire capables de produire du bois d'oeuvre ou de feu et d'améliorer, protéger ou réhabiliter les sols) appartiennent au genre *Alnus* et à la famille des Casuarinacées. Sous les tropiques humides ce sont en particulier *Casuarina cunningghamiana*, *C. equisetifolia*, *C. junghuhniana*, *C. oligodon*, *Gymnostoma sumatrana*; dans les régions arides et semi-arides *Casuarina cristata*, *C. decaisneana*, *C. glauca* (irrigué) *C. cunningghamiana* (irrigué), *C. obesa* (irrigué) ; sur les hauts plateaux tropicaux *Alnus jorullensis/acuminata*, *A. nepalensis*, *A. glutinosa*, *Casuarina cunningghamiana*, *C. equisetifolia*, *C. junghuhniana* ; dans les régions méditerranéennes, *Alnus*

glutinosa, *A. subcordata*, *Allocasuarina verticillata*, *Casuarina cunningghamiana*, *C. equisetifolia*, *C. glauca*, et dans les régions tempérées divers *Alnus*, dont *A. cordata*, *A. glutinosa*, *A. incana*, *A. rubra* et *A. viridis*. Dans la présente note, on examinera essentiellement le cas des Casuarinacées les plus importantes et de certains *Alnus* ; on évoquera accessoirement quelques espèces appartenant aux genres *Coriaria*, *Elaeagnus*, *Hippophaë* et *Myrica*.

Bien que nos connaissances sur le rôle des PA, en tant que fixatrices de N_2 , dans les différents écosystèmes soient encore très limitées, nous tenterons de répondre ici aux questions fondamentales suivantes. Quelle est la quantité de N_2 fixé par les PA, puis transféré au sol et aux plantes associées ? Quels sont les systèmes d'aménagement susceptibles d'intégrer les PA avec profit ? Comment accroître l'input de N_2 dans les écosystèmes en y introduisant des PA ? Quelles recommandations peut-on faire pour l'avenir ?

Quantité de N_2 fixé par les PA et transféré au sol et aux plantes associées

Si l'on admet très généralement que les PA contribuent à l'accroissement ou tout au moins au maintien de la fertilité des sols, il est difficile de faire la distinction entre (i) l'effet résultant de l'apport de N provenant de la fixation de N_2 réelle et (ii) les effets bénéfiques que nous désignons ici sous le terme général d'« effets-arbre ». Ces derniers effets, qui concernent de nombreuses espèces ligneuses non-fixatrices de N_2 résultent en particulier du fait que les arbres sont capables de redistribuer les éléments nutritifs dans le profil (en particulier en remontant en surface des éléments lessivés), d'améliorer les propriétés physiques des sols et de les protéger contre l'érosion, de modifier le microclimat, d'éliminer les mauvaises herbes etc. (Prinsley, 1986).

Il est extrêmement difficile d'évaluer ces « effets-arbre » ; par contre, il est maintenant plus facile de se faire une idée assez

Tableau 1.- Distribution des principaux genres de PA (Baker et Mullin, 1992)
Table 1.- Distribution of representative genera of actinorhizal plants

Famille	Genre	Régions d'origine *
Betulaceae	<i>Alnus</i>	NAm, SAm, Eur, NAs, SAs
Casuarinaceae	<i>Allocasuarina</i>	Aus
	<i>Casuarina</i>	Aus
	<i>Gymnostoma</i>	Aus
Coriariaceae	<i>Coriaria</i>	Aus, NAm, S Am, Eur
Datisceae	<i>Datisca</i>	NAm, SAs
Elaeagnaceae	<i>Elaeagnus</i>	NAs, NAm, Eur, SAs
	<i>Hippophaë</i>	Eur, NAs
	<i>Shepherdia</i>	NAm
Myricaceae	<i>Myrica</i>	SAf, NAm, SAm, Aus, SAs, NAs
	<i>Comptonia</i>	NAm
	<i>Adolphia</i> **	NAm
Rhamnaceae	<i>Ceanothus</i>	NAm
	<i>Colletia</i>	SAm
	<i>Cercocarpus</i>	NAm
Rosaceae	<i>Dryas</i>	NAm
	<i>Purshia</i>	NAm

* NAm = Amérique du N, SAm = Amérique du S, Eur = Europe,
Aus = Australie et/ou Océanie, SAf = Afrique du S, NAs = N de
l'Asie, SAs = S de l'Asie.

** Cruz-Cisneros et Valdes, 1990.

précise de la quantité de N_2 réellement fixée grâce au développement des méthodes de mesure de la fixation de N_2 , au champ, telles que la méthode de l'adondance naturelle (voir par exemple Mariotti *et al.*, 1992). Il apparaît essentiel de dissocier les différents processus impliqués et en particulier d'estimer aussi précisément que possible la quantité de N_2 fixé dans chaque situation.

Il ne faut pas confondre le potentiel fixateur de N_2 (PFN) de la fixation de N_2 réelle (FNR). Le PFN correspond à la quantité de N_2 qu'un système donné est susceptible de fixer en l'absence de toute contrainte environnementale. La FNR correspond à la quantité de N_2 réellement fixée réellement au champ.

Le PFN est une valeur idéale dont on peut se rapprocher en cultivant le système fixateur dans les conditions aussi favorables que possible. C'est effectivement ce que l'on a tenté de faire en cultivant *Ca-*

suarina equisetifolia inoculé avec une souche de *Frankia* effective (bonne fixatrice de N_2) dans un sol très pauvre en N disponible, additionné d'une quantité suffisante de P, K et d'oligoéléments, irrigué soigneusement et placé dans de bonnes conditions climatiques. Le PFN ainsi déterminé sur des plants âgés de 2 ans a été d'environ 42,4g N_2 fixé arbre⁻¹ an⁻¹, ce qui correspondrait à 116 kg N_2 fixé ha⁻¹ an⁻¹ pour une plantation de 2 500 arbres ha⁻¹ (Dommergues, 1995). Il est incontestable qu'il s'agit là d'une valeur de PFN élevée pour un système âgé seulement de 2 ans.

Dans le cas des légumineuses, la fixation de N_2 est corrélée positivement avec la biomasse des nodules car ceux-ci sont en général annuels et l'on peut considérer que la totalité de leur biomasse est active ; il en résulte que l'on peut se faire une idée approximative du PFN d'une espèce de légumineuse donnée en se fondant sur la valeur

maximale de la biomasse de nodules observée au champ. Mais cette approche est difficilement applicable aux plantes actinorhiziennes car leurs nodules sont toujours pérennes et, sauf exception, on ne connaît pas la biomasse de la partie active.

En fait, en dehors de *Casuarina equisetifolia* et de quelques *Alnus*, nous ne disposons pas actuellement de suffisamment de données pour classer les PA en fonction de leur PFN.

Un certain nombre d'évaluations relatives à la quantité de N_2 réellement fixée au champ (FNR) ont été publiées au cours des 10 dernières années. Elle ne sont pas toutes fiables. Quelques-unes des plus sûres figurent au Tableau 2, d'où il ressort que la quantité de N_2 fixé par *Casuarina equisetifolia* varie considérablement : la fixation exprimée en fonction de la surface plantée va de 15 à 94 kg N_2 ha⁻¹ an⁻¹ ; la fixation exprimée en fonction de chaque individu va de 6 à 47 g N_2 arbre⁻¹ an⁻¹. La FNR d'*Hippophaë rhamnoides* est aussi très variable. La FNR de *Myrica faya* est inférieure à ce que l'on pouvait attendre car il s'agit d'une PA colonisatrice agressive.

Il est clair que la FNR est presque toujours plus faible, et même parfois beaucoup plus faible que le PFN. En effet, l'expression du PFN est limitée par des contraintes climatiques ou édaphiques, une mauvaise gestion, l'absence ou l'insuffisance d'irrigation ou de fertilisation, ou des attaques de maladies et ennemis divers. D'autres facteurs peuvent affecter la FNR, comme l'âge des PA : la fixation augmente pendant les premières années (voir par exemple le cas d'*Hippophaë* au Tableau 2), puis tend à diminuer après un laps de temps variable (10-20 ans) à la suite de divers processus, dont l'accumulation de N disponible dans le sol.

Tous les sols cultivés sont susceptibles de perdre des éléments nutritifs, non seulement à la suite des exportations par les récoltes mais aussi à cause de l'érosion, du lessivage et, en outre, dans le cas de N, de

la volatilisation et de la dénitrification. Dans les pays tropicaux, ces pertes, qui sont en moyenne comprises entre 20 et 70 kg N ha⁻¹ an⁻¹, doivent être compensées en faisant appel à des techniques culturales appropriées (notamment fertilisation et retour des résidus de récolte) ainsi qu'à la fixation de N_2 . Dans la pratique agronomique courante, les intrants par fixation de N_2 résultent de l'introduction de légumineuses annuelles ou pérennes dans les systèmes culturaux. Les PA sont rarement utilisées dans ce but en dépit du fait que leur rôle dans l'amélioration de la fertilité des sols et de la productivité de certains systèmes sylvopastoraux et agroforestiers soit parfaitement établi ainsi que le montrent les trois exemples suivants.

Au Costa Rica, l'introduction dans les prairies d'*Alnus acuminata* (syn. : *A. jorullensis*) a accru la production fourragère et, par voie de conséquence, la production laitière (Budowski 1957, 1979). Cet accroissement de la production résulterait de l'accroissement de la teneur du sol en N ainsi qu'on l'a observé en Colombie. En effet dans ce pays, on a montré que, sous une plantation âgée de 2 ans (1200 arbres ha⁻¹) d'*Alnus acuminata*, la teneur du sol en N avait augmenté d'environ 279 kg ha⁻¹ par rapport au sol non planté avec cette espèce (Carlson et Dawson, 1985). On ignore si cette amélioration du stock de N du sol résulte seulement de l'apport de N_2 fixé ou également de « l'effet arbre » (dans ce cas particulier, il s'agirait de la remontée des éléments nutritifs, dont N, à partir des horizons profonds et de la réduction des pertes par érosion hydrique et éolienne).

Un autre exemple, solidement établi, de l'aptitude des PA à améliorer le sol est celui de *Casuarina oligodon* sur les hautes terres de Papouasie-Nouvelle Guinée (Thiagalingam, 1983 ; Ataia, 1983 ; Bourke, 1985) et en Irian Jaya (Askin *et al.*, 1990). A partir de 1960, on a introduit avec succès cette espèce de *Casuarina* dans la plupart des jardins de case (home gardens).

Tableau 2.- Ndfa% (pourcentage of N dérivé de la fixation de N₂) et FRN (fixation de N₂ réelle exprimée en kg N₂ fixé ha⁻¹ an⁻¹ and g N₂ fixé arbre⁻¹ an⁻¹) dans des peuplements *Casuarina equisetifolia*, *Myrica faya* et *Hippophaë rhamnoides* (mesures effectuées au champ).

Table 2.- Ndfa% (percentage of plant N derived from N₂ fixation) and ANF (actual nitrogen fixation expressed as kg N₂ fixed ha⁻¹ year⁻¹ and g N₂ fixed tree⁻¹ year⁻¹) in stands of *Casuarina equisetifolia*, *Myrica faya* and *Hippophaë rhamnoides* (field evaluations).

Espèce et pays (*)	Age (ans) (**)	Nombre d'arbres ha ⁻¹	Ndfa%	N ₂ fixé kg ha ⁻¹ an ⁻¹	N ₂ fixé g arb. ⁻¹ an ⁻¹	Méthodes et réfer. (***)
<i>Casuarina equisetifolia</i>						
Sénégal M*	13	2 000		58	29	Bal. (1)
id.	6-38	1 600		75	47	Bal. (2)
Sénégal N*	3	2 500	39	15	6	AN (3)
id.	3	2 500	33	15	6	Dif. (3)
Puerto Rico	2 (M)	10 000	48-55	66-77	7-8	Enr (4)
id.	2 (C)	5 000	64-67	39-62	8-12	Enr. (4)
id.	2 (M)	10 000		94	9	Dif. (4)
id.	2 (C)	5 000		62	12	Dif. (4)
Inde				60-90		ARA (5)
<i>Myrica faya</i>						
Hawaii				18		ARA (6)
<i>Hippophaë rhamnoides</i>						
Angleterre				2-57		¹⁵ N ₂ (7)
Hollande	1-2			2		ARA (8)
	10-15			15		ARA (8)

* Sénégal M: Malika, site près de la mer; Sénégal N: Notto, site distant de la mer.

** (M) monoculture of *C. equisetifolia*; (C) peuplement mélangé de *C. equisetifolia* et *Eucalyptus robusta*.

*** Méthodes de mesure: Bal., bilans; AN, abondance naturelle; Dif., différence; Enr., dilution isotopique après enrichissement du sol en ¹⁵N; Incr., augmentation de la teneur en N du sol; ARA, activité réductrice d'acétylène; ¹⁵N₂, incubation des nodules en présence de ¹⁵N₂. Entre parenthèses références: (1) Dommergues, 1963; (2) Mailly et Margolis (1992); (3) Mariotti *et al.* (1992); (4) Parrota *et al.* (1994); (5) Srivasta et Ambasht (1994); (6) Vitousek *et al.* (1987); (7) Stewart et Pearson (1967); (8) Akkermans, 1971).

Cette pratique a pris une grande extension après les années 70.

Le troisième exemple concerne une expérience conduite au champ en Amérique du Nord par Friedrich et Dawson (1984). Ces auteurs ont comparé la teneur du sol en N dans des parcelles d'une plantation de *Juglans nigra* en mélange ou non avec différentes espèces de plantes fixatrices de

N₂ (*Alnus glutinosa*, *Elaeagnus umbellata*, *Robinia pseudoacacia* et *Lespedeza striata*) et ont trouvé que la teneur en N total exprimée en mg N kg sol⁻¹ (poids sec) de l'horizon 0-30 cm était la plus élevée dans les parcelles des plantations mixtes de *Juglans-Robinia* (1022 j) et *Juglans-Elaeagnus*, (1006 j) et la plus faible dans les parcelles *Juglans-Lespedeza* (995 jk) et

Juglans-Alnus (936 k) ainsi que dans les parcelles témoin (933 k), les valeurs suivies de la même lettre ne différant pas significativement pour $P = 0,05$. Parallèlement, on a observé que *Juglans nigra* était très nettement plus grand lorsqu'il se trouvait en mélange avec *Elaeagnus* que dans les autres parcelles (Tableau 3). L'amélioration de la croissance de *J. nigra* a été attribuée à la fois à l'apport de N par la fixation de N_2 ainsi qu'au contrôle des mauvaises herbes et à un effet d'abri. On a aussi évoqué, dans ce cas, la limitation, due à la présence d'*E. umbellata*, de la propagation des spores de l'antracnose du noyer (Dawson, 1990).

Bien que l'on s'accorde à reconnaître les bienfaits remarquables d'*Alnus acuminata*, de *Casuarina oligodon*, ou d'*Elaeagnus umbellata*, dans les trois exemples que nous venons de donner, on ne connaît pratiquement pas encore la quantité de N_2 fixé qui est transféré au sol et aux plantes non-fixatrices de N_2 associées. Pour faire une telle évaluation, il faut recourir aux méthodes isotopiques comme cela a été fait dans le cas d'une légumineuse pérenne, *Leucaena leucocephala* (van Kessel *et al.*, 1994). Il

est, en outre, indispensable de tenir compte de l'interférence de deux processus que l'on rencontre dans tous les écosystèmes comportant des arbres : redistribution de N dans le pool interne (constitué par la biomasse des arbres) et surtout recyclage de N_2 fixé par les arbres eux-mêmes. En ce qui concerne le recyclage de N, on peut le négliger seulement dans le cas où la décomposition des litières (notamment litières aériennes) est lente ou très lente. Cette absence de recyclage est caractéristique des écosystèmes ouverts (Dommergues, 1995). Dans de tels écosystèmes, il est facile d'évaluer la quantité de N_2 fixé apporté au sol. Un bon exemple est celui des plantations de *Casuarina equisetifolia* établies sur les dunes sableuses du littoral sénégalais dont le sol est très pauvre en N ($N < 0,01\%$) et où la décomposition de la litière est très lente en raison de la sécheresse (en moyenne 300 mm de pluies par an) et de l'absence d'une microfaune tellurique active. Dans ces plantations, l'accumulation de N provenant de la fixation a été estimé à $23 \text{ kg ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ dans un site par Dommergues (1963) et à $75 \text{ kg ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ dans un autre site par Mailly et Margolis (1992).

Tableau 3.- Hauteur moyenne (ht en m), diamètre du tronc à 1,50 m (dbh en cm) et accroissement annuel moyen du dbh de *Juglans nigra* planté en association avec des PA en Illinois* (Dawson, 1990).

Table 3.- Average height (ht in cm), stem diameter at breast height of 1,5 m (dbh in cm) and annual dbh growth rate for *Juglans nigra* interplanted with actinorhizal plants in Illinois*

PA associées	Age, 14 ans		Age, 18 ans		Accroissement annuel moyen du dbh		
					Age		
	ht (m)	dbh (cm)	ht (m)	dbh (cm)	0-14	14-18 (cm an^{-1})	0-18
<i>Elaeagnus</i>	0,0	15	12,2	19	1,1	1,0	1,1
<i>Alnus glut.</i>	7,6	10	10,1	14	0,7	1,1	0,8
Témoin	3,4	4,9	4,9	8	0,4	0,6	0,4

* Vingt-quatre *J. nigra* espacés à 9,8 x 3,7 m avec plantation intercalaire de trois PA de façon à obtenir un espacement global de 2,4 x 3,7 m. Parcelles témoin sans plantation intercalaire.

* Twenty-four *J. nigra* spaced at 9.8 x 3.7 m with three actinorhizal plants between, giving an overall spacing of 2.4 x 3.7 m. Control plots without interplanting in a row.

Il est clair qu'il sera nécessaire de développer les recherches notamment dans les régions tropicales pour (i) quantifier l'apport de N_2 fixé par les PA et son transfert aux plantes non fixatrices de N_2 qui leur sont associées, et (ii) évaluer par différence les « effets- arbre ».

Systèmes d'aménagement dans lesquels les plantes actinorhiziennes sont susceptibles de s'intégrer

Si les PA partagent avec nombre de légumineuses la propriété de fixer N_2 , elles possèdent en outre cinq qualités que l'on trouve plus rarement chez ces dernières.

(i) Les PA peuvent prospérer sur des sols très pauvres ou dégradés à l'extrême (ce n'est pas la cas pour de nombreuses légumineuses comme *Leucaena leucocephala*).

(ii) Un certain nombre de PA tolèrent, parfois très bien, divers éléments polluants. C'est ainsi qu'*Alnus glutinosa* tolère des niveaux relativement élevés de bore, cadmium, zinc et plomb (Wheeler et Miller, 1990). De même qu'*Alnus glutinosa*, *Casuarina glauca* peut constituer un filtre efficace capable d'arrêter les poussières industrielles. C'est pourquoi ces espèces peuvent être considérées comme d'excellents candidats à la phytoremédiation (Salt *et al.*, 1995) des sites pollués.

(iii) Un certain nombre de PA ont une grande faculté d'adaptation à des climats très différents de ceux qui caractérisent leur aire d'origine. C'est ainsi que *Casuarina glauca*, qui est originaire d'une étroite bande côtière au SE de l'Australie où les précipitations sont en moyenne de 500 mm par an, se développe parfaitement aux îles Hawaii avec des précipitations annuelles allant jusqu'à 4000 mm et s'élève jusqu'à une altitude de 900 m ; cette même espèce pousse vigoureusement en Égypte avec des précipitations annuelles inférieures à 50 mm à condition, bien entendu, d'être irriguée (El-Lakany 1990, 1991). *Alnus glutinosa*, qui, lui, est originaire de climats comportant des périodes de froid intense, se plaît

sur les hauts plateaux tropicaux où des froids exceptionnels peuvent faire dépérir d'autres espèces d'*Alnus*. Ce caractère d'adaptabilité, qui est particulièrement précieux, se retrouve chez d'autres PA, et plus spécialement chez *Casuarina cunninghamiana* et *C. junghuhniana*.

(iv) Les PA résistent souvent bien à la plupart des ennemis et maladies qui affectent les espèces légumineuses.

(v) Certaines PA, comme on le verra un peu plus loin, semblent peu sensibles à N combiné.

Notons enfin qu'il est facile de propager les PA soit par semis, soit par multiplication végétative (Tableau 4).

C'est pour les raisons que l'on vient d'énoncer que les PA peuvent être utilisées avec succès dans de nombreux types d'aménagement (Tableau 5) : forêts de production (plus particulièrement forêts mixtes composées de PA et d'espèces non fixatrices de N_2 productrices de bois d'oeuvre) ; agroforesterie [jachères améliorées, cultures en couloirs, cultures associées et clôtures vivantes (Budowski et Russo, 1993)] ; systèmes sylvopastoraux ; forêts de protection (plus particulièrement pour la fixation des dunes, la protection contre le vent et la lutte contre l'érosion) ; plantations de réhabilitation (régénération des sols érodés, salinisés et épuisés, revégétalisation des remblais et déblais miniers et phytoremédiation) ; et foresterie urbaine (plantations ornementales et d'aires récréationnelles notamment dans les zones littorales).

Les exemples de succès abondent. On en a déjà mentionné quelques uns ; il est utile d'en indiquer quelques autres :

- Accroissement de la productivité de *Quercus robur* planté (pour fournir du bois d'oeuvre) sur des remblais d'une mine de lignite à Santa Barbara (Italie) à la suite de l'introduction en mélange d'*Alnus cordata*, cette PA apportant au sol une quantité importante de N assimilable car ses propres besoins en N sont couverts à 80 % par la fixation de N_2 (Buresti *et al.*, 1991).

Tableau 4.- Différents modes possibles de propagation des PA : graines (Gr.), boutures (Bou.), drageons (Dra.), marcottage (Mar.), rejets de souche (Sou.) et micropropagation (Mic.) (d'après MacDicken, 1994 ; Subbarao et Rodriguez-Barrueco, 1995).

Table 4.- Propagation of actinorhizal plants is possible through : seeds (Gr.), cuttings (Bou.), suckers (Dra.), air layering (Mar.), sprouts (Sou.) and micropagation (Mic.).

Espèces de PA	Gr.	Bou.	Dra.	Mar	Sou.	Mic.
<i>Alnus acuminata</i> /jorullensis	•	•				
<i>A. glutinosa</i>	•			•	•	•
<i>A. nepalensis</i>	•					
<i>Allocasuarina verticillata</i>	•		•			•
<i>Casuarina cristata</i>	•		•			
<i>Casuarina cunninghamiana</i>	•	•			•	
<i>Casuarina equisetifolia</i>	•	•	◊	◊		•
<i>Casuarina glauca</i>	•		•		•	•
<i>Casuarina junghuhniana</i>	•	•	•			
<i>Elaeagnus angustifolia</i>	•	◊				•
<i>Gymnostoma papuana</i>	•	•				

• généralement réussie

◊ rarement réussie

Tableau 5.- Systèmes d'aménagement susceptibles d'intégrer des PA : forêts de production (Prd.), systèmes agroforestiers (Agr.), forêts de protection (Prt.), plantations de restauration de terres ruinées ou desites pollués (Rcl.) et plantations urbaines ou ornementales (Urb.).

Table 5.- Management systems possibly involving actinorhizal plants : production forestry (Prd), agroforestry (Agr), protection forestry (Prt.), reclamation plantations (Rcl.), urban and amenity plantations (Urb.).

Espèces de PA	Prd	Agr.	Prt.	Rcl.	Urb.
<i>Alnus acuminata</i>	•	•	•	•	
<i>A. nepalensis</i>	•	•	•		
<i>A. glutinosa</i>	•*		•	•	
<i>Allocasuarina verticillata</i>	•				•
<i>Casuarina cunninghamiana</i>	•				•
<i>C. equisetifolia</i>	•*		•**	•	•
<i>C. glauca</i>	•	•	•**	•	•
<i>C. junghuhniana</i>	•		•	•	•
<i>C. oligodon</i>	•	•			
<i>Elaeagnus angustifolia</i>				•	•
<i>E. umbellata</i>	•*				
<i>Hippophaë rhamnoides</i>	•		•		
<i>Myrica faya</i>			•		

* y compris les plantations mixtes comprenant des arbres non-fixateurs de N₂.

- Réduction du volume des eaux salines de drainage dans la Vallée de San Joaquin Valley (Californie) en les utilisant pour irriguer des plantations de *Casuarina glauca* et *C. cunninghamiana* (Merwin, 1990).

- Reboisement avec *Acacia auriculiformis*, *Paraserianthes* et *Casuarina equisetifolia* de terrains gagnés sur la mer par remblaiement avec des argiles et des sables à Singapour (Lee *et al.*, 1993).

- Revégétalisation par *Casuarina equisetifolia* du site d'une carrière de calcaire corallien et de stériles provenant d'une usine de ciment près de Mombasa, Kenya (Baobab farm) (Baumer *et al.*, 1990).

- Revégétalisation des carrières abandonnées en France, par une légumineuse ligneuse fixatrice de N₂ (*Robinia pseudoacacia*) et de deux PA appartenant aux genres *Alnus* et *Elaeagnus* (A. Moiroud, communication personnelle).

- Protection de cultures et de plantations d'arbres fruitiers par des brise-vent de *Casuarina equisetifolia* en Chine sur près d'un million d'ha (Turnbull, 1983) ou de *Casuarina glauca* en Égypte dans la cadre de la reconquête du désert (El-Lakany, 1983) ainsi que dans plusieurs autres pays dont la Tunisie.

- Fixation des dunes par *Casuarina equisetifolia* dans toutes les régions tropicales et subtropicales, telles que la Chine (Turnbull, 1983), le Sénégal (Andéké-Lingui et Dommergues, 1983), le Vietnam (NRC, 1984) et l'Inde ; dans ce dernier pays, *C. equisetifolia* a été parfois planté en association avec *Anacardium occidentale* (Mullick, 1957).

On trouvera de nombreuses références relatives aux implantations réussies de PA dans les livres ou revues de Midgley *et al.* (1983), NRC (1984), Dawson (1992), Pinyopusarerk et House (1993) et Subbarao et Rodríguez-Barrueco (1995). Nombre d'échecs ont été observés mais rarement publiés. Certains résultent de caractéristiques spécifiques des espèces plantées, telles que la sensibilité de *Casuarina* à certai-

nes maladies ou ennemis (Pinyopusarerk et House, 1993), par exemple sensibilité d'*Hippophaë rhamnoides* aux nématodes (Zoon, 1995) ou faible halotolérance de *Casuarina oligodon* (NRC, 1984). D'autres échecs peuvent être attribués à des erreurs de gestion, cette situation étant assez fréquente dans le cas de la conduite des plantations mixtes (Schlesinger et Williams, 1984). Enfin beaucoup d'échecs résultent du fait que l'on a négligé ou ignoré certaines contraintes chimiques (carences en éléments nutritifs), physiques (sécheresse notamment) ou biologiques (notamment l'absence de souches de *Frankia* compatibles). Ces derniers problèmes seront traités au paragraphe suivant.

Comment accroître pratiquement l'input de N₂ dans les écosystèmes?

Dans le cas des PA la situation est comparable à celle que l'on rencontre chez les légumineuses ligneuses. La FNR est souvent inférieure à celle que l'on peut attendre : des valeurs de l'ordre de 10-20 kg N₂ fixé ha⁻¹ an⁻¹ seulement ne sont pas exceptionnelles, alors que les pertes en N de l'écosystème peuvent être beaucoup plus importantes ainsi qu'on l'a déjà signalé plus haut. C'est pourquoi il est indispensable de concevoir des stratégies efficaces pour accroître l'apport de N₂, ce qui implique non seulement l'élimination ou la réduction des contraintes de l'environnement mais aussi l'établissement de systèmes symbiotiques fixant bien N₂ et capables de tolérer les contraintes qui n'auraient pu être maîtrisées. Les principales contraintes sont les carences en éléments nutritifs, l'acidité ou l'alcalinité, la sécheresse, l'excès d'azote disponible et les ennemis et maladies.

Les deux stratégies possibles sont les suivantes : la première consiste à faire appel à des pratiques culturales appropriées, la deuxième à améliorer les performances du système fixateur.

- Élimination des contraintes du sol par des pratiques culturales appropriées

- Carences en éléments nutritifs et acidité

Les carences en éléments nutritifs sont fréquentes lorsque les plantations ont été établies sur des sols très pauvres : de telles carences ont été montrées dans des reboisements de *Casuarina equisetifolia* au Bénin (Zech et Kaupenjohann, 1990). Ces carences s'observent aussi dans des sols dont les réserves en éléments nutritifs ont été épuisées par des exportations excessives de produits forestiers, y compris des litières comme c'est le cas dans les plantations de *Casuarina* du SE de la Chine (Diem et Dommergues, 1990). Il est alors indispensable de restituer les éléments exportés en apportant des engrais, et plus particulièrement P. L'apport de phosphates naturels, dans le cas des Casuarinaceae notamment, est conseillé étant donné que ces PA exigent une quantité assez importante de Ca et que, probablement comme les légumineuses (Giller et Cadisch, 1995), elles acidifient le sol.

L'acidité limite sévèrement la nodulation car elle affecte le processus d'infection. On propose souvent de chauler (sur toute la surface du sol ou seulement localement) pour relever le pH, ce qui présente en même temps l'avantage d'apporter du Ca et de réduire la toxicité aluminique. Cependant, lorsque le coût du chaulage est trop élevé, il est préférable de tenter de faire appel à des plantes hôtes tolérant l'acidité.

- Sécheresse

Le déficit en eau affecte la fixation de N₂ en agissant sur le métabolisme de la plante hôte, sur l'infection, le développement des nodules et leur fonctionnement, comme cela a été montré chez les Casuarinaceae (Reddell, 1993). Comme les régions semi-arides et arides ne reçoivent pas assez de précipitations pour assurer une fixation de N₂ correcte, il est nécessaire de recourir à l'irrigation. Divers systèmes d'irrigation ont été proposés mais leur rentabilité est parfois incertaine ; c'est pourquoi

on doit faire appel à des dispositifs peu coûteux sur le plan énergétique, comme les dispositifs de récupération des eaux pluviales. L'irrigation temporaire est parfois nécessaire pour assurer un développement des racines suffisant pour atteindre les horizons humides en permanence. Cette dernière pratique a été utilisée pour l'installation de *Casuarina equisetifolia* sur les dunes au Sénégal ou les brise-vent de *C. glauca* en Égypte.

- Pathogènes du sol

La stérilisation des sols de pépinière, en faisant appel à des méthodes simples comme la solarisation, est indispensable pour éliminer ou tout au moins réduire significativement les populations de pathogènes, notamment celles de nématodes.

- Amélioration des performances de systèmes fixateurs

Les deux principaux critères d'amélioration sont une fixation de N₂ élevée (généralement déterminée en chambre de culture ou en serre) et, lorsque les conditions environnementales ne peuvent être modifiées, une tolérance accrue aux contraintes du milieu. En voici des exemples.

- Amélioration du potentiel fixateur de N₂

Il est bien établi que le PFN dépend du génotype de la plante-hôte, de la souche bactérienne symbiotique et de leurs interactions. En sélectionnant chacun des deux partenaires de la symbiose, il est possible d'améliorer les performances du système fixateur de N₂.

L'amélioration des performances symbiotiques (notamment aptitude compétitive et aptitude à fixer N₂) de *Frankia* est obtenue habituellement par la technique de criblage qui permet d'exploiter la variabilité de l'actinomycète. On peut aussi envisager de recourir aux techniques moléculaires mais, en dépit des avancées récentes dans ce domaine, on ne peut s'attendre à des résultats spectaculaires à court terme car les systèmes de transformation de *Frankia* ne sont pas encore au point, d'où le re-

tard par rapport aux rhizobiums et aux streptomycètes (Dawson, 1992 ; Benson et Silvester, 1993).

À l'exception de certaines espèces comme *Ceanothus* sp. (Nelson et Lopez, 1989), les PA font preuve d'une extrême variabilité en ce qui concerne leur PFN. Dans un premier stade, on devrait toujours commencer par cribler les provenances puis les clones en fonction de ce caractère. La sélection clonale est facilitée par le fait que beaucoup de PA se prêtent bien à la multiplication végétative (Tableau 4), notamment à la micropropagation (Duhoux *et al.*, 1993). C'est ainsi qu'un clone très performant de *Casuarina equisetifolia* (clone b) obtenu en criblant un grand nombre de semis en fonction de leur nodulation a été facilement multiplié par bouturage (Sougoufara *et al.*, 1987).

Alors que l'on a fait appel aux méthodes classiques d'amélioration des plantes pour augmenter la croissance des *Casuarina* dans différents sites (El-Lakany, 1983), on n'a pas, jusqu'à présent, utilisé une telle approche pour accroître le PFN des PA (Diem et Dommergues, 1990).

Est-ce que les interactions « plante-hôte x souche bactérienne », qui existent chez certaines légumineuses ligneuses, se retrouvent aussi chez les PA ? Pour répondre à cette question on a effectué l'expérience suivante dont l'objectif était de comparer la quantité de N_2 fixé par neuf combinaisons impliquant trois clones de *Casuarina equisetifolia* et trois souches de *Frankia*. L'analyse de la variance a montré un effet très significatif ($P < 0,01$) des clones et des souches de *Frankia* et un effet moins significatif ($P < 0,05$) de l'interaction « clone de la plante-hôte x souche de *Frankia* » (Sougoufara *et al.*, 1992). Comme, dans cette expérience, ni le classement des clones ni celui des souches n'était affecté par l'interaction « clone de la plante-hôte x souche de *Frankia* », les auteurs ont suggéré que l'identification de la meilleure combinaison « clone de la plante hôte x souche

de *Frankia* » pouvait être effectuée en faisant seulement deux comparaisons : comparaison des clones associés avec une seule souche de *Frankia* et comparaison des souches de *Frankia* associées à un seul clone. Bien entendu, une telle procédure est inapplicable quand il existe une interaction hautement significative entre l'hôte et la souche. Cette situation, qui existe probablement chez les PA, n'a pas encore été signalée.

- Insensibilité à N combiné (ou N disponible pour les végétaux)

Rappelons tout d'abord qu'au champ N combiné est constitué par N nitrique et N ammoniacal, formes sous lesquelles N est disponible pour les végétaux. Les expériences conduites au champ et dans la plupart des laboratoires indiquent que la nodulation et la fixation de N_2 par les PA sont inhibées par l'azote combiné (Huss-Danell, 1990).

Il a cependant été montré qu'un apport de N combiné à petite doses et croissant progressivement pour satisfaire les besoins de la plante stimulait la fixation de N_2 par des semis d'*A. incana* (Ingestad, 1980). En outre des observations au champ montrent que la biomasse des nodules encore actifs dans des plantations âgées d'*Alnus*, *Casuarina* et *Allocasuarina* est assez considérable (plusieurs centaines de $kg\ ha^{-1}$) en dépit de l'accumulation de N disponible, alors que les nodules ont tendance à disparaître dans les peuplements âgés de légumineuses ligneuses. Ces observations pourraient suggérer l'hypothèse que les PA citées ci-dessus seraient beaucoup moins sensibles à N combiné que la plupart des légumineuses ligneuses.

Lorsque le sol renferme des quantités élevées de N disponible, il serait toutefois utile de disposer de PA insensibles à cette forme de N. On pourrait obtenir de telles plantes par criblage d'individus en fonction de l'aptitude à noduler en présence de N combiné ou en fonction de l'aptitude à former des nodules aériens. Cette deuxième

propriété a déjà été signalée chez deux espèces de *Casuarina* (*C. cunninghamiana* et *C. glauca*). Son intérêt résiderait dans le fait que la nodulation aérienne conférerait à la plante-hôte une certaine indépendance vis-à-vis des contraintes du sol et en particulier vis-à-vis de l'excès de N combiné (Prin *et al.*, 1991).

La réduction de la nodulation et de la fixation de N₂ consécutive à l'accumulation de N avec l'âge du peuplement pourrait aussi s'expliquer par des modifications de l'équilibre des microfaunes et microflores telluriques. On sait que, sous les formations d'*Hippophaë rhamnoides*, le nombre de nodules m⁻² diminue fortement avec l'âge des plantes (Stewart et Pearson, 1967; Akkermans, 1971). Il semble que cette réduction du nombre de nodules d'*H. rhamnoides* doive être attribuée à la prolifération de nématodes parasites à la suite de l'augmentation de la teneur du sol en N disponible, de l'amélioration de la qualité des tissus végétaux servant de nourriture aux nématodes (augmentation de la teneur en protéines) et aussi d'interactions éventuelles entre les nématodes et les champignons de la pourriture des racines (Zoon, 1995).

- Tolérance à l'acidité ou à l'alcalinité

Comme de nombreuses légumineuses, les PA présentent probablement des variations inter- et intra-spécifiques de leur tolérance à l'acidité et à l'alcalinité. Il serait, certes, intéressant de les sélectionner en fonction de ce caractère.

- Tolérance à la salinité

On a utilisé *Casuarina glauca* et, à un degré moindre, *C. equisetifolia* pour reboiser des zones affectées par le sel. La tolérance de ces espèces a pu être renforcée par sélection de la plante hôte (par exemple par criblage de provenances). Le rôle du *Frankia* associé semble négligeable: c'est ainsi que la souche Thr, peu tolérante au sel *in vitro*, s'est montrée meilleure fixatrice de N₂ que les autres souches, plus tolérantes au sel *in vitro*, lorsqu'elle a été associée à une provenance de *C. glauca* hautement tolérante au sel (Girgis *et al.*, 1992).

- Tolérance à la sécheresse

Un certain nombre de PA sont résistantes à la sécheresse comme *Allocasuarina decaisneana*, *A. campestris*, *A. dielsiana*, *Casuarina obesa* et *C. cristata* ssp. *pauper* (Reddell *et al.*, 1991) ainsi que de nombreuses *Rhamnaceae* d'Amérique du Sud. Quelques espèces, comme *Casuarina equisetifolia*, peuvent obtenir l'eau qui leur est nécessaire par absorption au niveau des feuilles de l'eau de condensation des rosées ou d'embruns marins. Les *Alnus* ont de fortes exigences en eau, mais certains, comme *A. cordata*, sont relativement tolérants à la sécheresse; d'autres, comme *Alnus acuminata* sont capables d'utiliser l'eau des brouillards et nuages pendant la saison sèche (Russo, 1994). Les techniques classiques d'amélioration des plantes ont été utilisées avec succès pour renforcer la tolérance à la sécheresse de certains *Casuarina* (El-Lakany, 1983).

- Résistance aux maladies et ravageurs

Bien que les PA aient la réputation d'être résistants aux champignons, bactéries, virus et ravageurs divers, il faut reconnaître qu'ils peuvent parfois en être victimes (Hassan, 1990; Pinyopusarek et House, 1993). Pour résoudre ce problème, les chercheurs utilisent la sélection clonale. Une autre approche, plus élégante, consisterait à introduire des gènes de résistance dans les plantes-hôtes. Il ne s'agit pas là d'une éventualité lointaine, car on dispose déjà de systèmes de transfert chez plusieurs PA, dont des *Casuarinaceae* (Franche *et al.*, 1994) et *Alnus* (Mackay *et al.*, 1988). Un des premiers objectifs sera probablement l'introduction de gènes de résistance aux insectes (Franche *et al.*, 1994; Diouf *et al.*, 1995). On pourrait aussi envisager l'introduction de gènes codant pour la synthèse de composés nématocides.

Inoculation avec des souches sélectionnées de *Frankia* et de champignons mycorhiziens

De même que chez les légumineuses, la nécessité d'inoculer dépend essentiellement à la fois de la spécificité de la plante et de

l'importance de la population native de bactéries symbiotiques compatibles dans le sol.

La distinction entre espèces spécifiques et non spécifiques (*promiscuous* en anglais), bien connue chez les légumineuses, est applicable aux PA. Sont considérées comme non spécifiques (c'est-à-dire capables d'entrer en symbiose avec une large gamme de *Frankia*) les espèces des genres *Myrica* (*Myricaceae*) et, dans une moindre mesure, *Alnus* (*Betulaceae*) et *Gymnostoma* (*Casuarinaceae*). Par contre les genres *Allocasuarina* et *Casuarina* sont spécifiques (Benson et Silvester, 1993 ; Maggia et Bousquet, 1994). On peut s'attendre à une réponse positive à l'inoculation plus souvent avec des PA spécifiques qu'avec des PA qui ne le sont pas.

La densité de la population native de *Frankia* compatibles dans le sol est très variable. Il n'existe pas de règle permettant de la prédire ; c'est pourquoi il faut avoir recours à des méthodes de comptage des unités infectives de *Frankia* comme celles proposées par Arveby *et al.* (1988) ou Dawson *et al.* (1989). Lorsque le nombre d'unités infectives est faible ou nul, la réponse à l'inoculation est spectaculaire à condition qu'il n'existe aucun facteur limitant majeur. Une telle réponse a été observée dans les sols arides ou semi-arides du Sénégal, du Zimbabwe et d'Égypte, qui sont exempts de *Frankia* compatibles avec les *Casuarina*. Par contre, l'inoculation d'*Alnus glutinosa* planté dans des sols hébergeant des *Frankia* compatibles avec des *Alnus* n'affecte pas significativement la croissance de la PA (Tableau 6).

Alors que les inoculums pour légumineuses sont d'usage courant depuis de très nombreuses années, la mise au point d'inoculants pour PA est très récente et leur utilisation en pépinière n'est pas encore passée dans la pratique. Ce retard est imputable aux difficultés de culture en masse de *Frankia*, qui résultent en particulier (i) de la lenteur de la croissance de ce micro-organisme, puisque le temps de génération dans de

bonnes conditions de culture est de 15 h (Schwencke, 1991), (ii) de l'insuffisance de la production de biomasse faible par rapport à l'inoculum (le facteur de multiplication étant seulement de 10 environ) et (iii) de la grande sensibilité de la croissance à la quantité de culture apportée pour ensemer le milieu frais (Frioni *et al.*, 1994), à la composition du milieu et à l'intensité de l'agitation (Benson et Silvester, 1993).

On n'a pas seulement amélioré la culture en masse de *Frankia* (Diem et Dommergues, 1990), on a aussi perfectionné le conditionnement des inoculums en mettant au point des supports polymériques (Diem *et al.*, 1988). La meilleure formulation actuelle est celle qui est obtenue en incluant une culture de *Frankia* riche en sporanges dans des billes d'alginate auxquelles on a incorporé de la kaolinite. Une fois sec à l'air ce type d'inoculum n'est pas seulement facile à transporter; il a aussi une très longue durée de conservation (au moins 2 ans à une température de l'ordre de 23°C). On trouvera un exemple d'utilisation de cet inoculum dans une expérience conduite au champ au Sénégal (Tableau 6).

Dans certains sols la double inoculation avec *Frankia* et des champignons endomycorhiziens (VAM) ou champignons ectomycorhiziens (EM) peut améliorer la nutrition phosphatée et l'absorption par la plante hôte d'autres éléments peu mobiles (par exemple Zn) et ainsi stimuler sa croissance et la fixation de N₂. On a aussi attribué aux champignons mycorhiziens la faculté de faciliter l'approvisionnement en eau des plantes ou de diminuer leur consommation d'eau.

Si l'on commence à disposer d'informations assez précises sur les associations des PA avec les champignons ectomycorhiziens (voir la communication de H.G. Diem), on n'a pas encore de données sur des essais d'inoculation de PA au champ avec ces champignons.

Pratiquement, les inoculums de champignons endomycorhiziens, obtenus par in-

Tableau 6.- Effet de l'inoculation avec des cultures pures de *Frankia* sur la croissance de *Casuarina cunninghamiana* au Zimbabwe (Reddell *et al.* 1988), *Casuarina equisetifolia* au Sénégal (Sougoufara *et al.*, 1989) et *Alnus glutinosa* en France (Prat, 1992).

Table 6.- Effect of inoculation with pure cultures of *Frankia* on the growth of *Casuarina cunninghamiana* in Zimbabwe, *Casuarina equisetifolia* in Senegal and *Alnus glutinosa* in France.

Espèce (provenance ou clone)	Inocula- tion*	Age	Hauteur (m)	Poids (g arb. ⁻¹)	Volume** (m ³ ha ⁻¹)
<i>Casuarina cunninghamiana</i> (Zimbabwe)					
Gympic	Ino.	41 mois			1 11
id.	Non ino.+ N	id.			54
Marceba	Ino.	id.			69
id.	Non ino.+ N	id.			41
Mt Morgan	Ino.	id.			84
d.	Non ino.+ N	id.			59
<i>Casuarina equisetifolia</i> (Sénégal)					
Sénégal	Ino. ***	2 an	3,1	2 846	
id.	Non ino.	id.	2,9	2 025	
id.	Ino.***	id.	5,7	4 607	
id.	Non ino.	id.	5,0	3 291	
<i>Alnus glutinosa</i> (France)					
Najybajom	Ino.	4 an	2,4		
id.	Non ino.	id.	1,8		
clone 11	Ino.	id.	2,0		
id.	Non ino.	id.	1,3		
clone 142-2	Ino.	id.	2,1		
id.	Non ino.	id.	2,0		

* Ino.= inoculé; Non ino. = non inoculé; + N = avec application d'engrais N.

** Volume du bois exprimé en m³ ha⁻¹ calculé en considérant que $V = 1/3 d^2 h$ avec d = diamètre du tronc au niveau du sol et h = hauteur de l'arbre.

** *Inoculation avec *Frankia* inclus dans des billes d'alginate (inoculum conservé 2 ans à la température du laboratoire).

L'effet de l'inoculation a été significatif pour *C. cunninghamiana* (volume) et *C. equisetifolia* (poids mais non hauteur) et non significatif pour *A. glutinosa*.

clusion après fragmentation de racines fortement endomycorhizées dans des billes d'alginate, donnent d'excellents résultats (Ganry *et al.*, 1985).

On peut s'attendre à une réponse positive significative à l'inoculation avec les champignons mycorhiziens seulement dans les sols à la fois carencés (en P notamment) et comportant un nombre des propagules infectieux mycorhiziens faible ou nul, tels que les sols de pépinière désinfectés et les sols désertiques ou arides.

CONCLUSION

Il est possible d'accroître de façon spectaculaire le bénéfice que l'on peut tirer de l'exploitation des PA en adoptant les stratégies suivantes:

(i) Optimisation de la fixation de N₂ au champ en mettant en oeuvre les connaissances techniques dont nous disposons actuellement.

(ii) Introduction de PA déjà appréciées pour leurs performances dans des pays et des écosystèmes dont ils sont actuellement

absents. C'est ainsi que des *Alnus* tropicaux pourraient être plantés en peuplements purs ou mixtes ou dans des prairies sur les Hauts Plateaux Africains ou Malgaches. On a déjà indiqué que *Casuarina oligodon*, améliorerait de façon remarquable les sols dans son aire d'origine ; cette espèce, qui a été implantée avec succès en Ouganda (Peden *et al.*, 1993), pourrait être installée dans d'autres pays y compris certaines régions d'Amérique du Sud. Les plantations actuelles de *Casuarina equisetifolia* et *C. glauca* pourraient facilement être étendues à l'ensemble des zones côtières africaines, de sorte que les populations locales bénéficieraient d'une source importante de combustible, ce qui pourrait enrayer indirectement l'extension de la désertification.

(iii) Domestication d'un certain nombre d'espèces de PA qui, jusqu'à présent, ont

été négligées ou ignorées, comme *Coriaria sinica*, buisson actinorhizien producteur d'une biomasse considérable, utilisé comme source d'engrais vert dans la province de Hunan, Chine (Dommergues, 1987), *Coriaria nepalensis*, candidat potentiel à la revégétalisation et au contrôle de l'érosion dans les zones surpâturées (Akkermans *et al.*, 1985), *Myrica esculenta*, PA poussant en association avec les pins et les chênes dans les forêts de l'Himalaya (G. Lim, communication personnelle), *Myrica faya*, PA utilisable comme sous-bois dans les plantations de pins au Portugal (Bermúdez de Castro, 1977) et d'autres *Myrica* tropicaux (Mercado, 1978).

(iv) Exploitation de l'aptitude exceptionnelle des PA à réhabiliter les terres dévastées et étude leur capacité à phytoremédier les sites pollués.

BIBLIOGRAPHIE

- Akkermans A.D.L., 1971.- Nitrogen fixation and nodulation of *Alnus* and *Hippophae* under natural conditions. Thesis, Univer. Leiden.
- Akkermans A.D.L., A.H. Chaudhary & F. Hafeez, 1985.- Nitrogen fixation in *Frankia* and its importance in forest ecosystems in Pakistan. In : Proc. International Symposium on Nitrogen and the Environment, Jan. 7-12, 1984. Lahore *et al.*, NIAB, Faisalabad, Pakistan, 197-211.
- Andéké-Lingui M.A. & Y. Dommergues, 1983.- Coastal sand dune stabilization in Senegal. In : *Casuarina* ecology management and utilization. Midgley S.J. *et al.*, CSIRO, Melbourne, 158-166.
- Arveby A.S. & K. Huss-Danell, 1988.- Presence and dispersal of infective *Frankia* in peat and meadow soils in Sweden. *Biol. Fertili Soils*, **6**, 39-44.
- Askin D.C., D.J. Boland & K. Pinyopusarek, 1990.- Use of *Casuarina oligodon* subsp. *abbreviata* in agroforestry in the north Baliem Valley, Irian Jaya, Indonesia. In : Advances in *Casuarina* research and utilization. El-Lakany M.H. *et al.*, American University, Cairo, **2**, 13-219.
- Ataia A., 1983.- *Casuarina oligodon* in the Eastern highlands province - Papua New Guinea. In : *Casuarina* ecology management and utilization. Midgley S.J. *et al.*, CSIRO, Melbourne, 80-88.
- Baker D.D. & B.C. Mullin, 1992.- Actinorhizal symbioses. In : *Biological nitrogen fixation*. Stacey G. *et al.*, Chapman and Hall, New York, 259-293.
- Baumer M., I. Darnhofer & S. Guandalino, 1990.- Bab farm ltd ou que faire d'une carrière après exploitation ? *Bois For. Trop.*, **22**, 48-60.
- Benson D.R. & W.B. Silvester 1993.- Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol. Rev.*, **5**, 293-319.
- Bermúdez de Castro F., 1977.- Angiospermas no-leguminosas fijadoras de nitrógeno de la Península Ibérica. *Boletín Estación Ecología*, **6**, 3-17.
- Berry A., 1994.- Recent developments in the actinorhizal symbioses. *Plant and Soil*, **161**, 135-145.
- Bourke R.M., 1985.- Food, coffee and casuarina : an agroforestry system from the Papua New Guinea highlands. *Agrofor. Systems*, **2**, 273-279.
- Budowski G., 1957.- Quelques aspects de la situation forestière au Costa Rica. *Bois For. Trop.*, **55**, 3-8.
- Budowski G., 1979.- Sistemas agroforestales en América tropical. In : Proc. Intern. Symp. Forest Science, San José, Costa Rica, 181-186.
- Budowski G. & R.O. Russo, 1993.- Live fences posts in Costa Rica : a compilation of the farmer's beliefs and technologies. *J. Sustainable Agric.*, **3**, 65-87.
- Buresti E., A.M. Domenach, M. Bosco & A. Moiroud, 1991.- Comparison between *Quercus robur/Alnus cordata* mixed plantation and *Quercus robur* in monoculture. In : Nitrogen Fixation with Non-Legumes. Polsinelli M. *et al.*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 651-652.
- Carlson P.T. & J.O. Dawson, 1985.- Soil nitrogen changes, early growth, and response to soil internal drainage of a plantation of *Alnus jorullensis* in the Colombian highlands. *Turrialba*, **35**, 141-150.

- Cruz-Cisneros R. & M. Valdes, 1990.- Actinorhizal root nodules on *Adolphia infesta*, H.B.K.- Meissner, *Rhamnaceae*. *Nitrogen Fixing Tree Res. Rep.*, **9**, 87-89.
- Dawson J.O., 1990.- Interactions among actinorhizal and associated plant species. In: *The biology of Frankia and actinorhizal plants*. Schwintzer C.R. & J.D. Tjepkema, Academic Press, San Diego, 299-316.
- Dawson J.O., 1992.- Nitrogen fixation in forests and agroforestry. In: *Soil microbial ecology*. Metting Jr. F.J., Marcel Dekker, New York, 227-253.
- Dawson J.O., D. Kowalski & P. Dart, 1989.- Variation with depth and topographic position in the capacity of soils from an Australian locale to nodulate *Casuarina* and *Allocasuarina* spp. *Plant and Soil*, **118**, 1-11.
- Diem H.G. & Y.R. Dommergues 1990.- Current and potential uses and management of Casuarinaceae in the tropics and subtropics. In: *The biology of Frankia and actinorhizal plants*. Schwintzer C.R. & J.D. Tjepkema, Academic Press, San Diego, 316-342.
- Diem H.G., E. Duhoux, P. Simonet & Y.R. Dommergues, 1988.- Actinorhizal symbiosis biotechnology: the present and the future. In: *Proc. Eighth International Biotechnology Symposium*, **2**, 984-995.
- Diouf D., H. Gherbi, Y. Prin, C. Franche, E. Duhoux & D. Bogusz, 1995.- Hairy root nodulation of *Casuarina glauca*: a system for the study of symbiotic gene expression in an actinorhizal tree. *Molec. Plant-Microbe Interact.*, **8**, 532-537.
- Dommergues Y.R., 1963.- Evaluation du taux de fixation de l'azote dans un sol dunaire reboisé en filao (*Casuarina equisetifolia*). *Agrochimica*, **35**, 33-40.
- Dommergues Y.R., 1987.- The role of biological nitrogen fixation in agroforestry. In: *Agroforestry, a decade of development*. Stepler H.A. & P.K.R. Nair ICRAF, Nairobi, 245-271.
- Dommergues Y.R., 1995.- Nitrogen fixation by trees in relation to soil nitrogen economy. *Fertilizer Research* (sous presse).
- Duhoux E., B. Sougoufara & M. Phelep, 1993.- Apport des techniques de culture *in vitro* dans les programmes d'amélioration des arbres fixateurs d'azote. In: *Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides*. Riedacker A. et al., John Libbey Eurotext, Paris, 205-213.
- El-Lakany M.H., 1983.- A review of breeding drought resistant *Casuarina* for shelterbelt establishment in arid regions with special reference to Egypt. *Forest Ecol. Manag.*, **6**, 129-137.
- El-Lakany M.H., 1990.- Provenance trials of *Casuarina glauca* and *C. cunninghamiana* in Egypt. In: *Advances in Casuarina research and utilization*. El-Lakany M.H. et al., American University, Cairo, 12-22.
- El-Lakany M.H., 1991.- *Casuarina glauca*: a hardy tree with many attributes. *NFT Highlights NFTA*, **91-05**, 1-2.
- Franche C., D. Bogusz, Q., Le Van, M. Phelep & E. Duhoux, 1994.- Genetic transformation of trees in the *Casuarinaceae* family. In: *Plant protoplasts and genetic engineering*. Balaj Y.P.S., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 257-274.
- Friedrich J.M. & J.O. Dawson, 1984.- Soil nitrogen concentration and *Juglans nigra* growth in mixed plots with nitrogen-fixing *Alnus*, *Elaeagnus*, *Lespedeza*, and *Robinia* species. *Can. J. For. Res.*, **14**, 864-868.
- Frioni L., C. Le Roux, Y.R. Dommergues & H.G. Diem, 1994.- Inoculant made of encapsulated *Frankia*: assessment of *Frankia* growth within alginate beads. *World J. Microbiol. Biotech.*, **10**, 118-121.
- Ganry F., H.G. Diem, J. Wey & Y.R. Dommergues, 1985.- Inoculation with *Glomus mosseae* improves N₂ fixation by field-grown soybeans. *Biol. Fertil. Soils*, **1**, 15-23.
- Giller K.E. & G. Cadisch, 1995.- Future benefits from biological nitrogen fixation: an ecological approach to agriculture. *Plant and Soil*, **174**, 255-277.
- Girgis M.G.Z., Y.Z. Ishac, H.G. Diem & Y.R. Dommergues, 1992.- Selection of salt tolerant *Casuarina glauca* and *Frankia*. *Acta Oecol.*, **13**, 443-451.
- Hassan F.A., 1990.- Important insect pests of *Casuarina* in Egypt. In: *Advances in Casuarina research and utilization*. El-Lakany M.H. et al., American University, Cairo, 102-109.
- Huss-Danell K., 1990.- The physiology of actinorhizal nodules. In: *The biology of Frankia and actinorhizal plants*. Schwintzer C.R. & J.D. Tjepkema, Academic Press, San Diego, 129-156.
- Ingestad T., 1980.- Growth, nutrition and nitrogen fixation in grey alder at varied rate of nitrogen addition. *Physiol. Plant.*, **50**, 353-364.
- Lee S.K., K.C. Goh & S.O. Yee, 1993.- Afforestation as an interim measure to improve reclaimed lands in Singapore. *Land Degrad. Rehabil.*, **4**, 1-10.
- MacDicken K.G., 1994.- Selection and management of nitrogen-fixing trees. Winrock International, Morrilton, Arkansas and FAO, Bangkok.
- Mackay J., A. Séguin & M. Lalonde, 1988.- Genetic transformation of nine *in vitro* clones of *Alnus* and *Betula* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.*, **7**, 220-232.
- Maggia L. & J. Bousquet, 1994.- Molecular phylogeny of the actinorhizal *Hamamelidaceae* and relationships with host promiscuity towards *Frankia*. *Molecular Ecol.*, **3**, 459-467.
- Mailly D. & H.K. Margolis, 1992.- Forest floor and mineral soil development in *Casuarina equisetifolia* plantations on the coastal sand dunes of Senegal. *Forest Ecol. Manag.*, **55**, 259-278.
- Mariotti A., B. Sougoufara & Y.R. Dommergues, 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.
- Mercado A., 1978.- Nódulos de tres especies de *Myrica* endémicas de Cuba. *Ciencias Biológicas*, **2**, 39-47.
- Merwin M.L., 1990.- Preliminary results of *Casuarina cunninghamiana* and *C. glauca*. In: *Advances in Casuarina research and utilization*. El-Lakany M.H. et al., American University, Cairo, 23-31.
- Midgley S.J., J.W. Turnbull & R.D. Johnston, 1983.- *Casuarina* ecology management and utilization. CSIRO, Melbourne.

- Mullick S.P., 1957.- Coastal plantations and technique of sand fixation on the coasts of Midnapore district. *Indian For.*, **83**, 97-100.
- Nelson D.L. & C.G. Lopez, 1989.- Variation in nitrogen fixation among populations of *Frankia* sp. and *Ceanothus* sp. in actinorhizal association. *Biol. Fert. Soils*, **7**, 269-274.
- NRC (National Research Council), 1984.- *Casuarinas*: nitrogen-fixing trees for adverse sites. National Academy Press, Washington, D.C.
- Parrotta J.A., D.D. Baker & M. Fried, 1994.- Application of ^{15}N enrichment methodologies to estimate nitrogen fixation in *Casuarina equisetifolia*. *Can. J. For. Res.*, **24**, 201-207.
- Peden D., S. Byenkya, N. Wajja-Musukwe & J. Okorio, 1993.- *Alnus acuminata* augmente la production vivrière en Ouganda. *L'agroforesterie aujourd'hui*, Oct-Déc., **5** (4), 5-9.
- Pinyopusarek K. & A.P.N. House, 1993.- *Casuarina*, an annotated bibliography of *C. equisetifolia*, *C. junghuhiana* and *C. oligodon*. ICRAF, Nairobi.
- Prat D., 1992.- Effect of inoculation with *Frankia* on the growth of *Alnus* in the field. *Acta Oecol.*, **13**, 463-467.
- Prin Y., E. Duhoux, H. G. Diem & Y.R. Dommergues, 1991.- Aerial nodules in *Casuarina cunninghamiana*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 871-874.
- Prinsley R.T. & M.J. Swift, 1986.- Amelioration of soils by trees, a review of current concepts and practices. Commonwealth Science Council, London.
- Reddell P., 1993.- Soil constraints to the growth of nitrogen-fixing trees in tropical environments. In: Symbioses in nitrogen-fixing trees. Subbarao N.S. & C. Rodriguez-Barrueco, Oxford, IBH Publishing Co, New Delhi, 65-83.
- Reddell P., P.A. Rosbrook, G.D. Bowen & D. Gwaze, 1988.- Growth responses in *Casuarina cunninghamiana* plantings to inoculation with *Frankia*. *Plant and Soil*, **108**, 79-86.
- Reddell P., H.G. Diem & Y.R. Dommergues, 1991.- Use of actinorhizal plants in arid and semi-arid environments. In: Semiarid lands and deserts. Soil resource and reclamation. Skujins J., Marcel Dekker, New York, 469-485.
- Russo R.O., 1994.- *Alnus acuminata*: valuable timber tree for tropical highlands. *NFT Highlights NFTA*, **94-03**, 1-2.
- Salt D.E., M. Blaylock, N.P.B.A. Kumar, V. Dushenkov, B.D. Ensley, I. Chet. & I. Raskin, 1995.- Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*, **13**, 468-473.
- Schlesinger R.C. & R.D. Williams, 1984.- Growth response of black walnut to interplanted trees. *Forest Ecol. Manag.*, **9**, 235-243.
- Schwencke J., 1991.- Rapid, exponential growth and increased biomass yield of some *Frankia* strains in buffered and stirred mineral medium (BAP) with phosphatidylcholine. *Plant and Soil*, **137**, 37-41.
- Sougoufara B., E. Duhoux, M. Corbasson & Y.R. Dommergues, 1987.- Improvement of nitrogen fixation by *Casuarina equisetifolia* through clonal selection : A research note. *Arid Soil Res. Rehabil.*, **1**, 129-132.
- Sougoufara B., H.G. Diem & Y.R. Dommergues, 1989.- Response of field-grown *Casuarina equisetifolia* to inoculation with *Frankia* strain ORS 021001 entrapped in alginate beads. *Plant and Soil*, **118**, 133-137.
- Sougoufara B., L. Maggia, E. Duhoux & Y.R. Dommergues, 1992.- Nodulation and N_2 fixation in nine *Casuarina* clone-*Frankia* strain combinations. *Acta Oecol.*, **13**, 497-503.
- Srivastata A.K. & R.S. Ambasht, 1994.- Soil moisture control of nitrogen fixation activity in dry tropical *Casuarina* plantation forest. *J. Environ. Manag.*, **42**, 49-54.
- Stewart W.D.P. & M.C. Pearson, 1967.- Nodulation and nitrogen fixation by *Hippophaë rhamnoides* in the field. *Plant and Soil*, **26**, 348-360.
- Subbarao N.S. & C. Rodriguez-Barrueco, 1995.- *Casuarinas*. Oxford & IBH Publishing Co, New Delhi.
- Swensen S.M. & B.C. Mullin, 1995.- The evolution of actinorhizal symbioses : evidence from phylogenetic analysis of *rbcL* genes and morphology. In: Abstracts of the 10th International Conference on *Frankia* and Actinorhizal Plants. Davis, California, August 6-11, 1995.
- Thiagalingam K., 1983.- Role of *Casuarina* in agroforestry. In : *Casuarina* ecology, management and utilization. Midgley S.J. et al. CSIRO, Melbourne, 175-179.
- Turnbull J.W., 1983.- The use of *Casuarina equisetifolia* for protection forests in China. In : *Casuarina* ecology, management and utilization. Midgley S.J. et al. CSIRO, Melbourne, 155-157.
- Van Kessel C., R.E. Farrell, J.P. Roskoski & K.M. Keane, 1994.- Recycling of the naturally occurring ^{15}N in an established stand of *Leucaena leucocephala*. *Soil Biol. Biochem.*, **26**, 757-762.
- Vitousek P.M., L.R. Walker, L.D. Whiteaker, D. Mueller-Dombois & P.A. Matson, 1987.- Biological invasion by *Myrica faya* alters ecosystem development in Hawaii. *Science*, **238**, 802-804.
- Wheeler C.T. & I.M. Miller, 1990.- Current and potential uses of actinorhizal plants in Europe. In : The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. Schwintzer C.R. & J.D. Tjepkema, Academic Press, San Diego, 365-389.
- Zech W. & M. Kaupenjohann, 1990.- Potassium and phosphorus deficiencies of *Casuarina equisetifolia*, *Eucalyptus* sp., *Acacia auriculiformis* and *Tectona grandis* in South Benin, West Africa. *Bois For. Trop.*, **226**, 29-36.
- Zoon F., 1995.- Biotic and abiotic soil factors in the succession of sea buckthorn, *Hippophaë rhamnoides* L., in coastal sand dunes. Thesis, University of Wageningen.

***Pinus cembroides* s. l. y *Pinus johannis* del Altiplano Mexicano : una síntesis**

Angélica Romero Manzanares ⁽¹⁾, Edmundo García Moya ⁽¹⁾ y Marie-Françoise Passini ⁽²⁾

⁽¹⁾ Programa de Botánica, Instituto de Recursos Naturales,
Colegio de Postgraduado, 56230 Chapingo, México

⁽²⁾ Laboratoire de Biologie végétale tropicale, Université Pierre et Marie Curie,
12 rue Cuvier, F-75252 Paris Cedex 05

Resúmen.- Se hace un análisis comparado de la biología de los piñoneros mexicanos *P. cembroides* Zucc. y *P. johannis* M.-F. Robert del Altiplano Mexicano. Se consideran tanto las semejanzas como las diferencias en distribución geográfica y ecológica, así como en respuesta a las restricciones hídricas, al sistema de apareamiento, a las interacciones bióticas y a la química de sus oleoresineras bióticas y a la química de sus oleoresinas. Se enfatiza también, en aquéllos aspectos en los que evidentemente falta enriquecer el conocimiento.

Résumé.- Une analyse comparée de la biologie des pins à graines comestibles du Haut-Plateau mexicain, *Pinus cembroides* Zucc. et *P. johannis* M.-F. Robert est présentée. Les similitudes et les différences dans la distribution géographique et écologique sont précisées ainsi que la réponse aux faibles précipitations, la phénologie, les interactions biotiques et la chimie de leurs oléorésines. Divers autres aspects dont la connaissance serait utile à la compréhension des liens probables entre les deux espèces sont abordés.

Summary.- A comparative analysis of the biology of the Mexican pinyon pines *Pinus cembroides* Zucc. and *Pinus johannis* M.-F. Robert in the Mexican Plateau is carried out. Similarities and differences in geographical and ecological distribution as a result of moisture limitations, mating systems, biotic interactions and chemistry of the oleoresins are emphasized, as well as other aspects which should deserve consideration to enhance the understanding of these taxa.

Key words : pinyon pines - Mexico - biology.

INTRODUCCIÓN

Los piñoneros de la subsección *Cembroides* Engelm., son un grupo monofilético según la segregación presentada por Zavarín (1987), pero parafilético según Malusa (1992). Este autor los llama « piñoneros verdaderos » y los caracteriza por liberación tardía de polen, conos pequeños, y resinosos. El grupo parafilético en el que incluye a *Pinus cembroides* Zucc., está caracterizado por una tendencia a reducir el número de acículas de 4 a 1 y tiene estomas dorsales. El grupo de *P. johannis* (Passini, 1994) tiene conos resinosos, pequeños y liberación tardía de polen de acuerdo con Malusa (*op. cit.*). *P. johannis* es simpátrico o parapátrico a *P. cembroides*. Esta distribución reafirma que *P. cembroides* Zucc. y los segregados del complejo *Cembroides*, entre ellos *P. johannis* M.-F. Robert, conforman parte de un grupo de especies ecológicamente semejantes (Mc Cunne, 1988), identificado como « tolerante a restricciones ». Son pinos de porte bajo, perennidad extrema, semilla grande con almendra rosa en *P. cembroides*, blanca en *P. johannis* (Robert 1978 ; Passini 1982b, 1994), corteza delgada y lento crecimiento.

En el Altiplano Potosino-Zacatecano hemos visto la coexistencia de *P. cembroides s. str.* y *P. johannis*, de manera tal, que resulta interesante saber : 1) cuándo se parecen o se han diferenciado ambas especies en sus caracteres biológicos, tanto vegetativos como reproductivos, 2) cómo han respondido a las interacciones bióticas, 3) cómo se distribuyen macro y microambientalmente, y 4) en qué se han diferenciado químicamente, con base en la composición de sus oleoresinas. Por tal motivo, es el objetivo de ésta aportación bibliográfica y de experiencias propias, hacer un análisis comparado de la biología de los piñoneros *P. cembroides s.l.* y *P. johannis* del Altiplano Mexicano. La hipótesis supone que *P. cembroides s.l.* y *P. johannis* han evolucionado diferencialmente en sus

patrones de historia de vida, lo que ha facilitado su coexistencia en el área de simpatria del Altiplano Potosino-Zacatecano.

1. DISTRIBUCIÓN

1.1. Distribución geográfica

La distribución geográfica de *P. cembroides s. str.* y *P. johannis* está precisada en los mapas de Critchfield y Little (1971), de Robert (1978), de Passini (1982, 1983) y de Bailey y Hawksworth (1987). Zavala y Campos (1993) hicieron una ampliación al área de *P. johannis*, con base en el mapa de Bailey *et al.* (1987). La distribución de *P. cembroides s. str.* se restringe a las montañas de baja altura que rodean al altiplano árido de México. Los pinos de ésta especie se localizan desde Arizona, suroeste de Nuevo México, Texas, norte y centro de México, hasta Puebla (Fig. 1). *P. johannis* se extiende al norte de Zacatecas (Robert, 1978), oeste y sureste de Coahuila (García y Passini, 1993), sur de Nuevo León (Perry, 1991), norte y sureste de San Luis Potosí (Passini, 1994). También ha sido citado por sus sinonimias en Arizona, Nuevo México, Sonora, Chihuahua y Durango (Bailey y Hawksworth 1983 ; Zavarín y Snajberk 1986), de manera que, la distribución de *P. johannis* está confinada a las áreas montañosas xero-mesotérmicas de las Sierras Transversas de la porción norte de la Sierra Madre Oriental, el norte de la Sierra Madre Occidental y serranías bajas cercanas a la misma, hasta limitar con el Eje Neovolcánico Transversal. El límite meridional para *P. johannis* ha sido referido en el municipio de Cadereyta, estado de Querétaro (Zavala y Campos, 1993). La disyunción en la distribución de *P. johannis* está determinada geográficamente por intermedio de la Altiplanicie Mexicana (Fig. 2).

1.2. Clima

Ambas especies, *P. cembroides* y *P. johannis* prefieren el clima seco del Altiplano (BS de la clasificación climática de Kop-

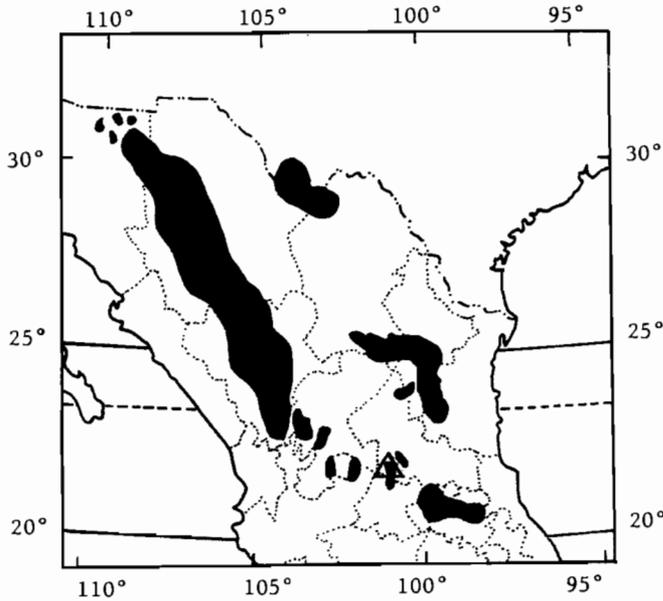


Fig. 1.- Distribución geográfica de *Pinus cembroides* Zucc. con base en Bailey y Hawksworth (1987) y Perry (1991). Área de estudio de La Amapola (Δ).

Fig. 1.- Distribution géographique de *Pinus cembroides* Zucc. d'après Bailey et Hawksworth (1987) et Perry (1991). Aire de La Amapola (Δ).

Fig. 1.- Map of the present distribution of *Pinus cembroides sensu stricto* from Bailey and Hawksworth (1987) and Perry (1991). Area of La Amapola (Δ).

pen). Passini (1982a, 1983) y Malusa (1992) señalan para el área de *P. cembroides*, una temperatura media anual de 12 a 18°C, donde el mes más caliente es junio y el más frío es diciembre o enero, con precipitaciones anuales entre 300 y 700 mm. Passini (*op. cit.*) indica que *P. cembroides* tolera un clima más seco y más cálido en la Sierra Madre Oriental que en la Sierra Madre Occidental. De acuerdo con Passini (1978) y Malusa (1992), *Pinus johannis* se encuentra en el umbral de las áreas con « invierno frío », y para que los pinos produzcan, se dice que debe pasar un invierno nevado y debe haber períodos de sequía moderados para favorecer el amarre de los conos (Flores Díaz, 1989).

1.3. Suelo

En las áreas de yuxtaposición de las especies, como en Concepción del Oro, Za-

catecas, existe una restricción de *P. johannis* a los suelos blancos, calcáreos (de acuerdo con Robert, 1978), mientras que *P. cembroides* puede habitar en suelos derivados de cualquier sustrato, preferentemente en el oscuro de origen ígneo. De acuerdo con Coney (1983) y Malusa (1992), en la Sierra Madre Oriental, hacia el noreste de México, los suelos son predominantemente calizos y de mayor antigüedad (del Cretácico Tardío o Terciario Temprano, ± 65 millones de años) que hacia la Sierra Madre Occidental, donde los suelos son predominantemente de origen ígneo, sustrato preferencial de *P. cembroides*, y más recientes (derivados del vulcanismo del Terciario Medio, ± 26 millones de años). Con respecto a lo observado en las áreas de simpatría de *P. johannis* y *P. cembroides* (particularmente en La Amapola, San Luis Potosí, SLP.), Labarthe *et al.* (1982) clasifican al sustrato como ígneo riolítico San Miguelito que

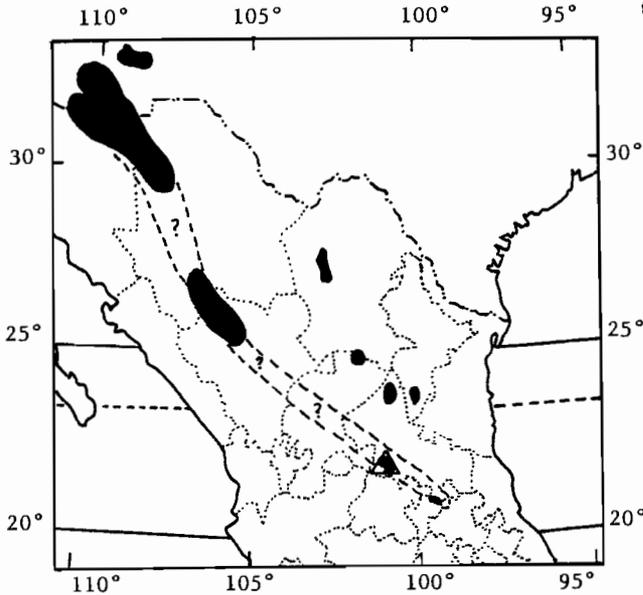


Fig. 2.- Distribución geográfica de *Pinus johannis* M.-F. Robert con base en Robert (1978), Bailey & Hawksworth (1987), Perry (1991), Avila *et al.* (1992), Zavala y Campos (1993). Área de estudio de La Amapola (Δ).

Fig. 2.- Distribution géographique de *Pinus johannis* M.-F. Robert d'après Robert (1978), Bailey et Hawksworth (1987), Perry (1991), Avila *et al.* (1992), Zavala et Campos (1993). Aire d'étude de La Amapola (Δ).

Fig. 2.- Map of the distribution of *Pinus johannis* M.-F. Robert, from Robert (1978), Bailey and Hawksworth (1987), Perry (1991), Avila *et al.* (1992) and Zavala y Campos (1993). Area of La Amapola (Δ).

data del Terciario (Oligoceno 30.0 ± 1.5 . 106 años), ignimbrítico de cantera que es del mismo período, y riolítico Zapote, que es un poco más joven.

1.4. Comunidades vegetales

Los piñoneros mencionados habitan principalmente en los bosques aciculi-esclerófilos del Altiplano. Passini (1982 a) incluye a partir de las variables observadas, las siguientes especies indicadoras en las formaciones de *P. cembroides* de la Sierra Madre Oriental: *Opuntia* spp., *Yucca carnerosana* (Trel.) MchCelvey, *Dichondra argentea* H.B.K., *Bouvardia terniflora* (Cav.) Schl., *Salvia regla* Cav., *Quercus emoryi* Torr., *Notholaena aurea* (Poir.) Desv., y *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. En las formaciones piñoneras a *Pinus nelsonii* Shaw de la misma Sierra, pueden ser indicadoras importantes *Euphorbia antisiphy-*

litica Zucc., *Agave lecheguilla* Torr., *Brahea* spp., *Krameria cytisoides* Cav., *Gochnatia hypoleuca* DC., *Fouquieria splendens* Engelm., *Dasyllirion longissimum* Lem., *Ptelea trifoliata* L., *Mimosa zygophylla* Benth., *Karwinskia humboldtiana* (R. et S.) Zucc. y *Agave atrovirens* Karw. En la Sierra Madre Occidental, las formaciones de *P. cembroides* se destacan junto con *Juniperus deppeana* Steud., *Arctostaphylos pungens* H.B.K. y *Bouteloua curtispindula* (Michx.) Torr., *Yucca carnerosana*, *Rhus virens* Lindl., *Dyssodia setifolia* (Lag.) Robinson, *Bouteloua gracilis*, *Tradescantia crassifolia* Cav., *Monarda citriodora* Cerv., *Chenopodium graveolens* Willd., *Chrysactinia mexicana* A. Gray, *Dichondra argentea* y *Bouvardia ternifolia*. Perry (1991) describe a *P. cembroides* de la Sierra Madre Occidental, asociado con *P. johannis*, *P. chihuahuana* Engelm., *P. engelmannii* Carr.,

Juniperus spp. y *Quercus* spp. ; en la Sierra Madre Oriental lo describe asociado con *P. arizonica* Engelm., *P. nelsonii* Shaw, *P. teocote* Sch. et Cham., *P. pinceana* Gord., *P. remota*, *Juniperus* spp., y *Quercus* spp. *P. johannis* vive yuxtapuesto o en simpatría con *P. cembroides*, *P. arizonica*, *Juniperus deppeana*, y *Quercus* spp. en Nuevo León, *P. cembroides* se asocia con *P. nelsonii*. García y Passini (1993) citan que *P. johannis* habita en la Sierra Madre Oriental, entre los matorrales de *Agave*, *Arctostaphylos*, *Ceanothus*, *Dasylyrion* y *Yucca*.

2. HISTORIA

2.1. Predisposición, dispersión y germinación

La producción de conos depende de que haya asignación de recursos para la reproducción y las condiciones físicas propias para que se inicie el proceso. En San Luis Potosí, uno de los elementos determinantes del desarrollo de los conos es la temperatura (García y Gómez, 1988), de manera que, mientras más bajas son las temperaturas al final del verano (agosto-septiembre), más alta será la producción de conos de *Pinus cembroides*, lo que ha permitido proponer, al igual que lo hizo Robert (1973) en la Sierra de San Miguelito (San Luis Potosí), que en la región conocida como La Amapola, uno de cada ocho años va a presentar una producción copiosa de conos. Con respecto a los elementos climáticos, Zavala y García (1990, 1991) precisaron que el inicio de primordio de cono, que normalmente se da entre agosto y septiembre, depende de las siguientes relaciones : a temperatura de verano menor que la promedio entre años, se logrará un mayor número de primordios, a mayor temperatura que la promedio, mayor velocidad de iniciación del desarrollo, y a menor precipitación entre años que la promedio más lento será el desarrollo. Dentro de las implicaciones demográficas, el principal trueque a la sobrevivencia de las semillas lo repre-

senta la mortalidad, considerablemente disminuida por la depredación. Cibrián (1985) y Flores y Caldera (1985) destacan a *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera) como la causante del 62 % de daño a conos y semillas de *P. cembroides* ; *Dyorictria albovitella* (Lepidoptera) destruye el 32 % de los brotes y conos producidos ; *Contarina* sp.(Diptera), *Conophthorus cembroides* (Coleoptera) y *Eucosma bobana* (Lepidoptera) dañan a los conos en menor proporción. Los mismos insectos han sido citados para *P. nelsonii* (Sánchez *et al.*, 1989). Flores y López (1989) encontraron que *Conophthorus* influye negativamente hasta en el 92 % de la producción de semilla, lo que resulta en un problema comercial severo ; en tanto, Flores y Díaz (1991) consignaron 89 % de mortalidad en conos de *P. johannis* y 66 % en los de *P. cembroides* de Saltillo, Coah., debido a *Conophthorus* y *Eucosma*. La dispersión implica riesgos de mortalidad por efectos de la depredación (costo) contra una mejora en la distribución espacial y la probabilidad de sobrevivencia (beneficio). Tal movimiento espacio-temporal implica interacciones del tipo semilla-dispersor-depredador, que en el caso de la relación aves-piñoneros se interpreta como una interacción mutualista. Martínez *et al.* (1989) mencionan algunas especies de roedores que consumen piñón en La Amapola, SLP, tanto de *P. cembroides* como de *P. johannis*, y cuya forma de acarreo, almacenamiento y rompimiento de la testa, puede resultar, si no es consumida la almendra, en una situación ventajosa para favorecer la regeneración natural del bosque. Estas especies de roedores son : *Peromyscus difficilis* J. A. Allen, *Peromyscus maniculatus* Osgood, *Neotoma mexicana* Goldman, *Sciurus oculatus* Peters, y *Spermophilus variegatus* Bennett ; también se han citado aves como los córvidos o pájaros azules *Aphelocoma coerulescens*, *A. ultramarina*, los cuervos negros *Corvus corax* y *C. cryptoleucus*, y colúmbidos como *Piranga flava*, *Zenaida asiatica* y *Z.*

macroura. Cetina *et al.* (1988) evaluaron experimentalmente el consumo de semilla de *P. cembroides* por los diversos depredadores (roedores, aves, insectos, cabras y el hombre), y aseguran que entre todos, aprovechan el 95 % de la producción anual en tan solo 15 días. La cíclica productividad de semilla y la alta mortalidad de la fracción sobreviviente de semillas, limitan la repoblación del bosque.

2.2. Etapa de establecimiento

Se trata del inicio del esporofito hasta lograr autotrofia. Esta etapa es la de mayor riesgo de mortalidad; los mecanismos implícitos en esta etapa, son aquéllos relacionados con la reacción diferencial para responder al ambiente físico-biótico y a la competencia para favorecer el establecimiento, responder al parasitismo, a las relaciones mutualistas, simbióticas, etc. Con respecto a la viabilidad de las semillas basada en pruebas radiográficas Martínez *et al.* (1987) consignan que no hay diferencia por el color de la testa en *P. cembroides*, pero sí hay diferencia significativa en la calidad de la semilla con base en el color de la testa para *P. johannis*; de acuerdo con ésta afirmación, semillas « oscuras » (negras) y « claras » (caliandro) tienen 99 % de viabilidad, mientras que semillas « moteadas » (huapaxtle) son tan solo 36.5 % viables; además, las semillas claras son las que presentan mayor potencial germinativo (84 %), le siguen las oscuras (79 %), y luego las moteadas (35 %). En cuanto al ambiente, Cetina y Sánchez (1989) y Cetina *et al.* (1991), han establecido pruebas de campo para definir los porcentajes de germinación y crecimiento de *Pinus cembroides* en diferentes estados de sombreado del bosque, y lo mismo han hecho Sánchez y Cetina (1989) para *Pinus johannis*. Las conclusiones sobre *P. cembroides* fueron, que la semilla debe tener la mayor cantidad de luz posible para obtener el mejor porcentaje de germinación, y por el contrario, *P. johannis* requiere un sombreado de

entre 70 y 85 % con respecto a la luz plena, para lograr las mejores tasas de germinación; las plántulas de *P. cembroides* crecen mejor a plena luz, y sólo el 20 % de ellas muere cuando la radiación incidente total se reduce hasta un 30 %, en tanto que, las plántulas de *P. johannis* crecen mejor cuando reciben entre 8 y 30 % de luz. Lo anterior significa que, mientras *P. cembroides* responde como una heliófita, *P. johannis* (al menos en San Luis Potosí y Querétaro) lo hace como una esciófita, lo que nuevamente confirma la aseveración de que *P. cembroides* es más resistente a la sequía y más eficiente en el uso del agua que *P. johannis* (Yañez y García 1985; Benavides y García, 1987). Bajo estas circunstancias, *P. cembroides* representa a la especie competitiva y *P. johannis* a la suprimida, que crece subordinada al dosel de *P. cembroides*. No es ésta la situación observada en Concepción del Oro, Zac., donde *P. johannis* está yuxtapuesta a la distribución de *P. cembroides*. En cuanto a las relaciones simbióticas que pueden favorecer el establecimiento de las plántulas, están bien representadas las micorrizas. Rzedowski (1978) y Sánchez (1980), les atribuyen un papel muy importante en la sobrevivencia y el potencial competitivo en los bosques de pino, ya que con frecuencia, estos árboles crecen en suelos deficientes en nitrógeno y fósforo. *Pinus cembroides* de manera experimental, ha respondido favorablemente a la asociación simbiótica con *Pisolithus tinctorius* (ectomicorriza), produciendo un manto fúngico y una red de Hartig (Ferrera y Sáenz, 1987), lo que se interpreta favorable para incrementar los beneficios en las plantaciones, sin embargo, falta conocimiento de campo al respecto.

2.3. Etapa adulta y sus implicaciones

La fenología vegetativa y reproductiva de *Pinus cembroides* s. str., ha sido abordada ampliamente por Zavala *et al.* (1989) y por Zavala y García (1990, 1991). La fenología del brote anual de *P. cembroides* ini-

cia con el alargamiento de las yemas de invierno en abril del año siguiente ($t + 1$) de la formación de la yema (t), hasta el final del crecimiento de los brotes y acículas de verano en octubre. Consideran como elementos importantes, tanto de la estacionalidad como del brote anual, a la temperatura media mensual de la estación de crecimiento, la cual aparece como óptima en alrededor de los 19°C. En lo que respecta a la iniciación de los conos femeninos de *Pinus cembroides*, ocurre de mediados de agosto a fines de septiembre o principios de octubre, en coincidencia con el aumento de la precipitación y la disminución de la temperatura con respecto al promedio en 11 años. Más detalle sobre el desarrollo de los conos femeninos y masculinos se presenta por Pinel (1985) y Passini (1991, 1996), con particular referencia a *Pinus lagunae* (Passini 1987) y otras especies de la subsección *Cembroides*. Las fenofases de los conos megasporangióidos en *P. cembroides*, *P. edulis* y *P. monophylla* son coincidentes en el suroeste estadounidense y el México adyacente, de acuerdo con las descripciones de Lanner (1972). La diferencia en tiempo para la polinización de *Pinus cembroides* s. str. y *P. johannis* en San Luis Potosí, fué referida de 15 días (Avila, 1985), pero observamos en 1995, que fué de 30 días. *P. johannis* es más tardío, no obstante, el periodo de traslapo durante la polinización ocurre a mediados de junio, cuando está en su máxima proporción de antesis *Pinus cembroides* e inicia el período para *P. johannis*. Passini (1993) ha consignado bajo reserva, dos posibles períodos de polinización en los *Pinus johannis* de Concepción del Oro, Zac.

Las especies estudiadas muestran una diferencia en la expresión sexual. *Pinus cembroides* es invariablemente monoico, mientras que *P. johannis* es dioico, y, en menor cuantía, presenta individuos monoicos dentro de una misma población. Whitham y Mopper (1985), Floyd y Kohler (1990), han documentado que el parasitismo

es el responsable de la pérdida de la función femenina y de la fuerte representación de la función masculina en *P. edulis*, por lo que tal interacción ha sido la presión de selección que ha conducido a la dioecia. Lo mismo han referido Bailey y Hawksworth (1987) para *P. johannis* del sureste de Arizona. El efecto entre parasitismo y sexualidad, o ésta con la edad, restricciones ambientales y perturbación, no ha sido considerada en los piñoneros de las Serranías Meridionales de San Luis Potosí. Se sabe que *P. johannis* femenino de La Amapola, SLP, con acículas de tamaño más grande (4.3 ± 0.7 cm) que el masculino (3.9 ± 0.5 cm), está reflejando en cierta forma, la tendencia en el aumento del tamaño en respuesta a circunstancias ambientales más favorables que las presentes para el sexo masculino. No obstante, los recuentos en la proporción de sexos hechas por Avila (1985), Zavala *et al.* (1987), y García *et al.* (1987) para *P. johannis* de San Luis Potosí, y de Zavala y Campos (1993) para las poblaciones de Querétaro, no precisan diferenciación topográfica alguna, de regionalización, etc., entre sexos, que avale esta hipótesis, por lo que sólo suponen, que influencias microambientales pueden estar afectando la sobrevivencia diferencial de sexos. Lo más prudente es hacer un seguimiento de campo para llegar a explicar los posibles causales y consecuencias de la dioecia de *P. johannis*.

Dejar descendencia implica varios eventos reproductivos y una producción diferencial de propágulos, que en términos de población, explica la forma en que cada especie logra éxito en su permanencia contra el tiempo y los factores físico-bióticos que continuamente le confieren eficiencia biológica. La etapa adulta inicia entonces, con el primer evento reproductivo. En el análisis de la relación altura-diámetro-edad de *Pinus cembroides* de las serranías meridionales de San Luis Potosí, Cetina *et al.* (1985, 1988) encontraron que el tamaño medio de los árboles es de 3.62 ± 1.4 m de

altura, diámetro de 10.54 ± 2.39 cm y edad promedio de 56.9 ± 3 años. En esa región, para *P. johannis* la altura promedio es de 4.15 ± 1.43 m, diámetro de 21.66 ± 12.32 cm y edad promedio de 78.23 ± 19.4 años (Cetina *et al.*, 1989). La conclusión de ellos, de acuerdo con otros autores, es que se trata de un bosque joven tendiente a maduro, ya que los *P. cembroides* tienen su primer evento reproductivo entre los 10 y 20 años, y es hasta los 75 años, cuando manifiestan su máxima producción, extendiendo su período reproductivo hasta varias centurias. Durán (1991) también denominó joven al bosque de piñoneros de La Amapola, SLP, tanto de *P. cembroides* como de *P. johannis*. En La Amapola, SLP, hemos observado, que los valores de productividad en términos de producción de conos comenzaron a aumentar cuando los árboles de ambas especies tenían de 1 a 8 m de altura y de ahí, a mayor tamaño menor productividad; la diferencia entre el primer evento reproductivo de cada especie, es de alrededor de cinco años. *Pinus cembroides* y *Pinus johannis* inician su reproducción entre los 23 y 30 años, respectivamente, logran su máxima productividad entre los 110 y 162 años y son tan longevos como 200 a 220 años. No obstante a que ambas especies tienen semejante patrón reproductivo, *P. johannis* produce más del doble de conos que *P. cembroides* (información inédita), que no necesariamente se refleja en número de semillas con embrión o viables, dado que el piñonero bueno, *P. cembroides*, produce menos conos (± 9.3 por individuo) y más semillas « buenas », viables (8.66 por cono = 84 %), mientras que el piñonero burro o malo, *P. johannis*, produce más conos (± 21.7 por individuo), pero vacíos o con más semillas « malas » (5.89 por cono = 77 %). La aptitud diferencial entre especies, debe ser la fuente de información más próxima para precisar el estado actual y futuro de estas poblaciones, considerando a la vez, las alternativas de aprovechamiento sustentable.

3. ASPECTOS QUÍMICOS

La variación en los caracteres morfológicos de los piñoneros del grupo *cembroides* apoya, junto con la diferenciación de monoterpenoides, la hipótesis de la evolución en grupos separados de las subespecies o variedades *lagunae* (ahora especie *P. lagunae*) y *orizabensis*, de la especie *P. cembroides* (Zavarin y Snajberk, 1985). Tal diferenciación se explica por la separación geográfica y variación en clima que ha persistido desde el Mioceno, tiempo en que se separó la costa de Baja California y se formó la Sierra Madre Occidental. La constitución en monoterpenoides para estas variedades fue descrita por otros autores en la siguiente forma: *P. lagunae* produce monoterpenos de la familia sabineno (thujeno, sabineno, γ -terpineno, terpinoleno y p-cimeno). *P. cembroides* subsp. *orizabensis* produce 3-carenos y α -pineno. *P. cembroides* subsp. *cembroides* produce considerablemente α -pineno. En el informe de Zavarin y Snajberk (1980) se evidenció que *P. cembroides* var. *cembroides* en toda su área de distribución, está compuesto básicamente de α -pineno, y citan a *P. cembroides* var. *bicolor* (= *P. johannis*), de las serranías meridionales de San Luis Potosí, como compuesto básicamente y en orden decreciente, de sabinenos (suma de sabineno, p-cimeno y terpinoleno) y de α -pineno. Esta composición corresponde en parte a la de *P. lagunae* que produce monoterpenos de la familia sabineno y a la de *P. cembroides*, por la presencia en cantidad importante de α -pineno. En otra comparación, Zavarin y Snajberk (1986), indican que la diferencia monoterpénica de *P. johannis* procedente de Nuevo México, Zacatecas y San Luis Potosí, es más fuerte que lo reflejado por la diferenciación morfológica. *P. johannis* de Zacatecas solo presenta en alta proporción α -pineno, por lo tanto, ésta población es más semejante en composición a *P. cembroides*, pero con respecto a ésta especie *sensu stricto*, hay una diferencia significa-

tiva en la proporción del α -pineno (su compuesto principal). Los sabinenos marcan la separación casi excluyente entre *P. johannis* y *P. cembroides*, asimismo, separan claramente a las poblaciones de *P. johannis* de las sierras atravesadas de la Sierra Madre Oriental con respecto a las de la Sierra Madre Occidental.

De acuerdo con Zavarín y Snajberk (1986), *P. johannis* es simpátrico con la subespecie *cembroides*, por lo que se esperaba encontrar híbridos interespecíficos e introgresados. Este pronunciamiento apoyaría lo escrito sobre el carácter introgresivo de la dioecia que se anotará más adelante, sin embargo, Zavarín y Snajberk (1986) también ratificaron lo dicho por Bailey *et al.* (1982), sobre la inexistencia de hibridación e introgresión de *P. cembroides* en *P. johannis* (de particular interés a esta narrativa, en la Sierra de San Miguelito, SLP), dadas las barreras fenológicas entre ambas especies. Asimismo, Zavarín y Snajberk (1986) citan no haber encontrado individuos morfológicamente intermedios entre *P. cembroides* y *P. johannis* en el área de Concepción del Oro, Zac., por lo que concluyen que *P. johannis* no hibridiza naturalmente con la subespecie *cembroides*. Sin embargo, debe considerarse que entre las poblaciones de *P. johannis* del noroeste y centro de México con respecto a las poblaciones del oriente, existen grandes diferencias químicas (sabinenos vs. α -pinenos). Zavarín y Snajberk (1986) observaron que la población de *P. johannis* de La Encantada, N.L., tiene tendencia a parecerse a las poblaciones de *P. johannis* del noroeste de México, por el alto contenido de sabinenos, y que algunas poblaciones de *P. johannis* de la Sierra Madre Occidental, incluyendo a la población de San Miguelito, SLP, y la de Concepción del Oro, Zac. tienen tendencia a la baja proporción en la suma de éstos compuestos. Entre las poblaciones de San Luis Potosí y las de Nuevo León, existe una separación de casi 250 km por lo que dichos autores sospechan, que entre esas po-

blaciones existe una divergencia incompleta. Es importante destacar, que éstos autores concluyeron sobre una variación química y fisonómica que cambia ligeramente con la latitud, por lo que sugieren la existencia de poblaciones ancestrales comunes similares a *P. cembroides* que ocuparon el altiplano mexicano, que luego se movieron hacia el norte durante el Pleistoceno en respuesta a un clima más húmedo y frío, y que, en los « relictos » se dió lugar a la diferenciación de las poblaciones, de acuerdo con las condiciones de las Sierras Madre. Zavarín y Snajberk (1986) han supuesto también, que las poblaciones de *P. johannis* de Zacatecas son las más parecidas a tales ancestros, y que las poblaciones de San Luis Potosí evolucionaron de alguna variante, por un decremento en la cantidad de sabinenos. También piensan que, como entre la síntesis de pinenos y sabinenos sólo hay un paso biosintético, lo más probable es que tal diferencia química sea insignificante como para inducir diferencias morfológicas significativas entre dichas poblaciones. Sobre el carácter introgresivo de la dioecia, Fogg (1962, 1966) citado por Lanner (1975), hizo referencia a la posible hibridación entre *P. cembroides* var. *bicolor* = *P. discolor* = *P. johannis* y *P. edulis*, sin embargo, Lanner (*op.cit.*) piensa en la carencia de evidencias al respecto en ambientes naturales, y niega que la dioecia de *P. johannis* sea un signo de introgresión de *P. edulis* con *P. cembroides* como lo afirmó Hall (en comunicación personal a McCormick y Andresen, en 1963). *P. johannis* antes fue *P. cembroides* var. *bicolor*; y mientras *P. cembroides* es monoico, *P. edulis* es dioico en sus masas puras, de modo que el razonamiento ha sido que la dioecia de *P. johannis* es un carácter heredado de *P. edulis* introgresado en *P. cembroides*. De acuerdo con Zavarín y Snajberk (1986), *P. edulis* difiere de *P. johannis* de San Luis Potosí, en su alto contenido de α -pineno y el bajo porcentaje de la suma de sabinenos; esto dá pie, a que el alto contenido de α -pineno

haga más afín a *P. cembroides* con *P. edulis* y si como se dijo anteriormente, entre el pino y los sabinos solo hay un paso en la biosíntesis, entonces es posible, que *P. johannis* de San Luis Potosí, se haya diferenciado más recientemente, después de una posible cruce entre *P. cembroides* s.l. con *P. edulis* en otros tiempos. Hasta la fecha, se carece de pruebas moleculares para detectar la posible hibridación o introgresión entre estos taxa, para así explicar el cómo se ha venido dando el proceso de especiación.

CONCLUSIONES

De la síntesis aportada a éste estudio, se colige lo siguiente : *P. cembroides* s.l. y *P. johannis* ratifican la hipótesis sobre la evolución diferencial en los patrones de historia de vida, favoreciendo así, su coexistencia en el área de simpatría. Las evidencias son :

1. Un origen común basado en un ancestro semejante a *Pinus cembroides*, del cual, por evolución con respecto a las circunstancias físicas del medio, se segregaron poblaciones que se diferenciaron en tiempo geológico en las Sierras Madre Oriental y Occidental. Esto dió lugar a que las poblaciones de *P. cembroides* s.str. sean diferentes morfológica, ecológica y químicamente con el *P. johannis*, diferenciado posteriormente y segregado de manera disyunta por la intermediación de la Altiplanicie Mexicana.

2. Las historias vitales de *P. cembroides* s.l. y *P. johannis* tienden a ser divergentes, dado que *Pinus cembroides* se adapta a una condición xeromesotérmica más variada con tendencia a restrictiva, lo que le ha fa-

vorecido para ser más eficiente en el uso del agua que *P. johannis*. En consecuencia, ésta especie parece crecer más bien, subordinada a la mejora del microclima propiciado por la especie dominante ; no obstante, su área de distribución implica más superficie de la consignada originalmente, y la química de sus oleoresinas supone cierta diferenciación de las poblaciones, propiciada por el aislamiento geográfico de las Sierras Madre.

3. Asimismo, *P. cembroides* es más productivo en términos de semilla que *P. johannis*, muy probablemente debido al sistema de cruzamiento implícito, dadas las diferencias en expresión sexual, monoico en *P. cembroides* y monoico con fuerte tendencia a dioico en *P. johannis*. Sin embargo, a pesar de que evolutivamente la dioecia presenta mayores ventajas en términos evolutivos, en tiempo ecológico parece mostrar desaciertos, ya que actualmente *P. johannis* produce el doble de conos que *P. cembroides* pero con baja proporción de semilla viable y con menor capacidad germinativa.

4. La fenología vegetativa y reproductiva de *P. cembroides* y *P. johannis* parece seguir el mismo patrón, sin embargo, hay un desfaseamiento en el periodo de polinización que limita, pero no excluye, la posibilidad de hibridación. Esta cuestión es una disyuntiva a resolver.

5. La fitoquímica explica, en parte, la variación genética entre *P. cembroides* s.l. y *P. johannis*, sin embargo, faltan pruebas moleculares que detecten la posible hibridación o la introgresión en éstos taxa.

BIBLIOGRAFÍA

Avilan Naranjo A., 1985.- Caracterización de los piñoneros *Pinus cembroides* Zucc. y *P. discolor* Bailey & Hawks., de las serranías meridionales del estado de San Luis Potosí, México. *Tesis Profesional*, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich., 101p.

Bailey D.K. & F.G. Hawksworth, 1983.- *Pinaceae* of the Chihuahuan Desert. *Phytologia*, **53** (3), 227-234.

Bailey D.K. & F.G. Hawksworth, 1987.- Phytogeography and taxonomy of the pinyon pines *Pinus* subsection *cembroides*. In : II Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros, Passini M.-F. et al. (Comps.). *Centre d'Etu-*

- des Mexicaines et Centraméricaines*, Universidad Autónoma de Chapingo-Centro de Genética Forestal, A.C. México, D.F., 41-64.
- Bailey D.K., K. Snajberk & E. Zavarin, 1982.- On the question of natural hybridization between *Pinus discolor* and *Pinus cembroides*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **10** (2), 111-119.
- Benavides Meza H.M. & E. García Moya, 1987.- Potencial hídrico diurno y anual de *Pinus cembroides* y *Pinus discolor* en las serranías meridionales de San Luis Potosí. In: Strategies for classification and management of native vegetation for food production in arid zones. Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station, Forest Service, USDA Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos-Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. *Gen. Tech. Rep. RM-150*, Tucson, Arizona, 207-213.
- Cetina Alcalá V.M., E. García Moya & M.R. Keyes, 1985.- Análisis estructural de un bosque de pino piñonero de *Pinus cembroides* Zucc., en La Amapola, S.L.P. In: Primer Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros. J.E. Flores L. (Ed.). Facultad de Silvicultura y Manejo de Recursos Renovables, Universidad Autónoma de Nuevo León. *Reporte Científico*, n° especial **2**, 100-109.
- Cetina Alcalá V.M., E. García Moya & M.R. Keyes, 1988.- Aspectos de la regeneración de un bosque de *Pinus cembroides* Zucc. en la región de La Amapola, SLP. *Agrociencia, sistemas de producción en zonas áridas*, **72**, 219-228.
- Cetina Alcalá V.M. & S.D. Sánchez Avila, 1989.- Efecto de la intensidad de luz en el desarrollo inicial de *Pinus cembroides* Zucc. In: Memorias del III Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros, J.D. Flores F. et al. (Comps.). UAAANCIFAP/SARH-INIFAP/SARH, Saltillo, Coah., 51-53.
- Cetina Alcalá V.M., S.D. Sánchez Avila & E. García Moya, 1989.- Estructura de una masa pura de *Pinus discolor* Bailey & Hawksworth en La Amapola, SLP. In: Memorias del III Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros, J.D. Flores F. et al. (Comps.). UAAAN-CIFAP/SARH-INIFAP/SARH, Saltillo, Coah., 64-65.
- Cetina Alcalá V.M., S.D. Sánchez Avila & D. Chavez Olayo, 1991.- Desarrollo y crecimiento en plantas de dos años de edad de *Pinus cembroides* y *Pinus discolor* bajo cinco intensidades de sombra. In: IV Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros, Sánchez R.G. et al. (Comps.). Instituto de Ecología y Alimentos, UATCONACYT-UANL, 105-110.
- Cibrán Tovar D., 1985.- Insectos de los pinos piñoneros en México. In: I Simposio sobre Pinos Piñoneros. Facultad de Silvicultura y Manejo de Recursos Renovables. Universidad Autónoma de Nuevo León. *Reporte Científico Especial*, n° **2**, 174-192.
- Coney P.J., 1983.- The plate tectonic setting of cordilleran deserts. In: Origin and evolution of deserts, Wells S.G. y D.R. Haragan (eds). Univ. New Mexico Press, Albuquerque, New Mexico, 81-97.
- Critchfield W.B. & E.L. Little Jr., 1971.- Geographic distribution of the pines of the world. *Forest Service, USDA. Misc.*, Publ. **991**, 97p.
- Duran Medina E., 1991.- Estudio densoestructural y bionómico de los pinos piñoneros (*Pinus cembroides* Zucc. y *Pinus discolor* Bailey & Hawks.) en el ejido Escalerillas, Mpio. San Luis Potosí. *Informe de Servicio Social*, UAM-Xochimilco, México, D.F. 52p.
- Ferrera Cerrato R. & J. Saenz Gómez, 1987.- Asociación simbiótica entre *Pisolithus tinctorius* y dos especies de pinos piñoneros. In: II Simposio Nacional Sobre Pinos Piñoneros, Passini M.-F. et al. (Comps.). Centre d'Etudes Mexicaines et Centraméricaines, Universidad Autónoma de Chapingo-Centro de Genética Forestal, A.C. México, D.F., 93-99.
- Flores Flores J.D. & E. Díaz Esquivel, 1989.- Factores asociados con la variación anual en la producción de conos y semillas en *Pinus cembroides* Zucc. en Saltillo, Coahuila. In: Memorias del III Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros, J.D. Flores F. et al. (Comps.). UAAAN-CIFAP/SARH-INIFAP/SARH, Saltillo, Coah., 136-144.
- Flores Flores J.D. & E. Díaz Esquivel, 1991.- Evaluación de la mortalidad de conos y semillas en diferentes especies de piñoneros, localizadas cerca de Saltillo, Coah. In: IV Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros, Sánchez G.R. et al. (Comps.). Instituto de Ecología y Alimentos, UAT-COTACYT-UANL, 20-33.
- Flores Lara J. & H.F. Caldera, 1985.- Características de los conos de algunos piñoneros mexicanos en relación al ataque de insectos. In: I Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros. Facultad de Silvicultura y Manejo de Recursos Renovables. Universidad Autónoma de Nuevo León, *Reporte Científico Especial*, n° **2**, 223-233.
- Flores Lara J. & R.A. López, 1989.- Producción de piñón en rodales naturales diferentes de piñonero *P. cembroides*. Impacto de insectos carpótagos. In: Memorias del III Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros, J.D. Flores F. et al. (Comps.). UAAAN-CIFAP/SARH-INIFAP/SARH, Saltillo, Coahuila, 122-125.
- Floyd M.L. & T.A. Kohler, 1990.- Current productivity and prehistoric use of piñón (*Pinus edulis*, Pinaceae) in the Dolores Archaeological Project Area, Southwestern Colorado. *Econ. Bot.*, **44** (2), 141-156.
- Fogg G.L., 1962.- An analysis of variation in *Pinus edulis* and *Pinus cembroides*. M.S. Thesis, Butler University.
- Fogg G.G., 1966.- Studies in the Cembroides pines. Ph. D. dissertation, University of Oklahoma.
- García Arevalo A. & M.-F. Passini, 1993.- Distribución y ecología de *Pinus johannis* M.-F. Robert. *Phytologia*, **74** (2), 125-127.
- García Moya E. & R. Gómez Aguilar, 1988.- Estimación de la producción de piñón en los piñoneros del estado de San Luis Potosí. *Agrociencia*, **71**, 225-237.
- García Moya E., F. Zavala Chavez & H.M. Benavides Meza, 1987.- Biología de los pinos piñoneros mexicanos. In: Memorias del II Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros, Passini M.-F. et al. (Comp.). Centre d'Etudes Mexicaines et Centraméricaines, Universidad Autónoma Chapingo, Centro de Genética Forestal, A.C. México, D.F., 151-161.

- Labarthe H.G., G.M. Tristan & J. Aranda G., 1982.- Revisión estratigráfica del Cenozoico de la parte central del estado de San Luis Potosí. Instituto de Geología y Metalurgia. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. *Folleto Técnico* n° 85, San Luis Potosí, S.L.P.
- Lanner R.G., 1975.- Piñon pines and junipers of the southwestern woodlands. In: The pinyonjuniper ecosystem: a symposium. Utah State University, *Agricultural Experiment Station*, Logan, Utah, 1-17.
- McCune B., 1988.- Ecological diversity in North American Pines. *Amer. J. Bot.*, **75** (3), 353-368.
- Malusa J., 1992.- Phylogeny and biogeography of the pinyon pine (*Pinus* subsect. *cebrooides*). *Syst. Biol.*, **17** (1), 42-66.
- Martínez F.N., P. De La Garza L. & R. Reyes C., 1987.- Caracterización radiográfica en la morfología y germinación de *Pinus cebrooides* Zucc. y *P. johannis* M.-F. Robert. In: Memorias del II Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros, Passini M.-F. et al. (Comp.). *Centre d'Etudes Mexicaines et Centraméricaines*, Universidad Autónoma Chapingo, Centro de Genética Forestal, A.C. México, D.F., 233-240.
- Martínez Delgado E., E. Mellink & E. García Moya, 1989.- Consumo de piñón por aves y roedores en La Ampola, SLP. In: Memorias del III Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros, J.D. Flores F. et al. (Comps.). *UAAANCIFAP/SARH-INIFAP/SARH*, Saltillo, Coah., 87-89.
- McCormick J. & J.W. Andresen, 1963.- A subdioecious population of *Pinus cebrooides* in Southwest, Arizona. *Ohio J. Sci.*, **63** (4), 159-163.
- Passini M.-F., 1982a.- Les forêts de *Pinus cebrooides* au Mexique. *Etudes Mésoaméricaines* II-5. Ed. Recherche sur les Civilisations, Paris, 373p.
- Passini M.-F., 1982b.- Les pins pignons mexicains du groupe « *cebrooides* ». *Informations sur les Ressources génétiques forestières*, n° 11, FAO, Rome, 31-34.
- Passini M.-F., 1983.- Un exemple de forêt tropicale sèche du Mexique: la forêt de *Pinus cebrooides* Zucc. *Bull. Soc. bot. Fr.*, **130** (1), *Lettres bot.*, 69-80.
- Passini M.-F., 1987.- The endemic pinyon of Lower California: *Pinus lagunae* M.-F. Passini. *Phytologia*, **6** (5), 331-338.
- Passini M.-F., 1991.- Pino piñonero: ciclo reproductivo, palinología y biopalinología. In: IV Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros, Sánchez R. et al. *Instituto de Ecología y Alimentos*, UAT.-COTACYT-UANL, 20-33.
- Passini M.-F., 1994.- Synonymie entre *Pinus discolor* Bailey & Hawsworth et *Pinus johannis* M.-F. Robert. *Acta bot. Gallica*, **3**, 387-388.
- Passini M.-F., 1996.- Les pins mexicains de la sous-section *cebrooides* Engelm.: distribution, cycle et phénologie, pollen. In: *Phytogéographie tropicale, Réalités et perspectives*, Guillaumet J.L. et al. (ed.). ORSTOM, Paris, 243-249.
- Perry J.P., 1991.- The pines of Mexico and Central America. Timber Press, Portland, Oregon, 231p.
- Pinel N., 1985.- La formation à *Pinus cebrooides* var. *lagunae* dans la Sierra de la Laguna, Basse Californie du Sud, Mexique. *Rapport de stage de DEA*, Toulouse, inédit.
- Robert M.-F., 1973.- Contribution à l'étude des forêts de *Pinus cebrooides* dans l'est du Mexique. *Thèse 3ème cycle*, Montpellier, 131p., inédit.
- Robert M.-F., 1978.- Un nouveau pin pignon mexicain: *Pinus johannis* Robert. *Adansonia*, sér. 2., **18**, 365-373.
- Rzedowski J., 1978.- Vegetación de México. Limusa. México, D.F., 432p.
- Sánchez R.R., 1980.- Hongos micorrízicos y su relación con las coníferas de la Meseta Tarasca, Michoacán. *Revista de Ciencias Forestales*, **5**, 42-63.
- Sánchez Avila S. & V.M. Cetina Alcalá, 1989.- Germinación y crecimiento de *Pinus discolor* Bailey & Hawsworth bajo diferentes intensidades de luz. In: Memorias del III Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros, J. D. Flores F. et al. (Comps.). *UAAAN-CIFAP/SARH-INIFAP/SARH*, Saltillo, Coah., 48-50.
- Sánchez Ramos G., S. Ledezma P. & H. Suzan A., 1989.- Estimación de daños por insectos en conos inmaduros de *Pinus nelsonii* Shaw, en la zona de Miquihuana, Tamaulipas. In: Memorias del III Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros, J.D. Flores F. et al. (Comps.). *UAAAN-CIFAP/SARH-INIFAP/SARH*, Saltillo, Coah., 82-86.
- Whitham T.G. & S. Mopper, 1985.- Chronic herbivory: impacts on architecture and sex expression of pinyon pine. *Science*, **228**, 1089-1091.
- Yañez Jimenez P.E. & E. García Moya, 1985.- Frecuencia, distribución, índice y distancia entre estomas en *Pinus cebrooides* y *Pinus discolor* en el Altiplano Potosino. In: Primer Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros, J.E. Flores L. (ed.). Facultad de Silvicultura y Manejo de Recursos Renovables, Universidad Autónoma de Nuevo León, *Reporte Científico especial*, n° 2, 19-31.
- Zavala Chavez F. & E. García Moya, 1990.- Iniciación de conos femeninos en *Pinus cebrooides* Zucc. *Act. Bot. Mex.*, **25**, 21-25.
- Zavala Chavez F. & E. García Moya, 1991.- Fenología y crecimiento del brote anual de *Pinus cebrooides* Zucc. de San Luis Potosí, México. *BIOTAM*, **3** (2), 5-114.
- Zavala Chavez F., E. García Moya & M. Engleman, 1987.- Estudio de la primera etapa del desarrollo de conos femeninos de *Pinus cebrooides* bajo condiciones naturales. In: II Simposio nacional sobre pinos pinoneros, Passini M.-F. et al. (Comps.). *Centre d'Etudes Mexicaines et Centraméricaines*, Universidad Autónoma de Chapingo-Centro de Genética Forestal, A.C. México, D.F., 139-150.
- Zavala Chavez F., J.A. Avila Naranjo & E. García Moya, 1989.- Variación anual en la longitud de acículas y

* Robert M.-F. publicó después como Passini M.-F.

- su relación con los factores ambientales en piñoneros del Altiplano Potosino. *In*: Memorias del III Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros, J.D. Flores F. *et al.* (Comps.). UAAAN-CIFAP/SARH-INIFAP/SARH, Saltillo, Coah., 72-80.
- Zaval Chavez F. & J.L. Campos Díaz, 1993.- Una nueva localidad de *Pinus discolor* Bailey & Hawksworth en el centro de México. *Acta Botánica Mexicana*, **25**, 21-25.
- Zavarin E., 1987.- Taxonomy of pinyon pines. *In*: II Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros, Passini M.-F. *et al.* (Comps.). *Centre d'Etudes Mexicaines et Centraméricaines*, Universidad Autónoma de Chapingo-Centro de Genética Forestal, A.C. México, D.F., 29-40.
- Zavarin E. & K. Snaberk, 1980.- Oleoresins of pinyons. *Agric. Food Chem.*, **28** (4), 829-834.
- Zavarin E. & K. Snaberk, 1985.- Monoterpenoid and morphological differentiation within *Pinus cembroides*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **13** (2), 89-104.
- Zavarin E. & K. Snaberk, 1986.- Monoterpenoid differentiation in relation to the morphology of *Pinus discolor* and *P. johannis*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **14** (1), 1-11.

TABLE ALPHABÉTIQUE DES MATIÈRES

A - B - C

- AFFRE L., (v. Debussche), 65.
AHÉE J., (V. Duhoux), 593 ; (V. Bogusz), 621.
AKKERMANS A.D.L., (V. Guan), 613.
ALAMI I., (v. Clément), 531.
ALARD D., (v. Baudry), 367 ; (v. Dutoit), 431.
Allium sphaerocephalon f. *prostratum* Cor. (valeur taxonomique), 107.
Alnus glutinosa (expression génétique), 613.
ALQUIER G., (v. Masson), 281.
AMIAUD B., Conséquences agro-écologiques de la suppression du pâturage dans les communaux du Marais Poitevin (France), 421 ; (v. Bouzille), 383.
ANDRIAMBOAVONJY H., (v. Yang), 21.
AUGER J., (v. Thibout), 137.
AUGUY F., (v. Bogusz), 621.
AYATTI H., (v. Dexheimer), 167.
AYMONIN G.G., analyse de : La Bretagne, du Mont Saint-Michel à la pointe du Raz. Guides naturalistes des côtes de France, 95.
BAJON R., Biodiversité intraspécifique dans les formations prairiales. II - Deux exemples de différenciation de complexes spécifiques chez les *Poaceae* : le *Koeleria cristata* (L.) Pers. s.l. et le complexe *Holcus lanatus* L.-*Holcus mollis* L. s.l., 251.
BALATOVA-TULACKOVA E., Diversität der Nass- und Feuchtwiesen der Ordnung *Molinietalia* in der Tschechischen und der Slowakischen Republik, 299.
BALLAND C., (v. Barron), 509.
BARRON D., Flavonoïdes prénylés et perméabilité membranaire, 509.
BAUDRY J., Gestion de la biodiversité dans une région d'élevage bovin : les prairies permanentes du Pays d'Auge, France, 367.
BEGEOT C., L'origine récente des peuplements de Pin à crochets (*Pinus uncinata* Miller ex Mirbel) sur la tourbière de Frasne et exploitation de la tourbe dans le Jura, 47.
BELKHODJA M., Action de la salinité sur les teneurs en proline des organes adultes de trois lignées de fève (*Vicia faba* L.) au cours de leur développement, 21.
BENOIST P., (v. Rouvier), 567.
BERRY A.M., (v. Wang), 609.
BISELING T., (v. Guan), 613.
BLAISE S., Biodiversité intraspécifique dans les formations prairiales. Introduction, 239 ; (v. Louveaux), 241 ; Biodiversité intraspécifique dans les formations prairiales. III - Vicariance chorologique et écologique dans l'est de la France et conclusions générales, 263.
BOGUSZ D., La symbiose *Casuarinaceae-Frankia* : approche moléculaire du rôle de la plante-hôte, 621 ; (v. Duhoux), 593.
BOSCHER J., Les *Allium*, 99.
BOURCIER J.F., (v. Baudry), 367.
BOURNÉRIAS M., La Bretagne, du Mont Saint-Michel à la pointe du Raz. Guides naturalistes des côtes de France (analyse), 95.
BOUSQUET J., (v. Roy), 635.
BOUTIN J.P., (v. Derridj), 125.
BOUZILLE J.B., Rôle déterminant du pâturage pour la gestion conservatoire des systèmes prairiaux saumâtres du Marais Poitevin, 383 ; (v. Amiaud), 421.
BRETON F., (v. Clériver), 531.
BRIANE J.P., (v. Bajon), 251 ; (v. Blaise), 263.
BROYER J., Etude de la reproduction sexuée des végétaux dans les prairies de fauche inondables du Val de Saône (Ain), 353.
CAPELLI P., (v. Eleuch), 547.
CARTIER D., (v. Louveaux), 241 ; (v. Blaise), 263.
CAUDERON A., Les enjeux de la protection de la biodiversité, 225.
Centaurea corymbosa (statut démographique), 191.
CHARPENTIER J.P., (v. Eleuch), 547.
CHAUMONT J.P., (v. Yang), 21.
CHERIFI K., Polymorphisme enzymatique de quelques populations naturelles de *Medicago ciliaris* (L.) Krock et de *Medicago intertexta* (L.) Mill., 155.
CHRIQUI D., (v. Nicolescu), 539.
CLÉMENT B., Quelques facteurs de la biodiversité végétale dans les prairies humides des corridors fluviaux, 309 ; (v. Regimbrau), 411.
CLÉRIVET A., Les composés phénoliques et la résistance des plantes aux agents pathogènes, 531.
CLEYET-MAREL J.C., Importance des composés phénoliques dans les interactions entre plantes et microorganismes : exemple des relations *Rhizobium*/Légumineuses, 521.
COLAS B., Statut démographique de *Centaurea corymbosa* Pourret (*Asteraceae*), *Horatophylla pyrenaica* (Lapeyr.) Cullen & Dudley (*Brassicaceae*) et *Marsilea strigosa* Willd. (*Marsileaceae-Pteridophyta*), trois plantes rares du sud de la France, 191.
COLLINS W.J., (v. Masson), 281.
CORILLON R., (v. Godeau), 107.
COSSON L., (v. Mellouki), 131.
Cyclamen balearicum (écologie en France), 65.

D - E - F - G

- Datisca glomerata* (régénération), 609.
 DEBUSSCHE G., (v. Debussche), 65.
 DEBUSSCHE M., Ecologie d'une espèce endémique et rare à distribution fragmentée : *Cyclamen balearicum* Willk. en France, 65.
 DÉDALDÉCHAMP F., (v. Fleuriet), 493.
 DELPECH R., Conclusions du Colloque international « Biodiversité et gestion des écosystèmes prairiaux » (Metz, 8-10 juin 1995), 463.
 DIEM H.G., Les mycorhizes des plantes actinorhiziennes, 581.
 DIOUF D., (v. Duhoux), 593 ; (v. Bogusz), 621.
 DOMMERGUES Y.R., La fixation d'azote chez les plantes actinorhiziennes et ses applications, 663.
 DREUILLAUD J.M., (v. Louveaux), 241.
 DUHOUX E., La nodule actinorhizien, 593 ; (v. Bogusz), 621.
 DUTOIT T., Biodiversité actuelle et potentielle des écosystèmes prairiaux calcicoles : influence de la gestion sur les phytocénoses et les banques de graines, 431.
 DERRIDJ S., Composition en métabolites primaires de la surface foliaire du poireau : étude comparative, incidence sur la sélection de la plante-hôte pour pondre par un insecte, 125.
 DESFOUGÈRES A., (v. Barron), 509.
 DEXHEIMER J., Le traitement d'images en biologie ou la chambre noire digitale, 5 ; Etude de l'origine et de la répartition des granules vacuolaires dans les hyphes d'une endomycorhize à vésicules et arbuscules, 167.
 DOUMAS P., (v. Eleuch), 547.
 ELEUCH C., Modification de l'expression du métabolisme phénolique chez le Noyer et réactivité *in vitro*, 547.
 EL OUALIDI J., Le polymorphisme du calice chez *Teucrium dunense* (Labiatae) : son maintien sur les dunes du littoral, 55.
 FERNANDEZ J., (v. Juan), 181.
 FIALA V., (v. Derridj), 125.
 FIASSON J.L., (v. Blaise), 263.
 FIGUREAU C., (v. Godeau), 107.
 FLEURIET A., Les composés phénoliques et la qualité des produits d'origine végétale consommés par l'homme, 493.
 FLEURY Ph., Les différentes composantes de la biodiversité dans les prairies. Exemples dans les Alpes du Nord françaises, 291.
 FRANCHE C., (v. Duhoux), 593 ; (v. Bogusz), 621.
 GARCIA D., (v. Clériver), 531.
 GARCÍA MOYA E., (v. Manzanares), 681.
 GAUTHIER D., (v. Rouvier), 567.
 GÉRARD H., (v. Dexheimer), 167.
 GHANBAJA J., (v. Dexheimer), 167.
 GHERBI H., (v. Duhoux), 593 ; (v. Bogusz), 621.
 GIRARD C.M., (v. Baudry), 367.
 GIRGIS S., (v. Rouvier), 567.
 GLADSTONES J., (v. Masson), 281.
 GOBÉ C., (v. Bogusz), 621.
 GODEAU M., *Allium sphaerocephalon* f. *prostratum* Cor., Fig., God. Valeur taxonomique, 107.
 GRANDJANNY M., (v. Debussche), 65.

- GRÉVILLOT F., Etude de l'impact des changements des pratiques agricoles sur la biodiversité végétale dans les prairies du Val de Meuse : présentation méthodologique et premiers résultats, 317.
 GROSSI C., (v. Jay), 481.
 GUAN C., Gene expression in ineffective actinorhizal nodules of *Alnus glutinosa*, 613.

H - I - J - K - L

- HOFF M., La connaissance d'une flore : qui a récolté quoi en Guyane française depuis Aublet ?, 199.
Holcus mollis (complexes), 251.
Hormatophylla pyrenaica (statut démographique), 191.
 JAY M., Les composés phénoliques et la caractérisation des niveaux taxonomiques inférieurs du monde végétal, 481.
 JAY-ALLEMAND C., (v. Eleuch), 547.
 JOUANIN L., (v. Nicolescu), 539 ; (v. Eleuch), 547.
 JUAN R., Estudio de microcaracteres en frutos y semillas de *Antirrhinum* L. (*Scrophulariaceae*), 181.
 KAABECHE M., Les relations climat-végétation dans le bassin du Hodna (Algérie), 85.
 KAHANE R., Les sucres chez l'oignon cultivé *in vitro*, 117.
Koeleria cristata (complexe), 251.
 LACAILLE-DUBOIS M.A., Importance pharmacologique des dérivés polyphénoliques, 555.
 LACOSTE A., (v. Blaise), 263.
 LAURANSON-BROYER J., (v. Broyer), 353.
 LECOMTE C., (v. Thibout), 137.
 LÉCONTE D., (v. Baudry), 367.
Lotus corniculatus (polymorphisme cyanogénique), 241.
 LOUVEAUX A., Biodiversité intraspécifique dans les formations prairiales. I - Recherche des causes de variation, à l'échelle locale, du polymorphisme cyanogénique chez *Lotus corniculatus* L. (Fabacées), 241.

M - N - O - P - Q - R

- MACHEIX J.J., Les composés phénoliques des végétaux : quelles perspectives à la fin du XXème siècle ?, 473.
 MALTBY E., (v. Clément), 309.
 MANDIN D., (v. Yang), 21.
 MANZANARES A.R., *Pinus cembroides* s.l. y *Pinus johannis* del Altiplano Mexicano : une synthèse, 681.
Marsilea strigosa (statut démographique), 191.
 MARTIN A., (v. El Oualidi), 55.
 MASSON Ph., Caractéristiques des populations françaises de trèfle souterrain (*Trifolium subterraneum* L.), 281.
Medicago intertexta (polymorphisme enzymatique), 155.
 MELLOUKI F., Les précurseurs d'arômes dans des cultures cellulaires d'*Allium*, 131 ; (v. Vannereau), 143.
 M'HIRIT O., (v. Ouhammou), 393.
 MILLET-CLERC J., (v. Yang), 21.
 MOIROUD A., Diversité et écologie des plantes actinorhiziennes, 651.
 MOLINA J., (v. Colas), 191.
 MULLER A., (v. Rouvier), 567.
 MULLER S., Exposé introductif au colloque « Biodiversité des écosystèmes prairiaux » : déterminisme et évol-

- tion de la biodiversité dans les écosystèmes prairiaux, 233 ; (v. Blaise), 263 ; (v. Gréviliot), 317 ; (v. Ouhammou), 393.
- NAVARRO E. (v. Rouvier), 567.
- NICOLESU C., Modification de l'expression du métabolisme phénolique chez le Peuplier en relation avec la résistance aux agents pathogènes, 539.
- NORMAND P., (v. Rouvier), 567.
- OLIVIER R., (v. Jay), 481.
- OUHAMMOU A., Biodiversité et gestion des écosystèmes prairiaux dans le Parc national de Toubkal, Maroc. Premiers résultats, 349 ; Impact des activités pastorales sur la biodiversité floristique dans une thuriferaie limotrophe du Parc national de Toubkal, Haut-Atlas de Marrakech, Maroc, 393.
- OOMES M.J.M., Restoration of species diversity in grasslands : the effect of grassland management and changes in ground water level, 451.
- PASSINI M.F., (v. Manzanaras), 681.
- PASTOR J., (v. Juan), 181.
- PASTUGLIA M., (v. Eleuch), 547.
- PAWLOWSKI K., (v. Guan), 613.
- Pinus cembroides* et *P. johannis* (Altiplano du Mexique), 681.
- Pinus uncinata* (origine des peuplements), 47.
- PLANTUREUX S., Biodiversité, type de sol et intensité de l'exploitation de prairies permanentes du Plateau lorrain, 339 ; FLORA-sys : système informatique de gestion et d'aide à l'interprétation des relevés floristiques, 403.
- POITRY P., (v. Yang), 21.
- POMEROL Ch., (v. Bournérias) (analyse), 95.
- POSSEY F., (v. Barran), 509.
- POUDEVIGNE I., (v. Baudry), 367.
- PRACH K., Degradation and restoration of wet and moist meadows in the Czech Republic : general trends and case studies, 441.
- PRIN Y., (v. Rouvier), 567.
- PUECH S., (v. El Oualidi), 55.
- RANCILLAC M., (v. Kahane), 117.
- RAVANEL P., (v. Barran), 509.
- REDDELL P., (v. Rouvier), 567.
- REGIMBEAU C., Dynamique des communautés végétales des prairies humides après abandon dans le bassin versant du Jet (Bretagne, France), 411.
- RENDU F., L'ajoene, un antiagrégant efficace et subtil, 149.
- REYNAUD J., (v. Jay), 481.
- RIBA M., (v. Colas), 191.
- RICHARD H., (v. Begeot), 47.
- RICHARD M., (v. Bajon), 251.
- RICROCH A., Valorisation de la production de l'oignon en Afrique de l'Ouest par la gestion dynamique de ses ressources génétiques, 101.
- RINAUDO G., (v. Rouvier), 567.
- ROME S., (v. Cleyet-Marel), 521.
- ROUAMBA A., (v. Ricroch), 101.
- ROUVIER C., Biologie et diversité génétique des souches de *Frankia* associées aux Casuarinacées, 567.
- ROYA., The evolution of the actinorhizal symbiosis through phylogenetic analysis of host-plants, 635.

S - T - U - V - W - X - Y

- SALDUCCI X., (v. Cleyet-Marel), 521.
- SANDRÉ C., (v. Nicolescu), 539.
- SANIER C., (v. Clérvet), 531.
- SARR A., (v. Ricroch), 101.
- SCHWENCKE J., (v. Rouvier), 567.
- SELIM S., (v. Rouvier), 567.
- SIMONET P., (v. Rouvier), 567.
- SHOAR-GHAFARI A., (v. Vintéjoux), 501.
- SOLDAAT L., (v. Derridj), 125.
- Spirodela polyrhiza* (composés phénoliques), 501.
- Teucrium dunense* (polymorphisme du calice), 55.
- THENAIL C., (v. Baudry), 367.
- THIBOUT E., Substances soufrées des *Allium* et insectes, 137.
- TOURNADE F., (v. Bouzille), 383 ; (v. Amiaud), 421.
- Trifolium subterraneum* (population), 281.
- TURQUIER Y., (v. Bournérias) (analyse), 95.
- UHEL C., (v. Fleuriot), 493.
- VAN DER WERF A., (v. Oomes), 451.
- VAN DIJK C., (v. Guan), 613.
- VAN KAMMEN A., (v. Guan), 613.
- VANNEREAU A., Quelques exemples d'activités biologiques des substances soufrées des *Allium* utilisées en phytothérapie, 143 ; (v. Mellouki), 131).
- VINTÉJOUX C., Localisation tissulaire et cellulaire de composés phénoliques dans les turions de *Spirodela polyrhiza* (L.) Scheiden (Lemnacées), 501.
- Vicia faba* (action de la salinité), 21.
- VILLEVIEILLE M., Mise au point d'un test de sélection pour *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hansen f. sp. *cepae*, 109.
- VINCENT G., Le potentiel de développement d'un rameau de *Géranium rosat* (*Pelargonium* sp.) est déterminé par les conditions de croissance présidant à la formation du bourgeon dont il est issu, 37.
- WAGNER H., (v. Lacaille-Dubois), 555.
- WANG H.Y., Plant regeneration from leaf segments of *Datisca glomerata*, 609.
- WERY J., (v. Cleyet-Marel), 521.
- WOLTERS C., (v. Guan), 613.
- YANG D., Propriétés antifongiques et antibactériennes, *in vitro*, de trois huiles essentielles de Patchouli d'origines différentes.

SOCIÉTÉ BOTANIQUE DE FRANCE

La Société botanique de France est une association type loi 1901 (siège social : 4, avenue de l'Observatoire, F-75006 Paris), créée en 1854 et reconnue d'utilité publique le 17 août 1875. Elle organise des séances publiques pour les membres et invités et, sur des thèmes précis, des journées d'études ou colloques. Des sessions extraordinaires sont aussi organisées sous forme de stage de terrain. Elle édite le *Bulletin de la Société botanique de France*, *Acta botanica Gallica*, et le *Journal de Botanique*.

Dates des séances en 1997

24 janvier	21 mars	24 octobre	12 décembre
------------	---------	------------	-------------

au siège de la société

ATTENTION : Adresses à retenir pour la correspondance :

- **Organisation des Séances et des Colloques :**
 - C. VINTÉJOUX, Cryobiologie végétale, Université Pierre-et-Marie-Curie, 12, rue Cuvier, F-75005 Paris. Tél. 01 44 27 65 50
- **Rédaction**
 - Société botanique de France : rue du Professeur Laguesse, BP 83, F-59006 Lille Cedex, C.C.P. 1528-57 E PARIS. Tél. 03 20 96 40 40 - Fax 03 20 95 90 09
- **Trésorerie** (pour tous les envois de fonds) :
 - R. SORNICLE, 6, boulevard Jeanne-d'Arc, F-45600 Sully-sur-Loire, C.C.P. 1528-57 E PARIS.

Cotisations et abonnements à *Acta botanica gallica* pour 1997

- **Pour les membres (France, C.E.E., Étranger)**
 - cotisation 50 F
 - abonnement 440 F TTC
- **Pour les abonnements institutionnels (France, C.E.E., Étranger)**
 - 650 F TTC

Réassortiments : prix variables

Comité de Lecture

MM. Aymonin, Baudière, Binet, Mlle Blaise, MM. Bock, Botineau, Boucher, Bourreau, Camefort, Champagnat, Charpin, Mlle Chesnoy, Mme Delelis, MM. Delpech, Descoings, Genevès, Géhu, Guignard, Guinochet, Hamel, Heywood, Lambert, Landolt, Lazare, Lecoingte, Mandin, Mathez, Muller, Perbal, Mlle Poux, MM. Reduron, Timbal, Mlle Tort, MM. Tourte, Vazart, Vescovi, Mlle Vintéjoux.

Le Rédacteur du Bulletin
J.-L. GUIGNARD

Le bon à tirer a été donné le 26 septembre 1997

Le Directeur de la publication
B. DESCOINGS

Printed in France

Corlet, Imprimeur, S.A. 14110 Condé-sur-Noireau – Dépôt légal : octobre 1997 – N° d'Imprimeur : 26807
N° Commission Paritaire : AS 50 836 – *Imprimé en France*

PUBLICATIONS DE LA SOCIÉTÉ BOTANIQUE DE FRANCE

- **Bioclimatologie méditerranéenne.** Publié sous la direction de G. LONG et A. PONS, 1984. 600 pages. Prix H.T. 600, Prix T.T.C. 612,60.
- **La Prolifération chez les Plantes : induction et contrôle.** Publié sous la direction de A. NOUGAREDE, 1985. 165 pages. Prix H.T. 165, Prix T.T.C. 168,47.
- **Les Variations naturelles intra-individuelles chez les Angiospermes.** Publié sous la direction de R. GORENFLOT, 1985. 126 pages. Prix H.T. 125, Prix T.T.C. 127,63.
- **La Variabilité des cellules végétales cultivées *in vitro*.** Publié sous la direction de J.-C. MESTRE et A. BENBADIS, 1985. 170 pages. Prix H.T. 170, Prix T.T.C. 173,57.
- **La Domestication chez les Végétaux.** Publié sous la direction de Y. DEMARLY et M. PERNES, 1986. 68 pages. Prix H.T. 70, Prix T.T.C. 71,47.
- **Progrès récents en Lichénologie.** Publié sous la direction de M.A. LETROUIT, 1986. 110 pages. Prix H.T. 110, Prix T.T.C. 112,31.
- **La Cryoconservation des cellules, tissus et organes végétaux.** Publié sous la direction de D. COMÉ et J. DEREUDDRE, 1986. 128 pages. Prix H.T. 130, Prix T.T.C. 132,73.
- **Obtention d'haploïdes *in vitro*, état actuel et perspectives.** Publié sous la direction de J. DE BUYSER, Y. HENRY, C. RAQUIN et A. BENBADIS, 1986. 85 pages. Prix H.T. 85, Prix T.T.C. 86,79.
- **Points de vue actuels sur la reproduction sexuée végétale.** Publié sous la direction de M. FAVRE-DU-CHARTRE, 1987. 176 pages. Prix H.T. 175, Prix T.T.C. 178,68.
- **L'Évolution des Gymnospermes.** Publié sous la direction de J. GALTIER, 1987. 150 pages. Prix H.T. 150, Prix T.T.C. 153,15.
- **Données actuelles sur les tissus conducteurs.** Publié sous la direction de A.-M. CATESSON, 1987. 120 pages. Prix H.T. 120, Prix T.T.C. 122,52.
- **Les Réserves chez les végétaux ligneux.** Publié sous la direction de G. BORY, 1988. 120 pages. Prix H.T. 120, Prix T.T.C. 122,52.
- **Biologie moléculaire végétale.** Publié sous la direction de M. QUETIER, 1988. 55 pages. Prix H.T. 60, Prix T.T.C. 61,26.
- **Bois Tropicaux.** Publié sous la direction de J. DOAT, 1988. 82 pages. Prix H.T. 90, Prix T.T.C. 91,89.
- **Quelques aspects actuels de la recherche en Hormologie végétale.** Publié sous la direction de E. MIGINIAC, 1988. 95 pages. Prix H.T. 110, Prix T.T.C. 112,31.
- **Potentialités biologiques des cyanobactéries.** Publié sous la direction de G. GIRAUD ET J.C. THOMAS, 1989. 182 pages. Prix H.T. 180, Prix T.T.C. 183,78.
- **Le cytosquelette, les mouvements et la morphogénèse chez les végétaux.** Publié sous la direction de S. PUISEUX-DAO et F. MARANO, 1989. 112 pages. Prix H.T. 120, Prix T.T.C. 122,52.
- **Les apports récents de la biologie végétale en régions tropicales.** Publié sous la direction de G. DUCREUX et L. ROSSIGNOL, 1989. 271 pages. Prix H.T. 270, Prix T.T.C. 275,67.
- **Workshop européen sur la physiologie, la biochimie et la génétique de la résistance à la sécheresse chez les plantes.** Publié sous la direction de J. VEIRA DA SILVA, 1990. 147 pages. Prix H.T. 150, Prix T.T.C. 153,15.
- **Biologie et conservation du pollen : aspects fondamentaux et appliqués.** Publié sous la direction de Th. CERCEAU-LARRIVAL, 1990. 170 pages. Prix H.T. 170, Prix T.T.C. 173,57.
- **Impact des Biotechnologies dans le secteur végétal agroalimentaire.** Publié sous la direction de B. et R.S. SANGWAN, 1990. 170 pages. Prix H.T. 170, Prix T.T.C. 173,57.
- **Charophytes actuelles et fossiles.** Publié sous la direction de N. GRAMBAST-FESSARD et M. GUERLESQUIN, 1991. 100 pages. Prix H.T. 100, Prix T.T.C. 102,10.
- **Les Pteridophytes de France et leurs affinités : systématique - chorologie - biologie - écologie.** Publié sous la direction de S. MULLER et M. BOUDRIE, 1991. 134 pages. Prix H.T. 140, Prix T.T.C. 142,94.
- **Dynamique des surfaces cellulaires végétales.** Publié sous la direction de R. GOLBERG, 1991. 123 pages. Prix H.T. 125, Prix T.T.C. 127,63.
- **Accumulations minérales chez les végétaux.** Publié sous la direction de C. GARDOU et C. VINTÉ-JOUX, 1992. 156 pages. Prix H.T. 160, Prix T.T.C. 163,36.
- **Les charbons de bois. Les anciens écosystèmes et le rôle de l'homme.** Publié sous la direction de J.-L. VERNET, 1992. 572 pages. Prix H.T. 570, Prix T.T.C. 581,97.
- **Les substances liées à la sécrétion chez les végétaux.** Publié sous la direction de M. BELIN-DEPOUX, 1993. 116 pages. Prix H.T. 120, Prix T.T.C. 122,52.
- **Cambium, production de bois et développement de l'arbre.** Publié sous la direction de A.-M. CATESSON et S. LACHAUD, 1993. 124 pages. Prix H.T. 125, Prix T.T.C. 127,63.
- **Les bases cellulaires et moléculaires de la morphogénèse chez les plantes.** Publié sous la direction de D. CHRIQUI, 1993. 155 pages. Prix H.T. 155, Prix T.T.C. 158,26.
- **Morphologie pollinique : biologie, systématique et évolution.** Publié sous la direction de A. LE THOMAS et I.K. FERGUSON, 1994. 188 pages. Prix H.T. 190, Prix T.T.C. 193,99.
- **Mycorrhizes.** Publié sous la direction de J. DI-XHEIMIER, 1994. 180 pages. Prix H.T. 180, Prix T.T.C. 183,78.
- **Algues et Biotechnologies.** Publié sous la direction de J. COSSON, 1995. 72 pages. Prix H.T. 75, Prix T.T.C. 76,57.
- **Macrophytes aquatiques et qualité de l'eau.** Publié sous la direction de M. TREMOLIERES et S. MULLER, 1995. 265 pages. Prix H.T. 265, Prix T.T.C. 270,56.
- **Biodiversité et gestions des écosystèmes prairiaux.** Publié sous la direction de S. MULLER, 1996. 250 pages. Prix H.T. 250, Prix T.T.C. 255,25.
- **Composés phénoliques des végétaux.** Publié sous la direction de J.-J. MACHEIX, 1996. 92 pages. Prix H.T. 100, Prix T.T.C. 102,10.

Prix au 1^{er} janvier 1997 en Francs français. Frais d'expédition en plus. Pour les Colloques parus antérieurement et les commandes (réglement à réception de facture), s'adresser à la Société Botanique de France, rue J.-B.-Clément, F-92296 CHATENAY-MALABRY Cedex. Tél. : 01 46 83 55 20 - Fax : 01 46 83 13 03.

Outre ces colloques, la Société organise des SESSIONS EXTRAORDINAIRES se déroulant chaque année dans une région différente.