



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

ORSTOM - Dakar
Microbiologie du sol

BSFT - Nogent/Marne
CTFT/ORSTOM

T H E S E

présentée pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY I
Spécialité : BIOLOGIE VEGETALE ET FORESTIERE

par

BASSIROU SOUGOUFARA



SUJET

**LA FIXATION DE N₂ PAR LES CASUARINAS : AMELIORATION
PAR SELECTION CLONALE ET QUANTIFICATION PAR
DIFFERENTES METHODES**

soutenue le 13 Septembre 1990, devant la commission d'examen

MM. J. DEXHEIMER, Président

R. BARDIN, Rapporteur

E. DUHOUX, Rapporteur

Y.R. DOMMERGUES, Examineur

A. HERBILLON, Examineur

A. MARIOTTI, Examineur

TITLE

NITROGEN FIXATION BY CASUARINAS : IMPROVEMENT THROUGH CLONAL SELECTION AND QUANTIFICATION USING DIFFERENT METHODS

SUMMARY

An experimental study of the *Casuarina Frankia* symbiosis was carried out in the laboratory and in the field in Senegal, aiming at improving the N-fixing potential of this symbiotic association.

Both root symbiotic microorganisms (*Frankia* and ectomycorrhizal fungi) and host plants were studied.

Two groups of *Frankia* strains are considered :

- large host spectrum strains which nodulate species of *Casuarina* and *Allocasuarina* genera.

- narrow host spectrum strains which nodulate only species of the genus *Casuarina*.

In the case of the *Casuarina equisetifolia* symbiosis on which the investigations were focused, strains belonged to the second group.

By exploiting the variability of the strains, we selected the most effective strain, ORSO21001 (syn : Cj-1-82).

Casuarinacea exhibit great variation in their ability to fix N_2 for a given *Frankia* strain a characteristic which allowed to propose the following strategy to improve the N_2 -fixing potential and productivity of *Casuarina equisetifolia* grown in N-deficient soils :

- (i) in a first step, young individual trees are screening in taking into account nodule dry weight, plant dry weight, N_2 -fixation potential as measured by acetylene reduction method (ARA), the total N difference method (TND) and the isotopic methods (ID and AV). By the same time, total N content of the plants is also estimated.

- (ii) in a second step individual trees selected for their performances are vegetatively multiplied by micropropagation techniques using explants from assimilatory branchlets (young individual trees) or immature female inflorescences (IFI) (mature trees).

- (iii) in a third step the clones thus obtained are inoculated with alginate inoculant containing effective *Frankia* strains.

There are three kinds of people in this world. Those who know Casuarinas and love them. Those who want to get the selected clones and the specific Frankia polymeric inoculum and haven't. And the poor benighted souls who don't know what they are missing.

(Thoughts from Gorgui Sr.)

Except during the nine months before he draws his first breath, no man manages his affairs as well as a Casuarina tree does.

(After George Bernard Shaw)

A ma Femme, pour sa patience,

A mes Enfants,

A mon Frère, pour son aide,

A mes Parents, à mes Parents adoptifs, pour leur soutien constant

A mes Amis,

A mes Collègues,

Aux Forestiers de tous les pays du monde.

- A Monsieur A. HERBILLON qui m'a fait l'honneur de participer dans ce jury de thèse.

- A Monsieur A. MARIOTTI qui m'a fait l'honneur de participer dans ce jury de thèse.

- A Monsieur B.L. DREYFUS, responsable du laboratoire de Microbiologie du sol, qui a bien voulu m'accueillir avec sympathie.

Mes remerciements vont également à Messieurs SALL, FONTANA et CORBASSON, respectivement Directeur des Eaux, Forêts, Chasses et Conservation des Sols et du Reboisement du Sénégal, Directeur du Centre ORSTOM de Dakar et Directeur scientifique du CTFT, à mes Collègues à l'ORSTOM, SIMON, DOUDOU, LAURENT, MARC, DIDIER, PHILIPPE, JEAN-PAUL, TOMEPEKE, BERNARD, PIERRE et à tout le Personnel du centre ORSTOM de Dakar.

J'exprime également ma gratitude à la Fondation Internationale pour la Science pour son soutien financier.

Je ne saurais oublier de remercier tous les Amis et Collègues du CTFT et du BSFT : M. BRUNCK, GUY, MARC, Mlle LAFORGE, Mme ANNEQUIN, MARC, ANTOINE, YVES, BRUNO, MICHELE, KHADIJA, CHRISTINE, JANINE, MAGALIE, M. PELLETIER.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires de Microbiologie du sol de l'ORSTOM Dakar, de Biotechnologie des Symbioses Forestières Tropicales de Nogent-sur-Marne.

J'exprime ici toute ma reconnaissance et mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont permis de mener à bien ce travail et en particulier :

- A Monsieur Y.R. DOMMERGUES, responsable du laboratoire de Biotechnologie des Symbioses Forestières Tropicales de Nogent-sur-Marne, qui m'a donné les moyens de débiter et de poursuivre une activité de recherche. Sans sa grandeur d'esprit ce travail n'aurait pas vu le jour. Je suis honoré qu'il ait accepté de juger cette thèse.

- A Monsieur E. DUHOUX qui m'a dirigé pour la réalisation de ce travail en me faisant bénéficier de ses compétences et de son entière disponibilité.

- A Monsieur H.G. DIEM qui a bien voulu me faire bénéficier de ses connaissances et de son expérience.

- A Monsieur J. DEXHEIMER, responsable du laboratoire de Biologie des Ligneux, qui m'a aidé à être en contact avec l'administration de l'Université de Nancy I, et qui m'a fait l'honneur d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

- A Monsieur R. BARDIN, rapporteur, qui m'a fait l'honneur de juger ce travail.

SOMMAIRE

pages

I. Introduction	1
II. Matériels et Méthodes	6
1. Matériel végétal	6
2. Souches de microorganismes.....	6
2.1. Souches de <i>Frankia</i>	6
2.2. Souches de champignons ectomycorhiziens.....	9
3. Sols	10
4. Méthodes d'isolement de <i>Frankia</i>	11
4.1. Historique de l'isolement de <i>Frankia</i>	11
4.2. Piégeage de <i>Frankia</i> d' <i>Allocasuarina</i>	12
4.3. Isolement de <i>Frankia</i>	13
4.4. Observations des colonies de <i>Frankia</i>	14
5. Culture <i>in vitro</i> de <i>Frankia</i>	14
6. Etude préliminaire de la croissance de <i>Frankia in vitro</i>	15
7. Méthodes de production en masse de la culture de <i>Frankia</i>	16
8. Méthodes d'inclusion du microorganisme <i>Frankia</i> dans une matrice polymérique (PEM)	16
9. Méthode d'isolement des souches de champignons ectomycorhiziens.....	18

10. Méthodes de culture des plantes	19
10.1. Plantes issues de semis	19
10.1.1. Stérilisation et germination des graines	19
10.1.2. Culture des plantes en tubes de gélose inclinée	19
10.1.3. Culture des plantes dans les tubes de verre	21
10.1.4. Culture des plantes dans les gaines de polyéthylène	21
10.2. Plantes issues de multiplication végétative par les techniques conventionnelles	22
10.2.1. Isolement des clones de <i>Casuarina equisetifolia</i>	22
10.2.2. Bouturage en milieu solide	22
10.2.3. Bouturage en milieu liquide (boutures flottantes)	23
10.2.4. Culture des plantes dans les récipients de 15 l et 50 l	25
10.2.5. Culture des plantes dans les microparcelles de 1 m ²	25
10.3. Plantes issues de multiplication végétative par les techniques de micropropagation	26
10.3.1. Micropropagation à partir d'explants sous forme de rameaux photosynthétiques de <i>Casuarina equisetifolia</i>	26
10.3.2. Micropropagation à partir d'inflorescences femelles immatures (IFI)	27
10.3.3. Milieux de culture	27
11. Méthodes d'inoculation	29
11.1. Inoculation avec une suspension de nodules broyés	29
11.2. Inoculation avec les souches de <i>Frankia</i>	29
11.3. Inoculation avec les billes d'alginate	29
11.4. Inoculation avec les souches de champignons ectomycorhiziens	29

12. Méthodes d'analyse	30
12.1. Echantillonnage et pesée des parties aériennes et souterraines des plantes	30
12.2. Evaluation de la fixation symbiotique.....	31
12.2.1. Dosage de l'activité nitrogénase.....	31
12.2.1.1. Incubation sous acétylène et mesures	34
12.2.1.2. Mode de calcul.....	35
12.2.2. Méthode par différence	36
12.2.2.1. Dosage de l'azote total.....	36
12.2.2.1.1. Distillation et titration.....	37
12.2.2.1.2. Calculs	37
12.2.3. Méthodes isotopiques.....	38
12.2.3.1. Méthode de dilution isotopique	38
12.2.3.2. Méthode de la valeur "A"	40
13. Analyses statistiques	42
III. Résultats.....	49
A. Le spectre d'hôte de quatre souches de <i>Frankia</i> isolées d' <i>Allocasuarina</i> sp	50
B. La synthèse mycorhizienne <i>in vitro</i> de <i>Casuarina senso stricto</i> et d' <i>Allocasuarina</i> sp avec <i>Pisolithus tinctorius</i>	69

C. La réponse de <i>Casuarina equisetifolia</i> à l'inoculation au champ avec une souche de <i>Frankia</i> ORS 021001 (syn. Cj-1-82) incluse dans une matrice polymérique	86
D. La sélection clonale de <i>Casuarina equisetifolia</i>	92
D1. Mise au point de techniques originales de bouturage et de micropropagation	93
D2. Amélioration de la fixation de N ₂ par sélection clonale de la plante hôte.....	127
E. Les meilleures combinaisons "souches de <i>Frankia</i> x clones de <i>Casuarina</i> "	132
F. Estimation de la fixation de N ₂	145
G. Choix des critères de sélection chez <i>Casuarina equisetifolia</i>	153
IV. Conclusion	163

I - INTRODUCTION

Jusqu'au milieu du XX^e siècle, la fertilité et la productivité des sols des pays tropicaux ont été maintenus grâce à la pratique de la jachère herbacée ou forestière. C'est pourquoi les cultures vivrières ont pu conserver pendant longtemps des rendements constants bien que relativement faibles. Lorsqu'il a fallu accroître la production alimentaire de façon à pouvoir répondre aux exigences d'une croissance démographique, ce système de la jachère a dû être abandonné. Les terres cultivées, sous l'effet d'une agriculture minière (les restitutions en éléments minéraux et en matières organiques étant insuffisantes), ont subi un processus de dégradation, de fléchissement rapide de sa productivité, accéléré par les aléas climatiques (sécheresse, notamment).

Etant donné que l'azote est avec l'eau, le facteur limitant de la productivité végétale, fort heureusement il est venu l'idée d'exploiter rationnellement les processus de la fixation biologique de l'azote pour limiter la consommation des engrais azotés dont les trois inconvénients majeurs sont leur prix de revient élevé, leur rendement souvent défectueux et leur contribution à la pollution des eaux et des sols.

Une telle idée n'est pas utopique, puisque les travaux récents effectués au Sénégal ont montré :

- que l'utilisation comme engrais vert d'une légumineuse à nodules caulinaires *Sesbania rostrata* a permis de doubler le rendement des rizières ;
- qu'en ayant recours à des espèces fixatrices de N₂ telles que *Casuarina equisetifolia* , il a été possible d'établir des plantations forestières sur un sol dunaire pratiquement dépourvu d'azote (stabilisation des dunes du littoral sénégalais).

A côté de l'emploi des engrais verts, qui est souvent limité à certains types de culture, ou à l'utilisation de *Casuarina equisetifolia* pour la réhabilitation de zones dégradées, on a actuellement tendance, en milieu tropical, à faire appel à des systèmes culturels où les plantes vivrières sont étroitement associées à des

plantes pérennes, de préférence fixatrices de N₂. Ces systèmes cultureux mixtes qui constituent le fondement de l'agroforesterie participent puissamment à la protection, ou même à la régénération des sols en permettant le redressement de la production agricole (Felker et Clark, 1980 ; Allen et Allen, 1981 ; Brewbaker, 1983 ; Tiagalingam, 1983 ; Dommergues, 1987).

Ces espèces ligneuses fixatrices de N₂, qui sont appelées à jouer un rôle de plus en plus important en milieu tropical, peuvent appartenir à la famille des légumineuses, comme par exemple les *acacias*, ou faire partie d'autres familles végétales non légumineuses, comme par exemple les Casuarinacées (Tableau 1). Toutefois on se rend progressivement compte que ces dernières présentent par rapport aux autres systèmes biologiques pérennes utilisées en agriculture deux avantages : (1) elles sont moins exigeantes sur le plan nutritionnel et exceptionnellement tolérantes à certaines déficiences de sols ; cette raison tient à l'efficacité de sa symbiose avec un microorganisme fixateur de N₂, *Frankia* et à des endo et ectomycorhizes ; (2) leurs performances peuvent être améliorées par des méthodes simples fondées sur l'exploitation de la variabilité phénotypique naturelle.

Tableau 1 - Les arbres fixateurs de N₂ en foresterie et agroforesterie tropicales

1.	<u>Usage des arbres fixateurs de N₂</u> Bois de construction, de menuiserie et bois de service Bois de chauffage et charbon de bois Amélioration de la fertilité du sol Fourrage et alimentation humaine
2.	<u>Introduction dans les agrosystèmes</u> CLOTURES ET HAIES VIVANTES ex. <i>Pithecellobium dulce</i> , <i>Casuarina</i> sp. BRISE-VENT ex. <i>Erythrina variegata</i> , <i>Casuarina</i> sp. CULTURE EN COULOIRS (alley farming, intercropping) ex. <i>Flemingia macrophylla</i> , <i>Casuarina</i> sp. OMBRAJE ET SUPPORT ex. <i>Inga jinicuil</i> , <i>Casuarina equisetifolia</i> , <i>Gliricidia sepium</i> FOURRAGE ex. <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Prosopis juliflora</i> , <i>Casuarina equisetifolia</i> AMELIORATION DES PATURAGES ex. <i>Acacias</i> africains, <i>Alnus acuminata</i> , <i>Casuarina cunninghamiana</i> JARDINS DE CASE ex. <i>Parkia</i> sp. REBOISEMENTS ex. <i>Calliandra calothyrsus</i> , <i>Casuarina</i> sp. JACHERES AMELIOREES ex. <i>Acacia decurrens</i> , <i>Sesbania sesban</i> , <i>Casuarina oligodon</i> REHABILITATION DES SITES DEGRADEES ex. <i>Casuarina</i> sp.

TAXONOMIE ET DISTRIBUTION DES CASUARINACEES

Les Casuarinacées forment un groupe de 90 espèces d'arbres et d'arbrisseaux, s'étendant de l'Australie, aux îles du Pacifique et au Sud-Est de l'Asie.

Jadis, toutes les espèces appartenant à cette famille ont été regroupées sous le seul genre *Casuarina*, mais progressivement des études taxonomiques ont conduit à la subdivision du genre *Casuarina* en quatre genres *Allocasuarina* (Johnson, 1982), *Casuarina* et *Ceuthostoma* (Johnson, 1988) et *Gymnostoma* (Johnson, 1980).

Casuarina

Le genre *Casuarina* comprend 17 espèces. On les rencontre en Asie du Sud-Est, en Malaisie, en Mélanésie, en Polynésie, en Nouvelle-Calédonie et en Australie.

Allocasuarina

Ce genre comprend 53 espèces endémiques à l'Australie principalement en Australie du Sud. Cependant Wilson et Johnson (1989) ont remarqué la présence de quatre espèces au Nord-Est de Queensland et une espèce (*A. decaisneana*) en milieu aride, au centre de l'Australie.

Gymnostoma

Le genre *Gymnostoma* comprend 18 espèces. On les rencontre en Malaisie, aux îles Fiji, en Nouvelle-Calédonie et au Nord-Est d'Australie où il n'existe qu'une seule espèce *G. australianum*. Ailleurs, c'est le *G. sumatrana* qui devient localement important (Browne, 1955).

Ceuthostoma

Jadis, ce genre était inclus dans celui de *Gymnostoma*. A présent le genre *Ceuthostoma* ne compte que deux espèces (*C. palawanse* et *C. terminale*) qui poussent en Malaisie, de Palawan (Philippines) à Bornéo en Nouvelle-Guinée.

*
* *

L'adaptation remarquable des Casuarinacées à des sols marginaux, jointe à leur aptitude à croître sous des climats arides dans l'hinterland (*A. decaisneana*) ou en bordure de mer (*C. equisetifolia*) font que ces arbres sont susceptibles d'avoir des rendements très honorables même dans des conditions défavorables.

Dès lors, on comprend facilement que la diffusion des Casuarinacées en dehors de leur aire d'origine soit très souhaitable. Mais jusqu'à présent, hormis le cas particulier de trois *Casuarina* (*C. equisetifolia*, *C. glauca* et *C. cunninghamiana*) les introductions qui ont été tentées se sont soldées par des échecs probablement dans bien des cas en raison de l'absence dans le sol de souches spécifiques de *Frankia*. C'est pourquoi l'administration forestière au Sénégal attache une importance particulière à la connaissance des Casuarinacées. En collaboration avec l'Institut de Recherche pour le Développement en Coopération (ORSTOM), un programme de recherche sur les arbres de cette famille a été mis en place depuis 1980. Ce programme qui présente à la fois un caractère fondamental et appliqué porte non seulement sur *Casuarina equisetifolia* (var. *equisetifolia*), espèce répandue dans pratiquement tous les pays tropicaux et subtropicaux, mais également sur un certain nombre d'espèces de Casuarinacées non encore introduites au Sénégal.

Notre travail, résumé dans ce mémoire, s'inscrit dans le cadre de ce programme avec comme objectif l'exploitation optimale de la fixation de N₂ chez *Casuarina equisetifolia*.

Une telle étude doit nécessairement prendre en compte la présence de deux symbiotes et propose une approche méthodologique de l'amélioration de la productivité des *Casuarina* fondée sur l'exploitation de la variabilité génétique naturelle à la fois de la plante hôte et du microorganisme.

La première partie de notre mémoire traite de la méthodologie.

La deuxième partie présente les approches mises en oeuvre pour améliorer la fixation de N_2 chez les Casuarinacées. Cette partie comporte 7 chapitres qui nous ont conduit à étudier successivement :

- A. Le spectre d'hôte de quatre souches de *Frankia* isolées d'*Allocasuarina* sp.
- B. La synthèse mycorhizienne *in vitro* de *Casuarina* *sensu stricto* et d'*Allocasuarina* sp. avec *Pisolithus tinctorius* (infectivité).
- C. La réponse de *Casuarina equisetifolia* à l'inoculation au champ avec une souche de *Frankia* ORS021001 incluse dans une matrice polymérique.
- D. La sélection clonale de *Casuarina equisetifolia* avec :
 - D1. dans une première phase, la mise au point de techniques originales de bouturage et de micropropagation à partir d'explants sous forme de fragments de rameaux photosynthétiques et d'inflorescences femelles immatures (IFI) afin d'obtenir des clones,
 - D2. dans une seconde phase, l'amélioration de la fixation de N_2 par sélection clonale de la plante hôte.
- E. Les meilleures combinaisons "souches de *Frankia* x clones de *Casuarina*".
- F. L'estimation de la fixation de N_2 chez les différents clones obtenus en faisant appel à la méthode de l'activité réductrice d'acétylène (ARA), à la méthode par différence (TND), à la méthode de culture sur un milieu sans N et à la méthode isotopique (ID et AV).
- G. Le choix des critères de sélection chez *Casuarina equisetifolia*.

Ces résultats nous ont amené dans une dernière partie à proposer une stratégie de sélection et d'amélioration de la productivité de *Casuarina equisetifolia*.

II - MATERIELS ET METHODES

1 - MATERIEL VEGETAL

Nos travaux ont porté sur des arbres de la famille des Casuarinacées, principalement *Casuarina equisetifolia* Forst dont les semences nous ont été fournies par la Direction des Recherches sur les Productions forestières (86/1398/ISRA/DRPF) (Sénégal) et le Dr. J. Roskowski (Hawaï), et accessoirement sur *Casuarina cristata* F. Muell. ex Miq., *Casuarina cunninghamiana* Miq., *Casuarina glauca* Sieb ex Spreng., *Casuarina obesa* Miq., *Allocasuarina campestris* (Diels) L. Johnson, *Allocasuarina decaisneana* (F. Muell) L. Johnson, *Allocasuarina luehmannii* (R.T. Bak) L. Johnson, *Allocasuarina torulosa* (Ait.) L. Johnson et *Allocasuarina verticillata* (Lam) L. Johnson dont les semences nous ont été fournies par Kimberly Seeds Pty Ltd (Australie). Le matériel de base a été constitué soit de jeunes plantes, soit de fragments de rameaux photosynthétiques [terminologie recommandée par Flores (1978), Johnson (1982), Torrey et Berg (1988), le terme cladode étant inapproprié] et d'inflorescences femelles immatures (IFI).

2 - SOUCHES DE MICROORGANISMES

2.1.- Souches de *Frankia*

La liste des souches utilisées est donnée au tableau 2. Les cinq souches de *Frankia* (Br, Cef, Cj, TA et ALI₁) nous ont été fournies par les laboratoires de microbiologie des sols du centre ORSTOM de Dakar Sénégal et de biotechnologie des symbioses forestières tropicales de Nogent-sur-Marne, France. Les deux autres souches de *Frankia* (Dec et URU₂) ont été isolées par nous-mêmes suivant la technique H.G. Diem. Nous avons cultivé toutes ces souches de *Frankia* à 28°C pendant 3 à 4 semaines dans un milieu QMOD ou BAP complet liquide ou solidifié au Bitek Agar Difco à 0,8%. Les compositions des milieux QMOD et BAP complet figurent aux tableaux 3.2 et 4.3.

Tableau 2 - Liste des souches de *Frankia* utilisées

Souches	Nom	Hôte d'origine	Provenance	Laboratoire d'isolement	Références
Br	ORS020608	<i>C. equisetifolia</i>	Brésil	ORSTOM ⁽¹⁾ Dakar, Sénégal	H.G. Diem (non publié)
CeF	ORS020607	<i>C. equisetifolia</i>	Floride	ORSTOM Dakar, Sénégal	H.G. Diem (non publié)
CJ.1.82	ORS021001	<i>C. equisetifolia</i>	Thaïlande	ORSTOM Dakar, Sénégal	Diem et al., (1983)
ALI ₁	HFP022801	<i>A. lehmanniana</i>	Australie	Harvard Forest, Massachu.	Zhang et Torrey, (1985)
Dec	CFN022901	<i>A. decaisneana</i>	Sénégal(*)	BSFT ⁽²⁾ Nogent s/Marne	B. Sougoufara et H.G. Diem (non publié)
TA	ORS022602	<i>A. torulosa</i>	Australie	ORSTOM Dakar, Sénégal	H.G. Diem (non publié)
URU2	CFN022302	<i>A. verticillata</i> (= <i>C. stricta</i>)	Uruguay(*)	BSFT Nogent s/Marne	B. Sougoufara et H.G. Diem (non publié)

(1) ORSTOM : Institut Français Scientifique pour le Développement en Coopération

(2) BSFT : Laboratoire de biotechnologie des symbioses forestières tropicales

(*) Souches de *Frankia* isolées d'*Allocasuarina* sp. par nous-mêmes.

Tableau 3 - Solution oligo éléments utilisés dans le milieu QMOD et BAP

	Concentration en g dans un litre d'eau
H ₃ BO ₃	2,86
Mn Cl ₂ , 4H ₂ O	1,81
Zn SO ₄ , 7H ₂ O	0,22
Cu SO ₄ , 5H ₂ O	0,08
Na ₂ O ₄ Mo, 2H ₂ O	0,025
Co SO ₄ , 7H ₂ O	0,001

Tableau 3.1 - Tampon utilisé dans le milieu QMOD

	Concentration en g dans un litre d'eau
K ₂ HPO ₄	30
Na H ₂ PO ₄	20

Tableau 3.2 - Milieu QMOD utilisé comme milieu de culture de *Frankia* (Lalonde et Calvert en 1979)

	Concentration en g dans un litre d'eau	Dose en ml/l
Extrait de levure	0,5	
Bactopeptone	5,0	
Glucose	10,0	
Mg SO ₄ .7H ₂ O	0,2	
KCl	0,2	
Lécithine	0,005	
Fe Na EDTA	0,01	
Oligo éléments (tableau 3)		1
Tampon QMOD (tableau 3.1)		10

NB : Lorsque nécessaire, ajouter 0,1 g/l de charbon actif Merck 2186. Pour solidifier, ajouter du Bitek agar Difco à 0,8%.

Tableau 4 - Solution de vitamines M6B utilisée dans la culture de *Frankia*

	Concentration en g/100 ml d'eau distillée
Thiamine	1
Acide nicotinique	5
Pyridoxine	5

Tableau 4.1 - Solution de vitamines utilisée dans le milieu BAP

Ajouter à 100 ml de la solution de vitamines M6B (tableau 4)

- 1 ml de biotine en solution à 4,5 mg/2 ml d'eau
- 1 ml d'acide folique en solution à 5 mg/1 ml d'eau
- 1 ml de pantothénate de Ca à 5 mg/5 ml d'eau

Tableau 4.2 - Tampon BAP utilisé dans le milieu BAP

	Concentration en g dans un litre d'eau
KH ₂ PO ₄	136,09 (1)
K ₂ HPO ₄	174,18 (2)

NB : Ensuite mélanger 560 ml de (1) et 320 ml de (2), puis ajuster le pH à 6,7 à l'aide des deux solutions.

Tableau 4.3 - Milieu BAP utilisé comme milieu de culture de *Frankia* (d'après Murry et al., 1984)

	Concentration en g dans un litre d'eau	Dose en ml/l
Mg SO ₄ , 7H ₂ O	0,05	
Ca Cl ₂ , 2H ₂ O	0,01	
NH ₄ Cl	0,267	
Propionate de Na	0,48	
Fe Na EDTA	0,01	
Oligo éléments (tableau 3)		1
Vitamines BAP (tableau 4.1)		1
Tampon BAP (tableau 4.2)		10

NB : Le tampon BAP doit être stérilisé à part. Ajuster le pH à 6-7-6-8. Pour solidifier, ajouter du Bitek agar Difco à 0,8%. Lorsque nécessaire, ajouter 0,1 g/l de charbon actif Merck 2186.

2.2.- Souches de champignons ectomycorhiziens

La liste des souches utilisées est donnée au tableau 5. La première, PR86 nous a été fournie par Paul Reddell de Davies Laboratory Aitkenvale, Townsville, QLS. Les deux autres PSK₁ et PS₃ nous ont été fournies par le laboratoire de microbiologie du centre ORSTOM de Dakar, Sénégal.

En outre nous avons isolé deux souches de champignons ectomycorhiziens récoltés sous un *Casuarina equisetifolia* à Notto et à Diamo, au Sénégal.

Nous avons cultivé toutes ces souches de *Pisolithus sp.* à 28°C dans un milieu MNM (1969) dont la composition figure au tableau 6.

Tableau 5 - Liste des souches de champignons ectomycorhiziens utilisées

Souches	Nom	Hôte d'origine	Provenance	Laboratoire d'isolement	Références
PR86	PR86	<i>Eucalyptus sp.</i>	Lobethal	Davies Lab. Aitkenvale Townsville, QLD	P. Reddell (non publié)
PS ₃	ORSX004	<i>E. camaldulensis</i>	Djibélor	ORSTOM Dakar, Sénégal	D. Thoen (non publié)
PSK ₁	ORS7870	<i>R. holosericeum</i>	Sangalkam	ORSTOM Dakar, Sénégal	M. Ducousso (non publié)
PSD ₁	nd. (1)	<i>C. equisetifolia</i>	Diamo	ORSTOM Dakar, Sénégal	B. Sougoufara (non publié)
PSN ₁	nd.	<i>C. equisetifolia</i>	Notto	ORSTOM Dakar, Sénégal	B. Sougoufara (non publié)

(1) nd : non déterminé, souches de champignons ectomycorhiziens isolées par nous-mêmes.

Tableau 6 - Milieu de culture Melin et Norkrans modifié par Marx (1969)

	Concentration en g dans un litre d'eau
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,25
Extrait de malt	3
Glucose	10
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,05
KH_2PO_4	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,15
NaCl	0,025
Thiamine-HCl 1mg/ml	1 ml
Citrate ferrique 1%	1,2 ml
Agar	16
Ajuster le pH à 5,5	

3 - SOLS

Nous avons axé notre étude sur trois types de sol : un sol dior de surface prélevé à Bel-Air à la station ORSTOM, un sol dunaire dit sol de Cambérène prélevé sur les dunes vives de Cambérène au Sénégal et un sol interdunaire situé au lieu-dit Notto ayant servi de site de plantation. Les principales caractéristiques physico-chimiques sont résumées aux tableaux 7 et 8.

Tableau 7 - Caractéristiques physico-chimiques des sols de Bel-Air et Cambérène (Sénégal)

	Bel-Air	Cambérène
Argile %	4,40	0,75
Limon fin %	0,90	0,75
Sable fin %	92,70	96,97
Carbone %	0,30	0,12
Azote %	0,027	0,010
P ass. ppm	0,105	0,022
P total ppm	0,276	0,080
pH	7,0	6,0

NB : Le sol de Bel-Air est un sol peu évolué issu d'une roche mère constituée de sable dunaire quaternaire (Sable de Cambérène).

- l'azote total a été dosé après minéralisation à l'acide sulfurique concentré ;
- le P assimilable (Bel-Air) a été dosé après extraction à NaHCO_3 0,5 M selon la méthode Olsen (Jackson, 1958) ;
- le P total a été dosé après minéralisation à HNO_3 ;
- le pH a été mesuré dans un mélange Sol-Solution de KCl 1N (1/2,5 ; V/V).

Toutes ces analyses ont été effectuées au laboratoire de chimie de l'ORSTOM de Dakar (Sénégal).

Tableau 8 - Caractéristiques physico-chimiques du sol de Notto (Sénégal)

	F1 ⁽¹⁾	F2	F3	F4	T1 ⁽²⁾	T2	T3	T4
Argile %	1,9	2,5	1,7	1,8	1,3	2,1	1,5	2,3
Limon fin %	0,5	0,5	1,2	1,3	0,8	1,3	1,0	1,3
Sable fin %	33,0	34,8	34,7	27,2	31,4	35,0	28,7	33,4
Carbone $^{\circ}/_{\infty}$	5,8	7,8	6,8	6,4	6,8	12,2	5,4	7,0
Azote $^{\circ}/_{\infty}$	0,47	0,71	0,65	0,55	0,57	1,21	0,65	0,57
P.ass.ppm	25	13	13	13	13	61	21	36
P.total ppm	170	180	200	170	170	320	160	210
pH	5,7	5,1	5,7	5,2	6,0	5,9	6,0	5,3

(1) F1, F2, F3, F4 : parcelles inoculées avec *Frankia*.

(2) T1, T2, T3, T4 : parcelles non inoculées - (témoin).

NB : Toutes ces analyses ont été effectuées au laboratoire de chimie de l'ORSTOM de Dakar (Sénégal).

4 - METHODES D'ISOLEMENT DE *FRANKIA*

4.1.- Historique de l'isolement de *Frankia*

Les symbioses actinorhiziennes sont connues depuis très longtemps, puisque dès 1866 un microbiologiste russe publiait une étude sur ces symbioses dans les Mémoires de l'Académie Impériale des Sciences de Saint-Pétersbourg (Woronin, 1866). Pendant de nombreuses années, on a pensé qu'il était impossible d'isoler en culture pure l'endophyte *Frankia* des nodules de plantes actinorhiziennes et que *Frankia* était un symbiote obligatoire. Mais curieusement il a fallu plus d'un siècle avant que l'on parvienne à isoler et cultiver le microorganisme symbiotique *Frankia*. C'est à un groupe de l'Université de Harvard au Massachusetts que revient le mérite d'avoir réalisé le premier isolement de *Frankia* à partir de nodules de *Comptonia peregrina* (Callahan et al., 1978). Ce succès obtenu a été le point de départ de nombreuses tentatives d'isolement y compris celui de *Frankia* de *Casuarina* (Diem et al., 1982 ; 1983).

Contrairement à l'isolement de *Rhizobium*, l'isolement de *Frankia* est difficile en raison :

- de la croissance très lente de *Frankia* et de ses exigences nutritionnelles ;
- de l'invasion très fréquente des milieux de culture par des agents contaminants, notamment champignons,

- probablement aussi de la difficulté du passage du stade symbiotique (dans le nodule) au stade saprophytique (dans le milieu de culture) (H.G. Diem, communication personnelle).

Quant à l'isolement de souches de *Frankia* infectives et compatibles, la difficulté d'isolement semble varier avec la plante hôte. Ainsi il est relativement facile d'isoler *Frankia* de *Comptonia* sp. ou *Colletia* sp. Mais il est beaucoup plus difficile d'isoler *Frankia* de Casuarinacées. L'isolement de *Frankia* de *Coriaria* sp. n'a pas encore été réalisé.

4.2.- Piégeage de *Frankia* d'*Allocasuarina*

Ainsi que nous l'avons déjà indiqué au paragraphe 2.1, sur les sept souches de *Frankia* utilisées, personnellement nous en avons isolé deux à partir de nodules frais. Il s'agit des souches de *Frankia* isolées d'*Allocasuarina* sp. (CFN022901 : syn Dec) et (CFN022302 : syn URU2).

Pour disposer de nodules jeunes, nous avons utilisé une méthode de piégeage classique qui a consisté à cultiver séparément deux lots de plantes hôtes constitués par *Allocasuarina decaisneana* et *Allocasuarina verticillata* dans une dizaine de pots de 5 l en terre cuite, contenant chacun du sol sableux stérile dit sol de Bel-Air de la station ORSTOM de Dakar, Sénégal.

L'inoculation a été effectuée en apportant respectivement, au premier lot une suspension de nodules broyés de *Casuarina equisetifolia* récolté dans le parc forestier de Hann et au second lot une suspension de nodules broyés de *Allocasuarina verticillata* en provenance d'Uruguay. Pour obtenir cette suspension, nous avons broyé dans 500 ml d'eau distillée stérile, 100 g de nodules frais préalablement lavés et abondamment rincés avec de l'eau déminéralisée. Pendant toute la durée du piégeage, les plantes hôtes ont été arrosées quotidiennement à l'eau stérile ; en outre une fois par semaine, on a apporté à chaque plante 50 ml d'une solution Hoagland (Hoagland et Arnon, 1938) diluée au 1/4 sans azote (Tableau 9).

Après 6 mois de culture, on a enlevé des pots les jeunes plantes de *Allocasuarina decaisneana* et *Allocasuarina verticillata* pour observer les systèmes racinaires. Toutes les plantes ont nodulé. Les nodules ainsi obtenus ont été utilisés pour l'isolement de *Frankia*.

Tableau 9 - Le milieu de Hoagland et Arnon (1938) dilué au 1/4 sans azote (H.A.)

	Concentration en g dans un litre d'eau
K ₂ SO ₄	0,109
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,123
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0,029
CaSO ₄ , 2H ₂ O	0,086
FeNa EDTA 0,2%	2 ml
Solution oligo éléments (tableau 3)	0,25 ml
Ajuster le pH à 6,8	
NB : Pour avoir le milieu nutritif azoté, ajouter 17 mg de (NH ₄) ₂ SO ₄ au milieu H.A.	
La composition du milieu gélosé incliné en culture hydroponique a été la suivante :	
- Solution H.A.	1 litre
- Bitek Agar Difco	16 g
- Charbon actif Merck référence 2186.....	20 g
- CaCO ₃	1 g
Stériliser à 120°C pendant 20 minutes.	

4.3.- Isolement de *Frankia*

L'isolement de *Frankia* a été effectué suivant la technique de H.G. Diem fondée sur la méthode des fragments de nodules superficiellement stérilisés au tétr oxyde d'osmium (Lalonde et al. 1981).

Sitôt prélevés, les lobes des nodules de chaque plante hôte ont été lavés puis stérilisés superficiellement avec une solution aqueuse de OsO₄ à 3% pendant 2 à 3 min. Après plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile, ces lobes ont été découpés aseptiquement en fragments minuscules. On a ensuite fait une suspension de ces fragments dans 3-5 ml d'eau distillée stérile que l'on a étalée sur 3 à 6 boîtes de Petri contenant un milieu de croissance QMOD ou BAP complet gélosé fondu à 40°C. Immédiatement après on a coulé à 45°C une petite quan-

tité (environ 2 ml) du même milieu QMOD ou BAP complet gélosé. Les boîtes de Petri ainsiensemencées ont été scellées avec du parafilm et incubées à 28°C.

4.4.- Observations des colonies de *Frankia*

Les observations ont été faites à la loupe au bout de 5 à 6 semaines. Après deux mois d'incubation à température constante, les fragments (environ 8%) non contaminés ayant apparu comme porteurs d'une colonie de *Frankia* ont été extraits aseptiquement de la boîte de Petri et introduits dans des piluliers de 15 ml contenant 5 ml de milieu QMOD ou BAP complet liquide. Les colonies encore fixées aux fragments de lobes et à la gélose adhérente se sont développées lentement. Au bout de 1-2 mois on a introduit stérilement dans les piluliers des barreaux aimantés de 1 cm de long de façon à disperser par agitation les colonies. Les suspensions ainsi obtenues ont constitué des précultures qui ont été utilisées pour ensemenecer un milieu neuf QMOD ou BAP complet gélosé ou liquide.

5 - CULTURE IN VITRO DE *FRANKIA*

Pour multiplier et entretenir la collection de souches de *Frankia* avec laquelle nous avons procédé aux épreuves d'infectivité et d'effectivité, on est parti de 100 ml d'une culture âgée de 4 semaines, par souche de *Frankia*, que l'on a fait décanter de façon à conserver seulement 5-10 ml de milieu de culture. Le volume restant a été transféré stérilement dans un tube de centrifugation de 25 ml. Puis on a remis en suspension le culot de centrifugation dans un flacon sérum de 140 ml contenant 10-20 ml d'eau physiologique (8 g/l de NaCl) et un barreau aimanté stérile long de 5 cm pour homogénéiser. La suspension ainsi obtenue constituant une pré-culture a été introduite à la dose de 5 ml au moyen d'une pipette stérile dans 2-4 flacons Erlenmeyer de 250 ml contenant 20 ml de milieu QMOD ou BAP complet liquide.

6 - ETUDE PRELIMINAIRE DE LA CROISSANCE DE *FRANKIA IN VITRO*

Afin de disposer d'une technique d'inoculation fiable, nous avons étudié la croissance *in vitro* de deux souches de *Frankia* du genre *Casuarina* : la souche Cj.1.82 (syn : ORS021001) et la souche Br (syn : ORS020608).

Nous avons cultivé ces souches dans le milieu BAP complet liquide et périodiquement on a déterminé la teneur en protéines totales, le nombre d'unités capables de conduire à la formation de colonies de *Frankia in vitro* (par dilution et étalement sur milieu BAP complet gélosé) ou *in planta* (nombre le plus probable d'après le test d'infection sur plante).

Les précultures obtenues comme indiqué au paragraphe 4.3.3. à partir des souches de *Frankia* Cj.1.82 et Br âgées de 4 semaines ont été réparties séparément dans deux lots constitués de tubes de verre de (20 x 150 mm) à raison de 2 ml par tube. Ensuite les tubes ont été incubés à 28°C en conditions non agitées. Les observations ont été faites à 3, 5 et 8 semaines.

A chaque date d'observation, on a prélevé 4 tubes par lot et par souche de *Frankia*. Après centrifugation, le culot cellulaire de chaque tube a été récupéré, lavé puis remis en suspension dans 3 ml d'eau stérile. La suspension ainsi obtenue a été répartie comme suit : 1 ml pour faire le dosage des protéines suivant la méthode de Lowry et al. (1951), 1 ml pour le dénombrement sur boîte de Petri et 1 ml pour le test d'infection (Alexander, 1965), ces deux dernières opérations ayant fait l'objet d'une dilution allant de 10^{-1} à 10^{-4} .

Pour chaque dilution, on aensemencé huit boîtes de Petri à raison de 1 ml par boîte par mélange avec 9 ml de BAP complet gélosé fondu à 40°C, une moitié contenant le milieu BAP, l'autre moitié contenant le même milieu auquel on a ajouté du charbon actif (tableau 4.3) et inoculé environ huit jeunes plantes cultivées dans des gaines de polyéthylène (23 x 11 cm) suivant la méthodologie décrite au paragraphe 10.1.4. Toutes les 2 semaines, on a effectué le dénombrement des colonies sur boîte et au bout de 2 mois le comptage des nodules sur les systèmes racinaires.

7 - METHODE DE PRODUCTION EN MASSE DE LA CULTURE DE *FRANKIA*

Jusqu'à présent, on a utilisé surtout la culture en batch sans agitation et sans aération. Etant donné qu'on ne peut pas utiliser cette méthode pour produire les quantités importantes de *Frankia* nécessaires à la production d'inoculum, nous avons utilisé la méthode de culture biphasique mise au point par Diem et Domergues (1990). Ce dispositif de culture massive de *Frankia* a été reproduit à la figure 1.

8 - METHODE D'INCLUSION DU MICROORGANISME *FRANKIA* DANS UNE MATRICE POLYMERIQUE (PEM)

On peut utiliser divers polymères pour inclure les cellules microbiennes dans une matrice polymérique, le produit obtenu étant désigné sous le terme d'inoculum polymérique PEM ou plus brièvement inoculum PEM (Polymer-entrapped microbial cells) (Diem et al., 1988).

Comme polymère, nous avons utilisé l'alginate de sodium S 170⁽¹⁾. Nous avons préparé une solution à 5% (poids/volume) de ce composé dans l'eau distillée ; et nous avons mélangé cette solution avec le même volume de la culture de *Frankia* âgée de 3 semaines. Nous avons fait tomber goutte à goutte le mélange obtenu dans une solution 0,1-0,2 M de CaCl_2 sous agitation magnétique. En entrant en contact avec la solution de CaCl_2 , chaque goutte forme une bille indépendante (diamètre 1-4 mm) résultant du pontage de l'alginate par les ions Ca^{2+} . On a maintenu les billes dans la solution de CaCl_2 pendant 45 min, puis on les a récoltées pour les laver plusieurs fois dans l'eau distillée stérile avant de les faire sécher pendant 48 h sous une hotte à flux laminaire.

(1) Alginate S170, SATIA, 15 avenue d'Eylan, 75116 Paris, France.

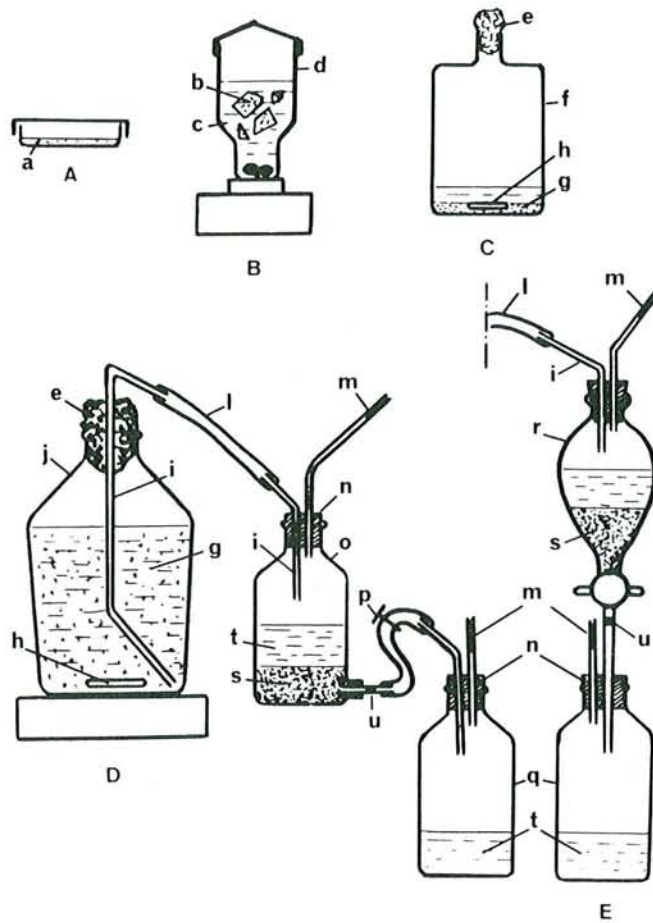


Figure 1 - Protocole retenu pour la culture massive de *Frankia* (d'après Diem et Dommergues, 1990)

Proposed scheme for the mass production of *Frankia* inoculants for large-scale inoculation trials of *Casuarina*. a, *Frankia* cultured on agar nutrient medium; b, pieces of agar medium containing *Frankia* colonies; c, sterile water; d, Waring blender; e, cotton wool plug; f, Roux bottle; g, *Frankia* culture in liquid nutrient medium; h, stirring bar; j, growth vessel; i, glass tubing; k, magnetic stirrer; l, Tygon tubing; m, cotton wool filtered outlet tube; n, rubber stopper; o, separatory bottle; p, screw clamp; q, collection bottle; r, separatory funnel; s, concentrated suspension of *Frankia* cells; t, culture medium (liquid phase); u, 1.0-mm-mesh screen. The capital letters A,B,C,D,E refer to the different steps of the procedure (see text).

L'inoculum ainsi fabriqué a été conservé dans les récipients fermés à la température ambiante. L'inoculum PME à base d'alginate présente trois avantages :

- 1) Son faible poids qui le rend facile à manipuler et à transporter jusqu'au site d'application ;
- 2) Il peut facilement être mélangé avec différents produits chimiques tels que les substances protectrices de type argile (kaolin) ;
- 3) Après un séchage à l'air de l'inoculum, *Frankia* peut encore survivre longtemps, environ 3-5 ans.

9 - METHODE D'ISOLEMENT DES SOUCHES DE CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZIENS

Les isollements ont été effectués sur des carpophores fermes et à l'état jeune. Les individus âgés et imbibés d'eau comme cela a été souvent le cas en saison des pluies (juillet à septembre) sont éliminés. Sur les lieux de récolte, les carpophores ont été soigneusement débarrassés du sol adhérent puis conservés dans des sachets plastiques.

Au laboratoire, on a prélevé de manière aseptique des fragments charnus du chapeau qu'on a déposés sur le milieu nutritif gélosé MNM (1969) contenu dans des boîtes de Petri. Les boîtes de Petri ont été ensuite scellées avec du Parafilm puis incubées à 28°C.

En ce qui concerne l'observation de la structure des ectomycorhizes, le système racinaire a été d'abord soigneusement rincé à l'eau distillée. Les racines enrobées de mycélium ont été traitées de la manière suivante : des coupes transversales et longitudinales ont été effectuées à main-levée, éclaircies à l'hypochlorite de sodium à 20% pendant 2 à 3 minutes et rincées à l'acide acétique à 1% avant d'être colorées au rouge Congo glycéliné 0,5%. Les coupes ont été observées au microscope photonique en lumière artificielle ou en contraste de phase interférentiel.

10 - METHODES DE CULTURE DES PLANTES

10.1.- Les plantes issues de semis

10.1.1.- Stérilisation et germination des graines

Afin d'obtenir de jeunes plantes désinfectées, on a traité les graines par immersion dans de l'acide sulfurique concentré pendant 2 à 3 minutes, puis on les a rincées abondamment à l'eau distillée stérile.

Les graines ainsi obtenues ont été mises à germer à 28°C et à l'obscurité dans des boîtes de Petri contenant environ 10 ml d'eau gélosée à 1,6%.

Au bout d'une semaine, les jeunes plantes ainsi obtenues ont été repiquées en tubes de gélose inclinée et en tubes de verre en conditions aseptiques.

10.1.2.- Culture des plantes en tubes de gélose inclinée

La technique utilisée a été celle mise au point par Gibson (Vincent, 1970).

Après germination des graines, chaque jeune plante a été mise en culture sur un tube de (22 x 220 mm) contenant une gélose nutritivée (Hoagland et Arnon, 1938) et muni d'un capuchon constitué par une feuille d'aluminium percée d'un trou. La racine a été introduite dans le tube de façon à être en contact avec la gélose, la tige restant à l'air libre (figure 2).

Le tout a été ensuite placé dans une chambre de culture de 28°C sous une lumière incidente d'environ $50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, assurée par des tubes fluorescents au néon (Philips-TL. 40 W/55). La photopériode a été de 17 h par jour.

Le milieu de Hoagland et Arnon (1938) a été utilisé aussi bien pour les tubes de gélose inclinée que pour la culture en tube des plantes.

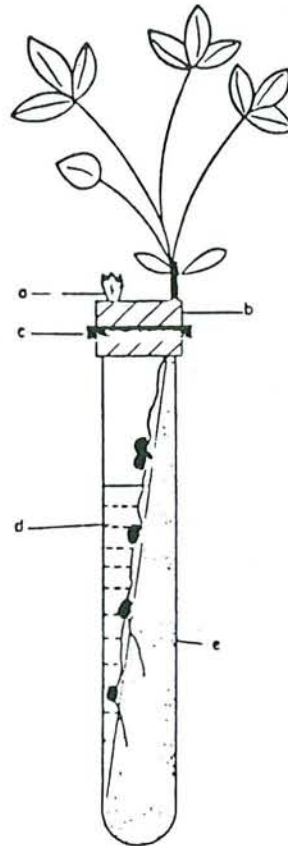


Figure 2 - Dispositif de Gibson pour tester l'infectivité (aptitude à noduler) et l'effectivité (aptitude à fixer N_2) des souches de *Frankia*

- a : bouchon pour arrosage,
 - b : feuille d'aluminium,
 - c : ruban adhésif,
 - d : solution nutritive pour la plante (solution sans N),
 - e : gélose inclinée
- (Vincent modifié, 1970).

10.1.3.- Culture des plantes dans les tubes de verre

Les synthèses mycorhiziennes ont été réalisées en tubes de verre (125 x 4 cm) dans 90 ml d'un mélange homogène composé de perlite, tourbe ⁽¹⁾ et d'eau distillée (90 : 5 : 17.5 ; V/V). Les tubes ont été stérilisés deux fois pendant 20 min à 120°C à un jour d'intervalle. Dans chaque tube, on a repiqué les jeunes plantes obtenues comme indiqué au paragraphe 10.1.1. à raison d'une plante par tube. En outre on a apporté à chaque tube, 50 ml de milieu MNM (1969) stérile. Puis les tubes ont été placés en chambre de culture. Au fur et à mesure de l'évaporation de la solution nutritive, on a ajouté la quantité nécessaire pour rétablir le niveau initial.

10.1.4.- Culture des plantes dans les gaines de polyéthylène

Le sol utilisé a été le sol de Bel-Air. Après stérilisation à l'autoclave pendant 1 h à 120°C, le sol légèrement humidifié et additionné de billes de polystyrène de 2 mm de diamètre (1/4 billes, 3/4 sol en volume) a été soigneusement réparti dans des gaines en polyéthylène ("polybags") (23 x 11 cm). Puis on a semé des graines de *Casuarina* préalablement traitées à l'acide sulfurique, comme indiqué au paragraphe 10.1.1. dans les gaines de polyéthylène à raison de deux graines par gaine.

Durant toute la durée de leur séjour en pépinière, les jeunes plantes ont été quotidiennement arrosées à l'eau du robinet. En outre, une fois par semaine, on a apporté à chaque plante 50 ml d'une solution nutritive Hoagland et Arnon (1938) diluée au 1/4 sans azote.

(1) Le tourbe utilisée est une tourbe brune, récoltée à Mboro (Sénégal).

10.2.- Plantes issues de multiplication végétative par les techniques conventionnelles

10.2.1.- Isolement des clones de *Casuarina equisetifolia*

A partir d'un lot de graines en provenance d'Hawaï, on a ensemencé environ 400.000 gaines en polyéthylène contenant du sol de Cambérène non stérile additionné de billes de polystyrène. L'inoculation a été effectuée avec une suspension de nodules broyés obtenue suivant la méthode décrite au paragraphe 11.2. En outre, on a apporté toutes les deux semaines dans chaque gaine 50 ml d'une solution nutritive Hoagland et Arnon (1938) diluée au 1/4 sans azote. Après 7 mois de culture, on a déterré les jeunes plantes pour observer les systèmes racinaires. En définitive, 76 jeunes plants de *Casuarina equisetifolia* ont été retenus, puis classés en quatre niveaux de nodulation : 19 individus hypernodulés (nombre de nodules > 200) ; 49 individus moyennement nodulés (nombre de nodules compris entre 80 et 120) ; 5 individus hyponodulés (nombre de nodules compris entre 50 et 30) ; 3 individus pauvrement nodulés (nombre de nodules < 15).

Ensuite on a multiplié par bouturage les individus d'arbres représentatifs des quatre catégories à partir de fragments de rameaux photosynthétiques (environ une trentaine par individu représentatif) de 4-5 cm prélevés sur les axes d'ordre 1 et 2 au 1/3 supérieur de chacune des jeunes plantes choisies.

10.2.2.- Bouturage en milieu solide

Les explants soigneusement lavés à l'eau du robinet, puis abondamment rincés à l'eau distillée stérile, ont été d'abord traités à la "Rootone F" ⁽¹⁾, complexe d'hormones végétales de synthèse. Le traitement a consisté à enfoncer la base humide de chaque explant dans la "Rootone F" sur une longueur de 3 mm. Ensuite les explants ont été mis en culture dans des cuvettes en plastique conte-

(1) Compagnie Française de produits industriels - 28, bd Gamelinat - BP 125 - 92233 Gennevilliers

nant du sol stérile de Cambérène additionné de billes de polystyrène suivant la méthode décrite au paragraphe 9.1.4. Toutes les deux semaines, on a apporté à chaque bouture 50 ml d'une solution nutritive de Hoagland et Arnon (1938) stérile, diluée au 1/4 sans azote. En outre, on a ajouté, lorsque nécessaire, de l'eau distillée stérile en quantité suffisante pour maintenir l'humidité du sol à la capacité au champ. Les cuvettes ont été recouvertes d'une feuille de polyéthylène transparente, puis placées dans une chambre de culture.

Après un mois de culture environ, 90% des boutures ont été enracinées. La longueur des racines formées était comprise entre 10 et 14 cm, le nombre de racines par bouture variant entre 1 et 3.

10.2.3.- Bouturage en milieu liquide (boutures flottantes)

Les explants ont été traités à la "Rootone F" puis insérés à égale distance les uns des autres dans une plaque de polystyrène expansé de 90 mm d'épaisseur, en prenant soin de faire dépasser leur base de 1 cm.

Au préalable, la plaque de polystyrène a été percée de trous au moyen d'une aiguille chauffée, puis stérilisée par trempage pendant 3 h dans de l'eau de javel (1 l d'hypochlorite de soude 12,5% de chlore actif, dilué dans 3 l d'eau). Ensuite la plaque de polystyrène a été posée sur une solution nutritive de Hoagland et Arnon (1938) stérile, diluée au 1/4 sans azote contenue dans une cuvette en plastique stérile. L'ensemble a été recouvert d'une feuille de polyéthylène puis placé dans une chambre de culture (figure 3). La solution nutritive a été renouvelée chaque semaine.

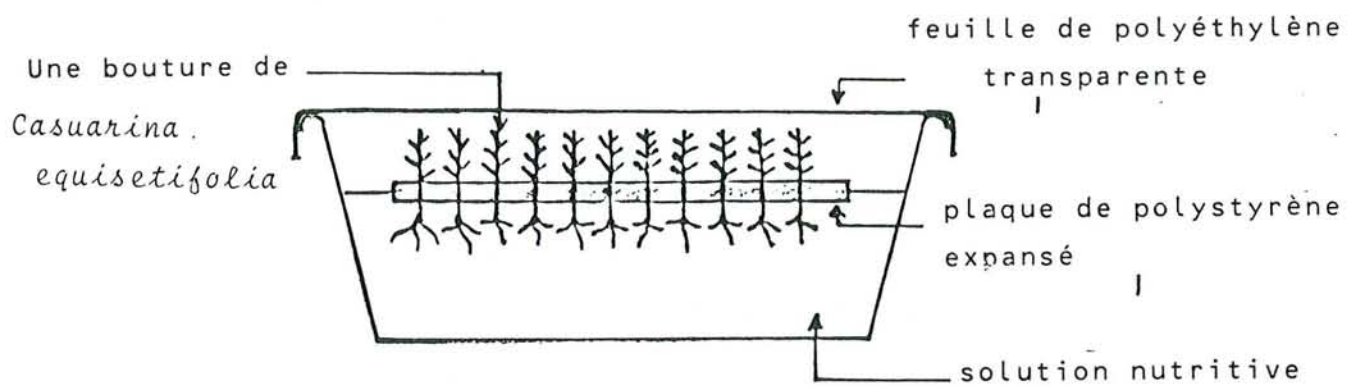


Figure 3 - Dispositif dit des boutures flottantes

10.2.4.- Culture des plantes dans les récipients de 15 l et 50 l

On a utilisé deux sols : le sol de Cambérène (récipients de 15 l), le sol de Bel-Air et le sol de Cambérène (récipients de 15 l et de 50 l). La stérilisation et l'apport de billes de polystyrène ont été effectués suivant la méthode décrite au paragraphe 10.1.4. Quand les boutures de chacun des clones obtenus comme indiqué au paragraphe 10.2.2.1. ont été âgées de 3 mois, on les a plantées dans les récipients à raison d'une bouture par récipient. Suivant l'une et l'autre des expériences effectuées, on a utilisé trois clones α , β et S ensemble et β seul. Etant donné que les sols utilisés sont pauvres en éléments minéraux, on a apporté au début de l'expérience 5 g de K_2HPO_4 par récipient. En outre, toutes les deux semaines on a apporté à chaque plante 50 ml de la solution Hewitt (1966) dont la composition figure au tableau 10.

Tableau 10 - Le milieu de Hewitt (1966)

	Concentration en g dans un litre d'eau	Doses ml/l
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2,230	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,250	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,29	
H_3BO_3	3,100	
NaCl	5,850	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,121	

10.2.5.- Culture des plantes dans les microparcelles de $1m^2$

Il s'agit de cuves en ciment de $1 m^3$ (de 1 m de profondeur et de section 1 x 1 m) avec un fond étanche. Ces cuves ont été construites sur place de sorte qu'elles soient enfoncées de 85 cm dans le sol et le dépassent de 15 cm. On les a remplies avec du sol de Cambérène non stérile additionné de billes de polystyrène de 2 mm de diamètre (1/4 billes - 3/4 sol en volume). Après remplissage, la stérilisation a été effectuée par fumigation au bromure de méthyle ⁽¹⁾ à raison de 113 g par m^3 de sol.

(1) Dow FUME M. C-2 penetrating fumigant : the Dow Chemical Company, Midland Michigan 48640.

Quand les boutures du clone β obtenues comme indiqué au paragraphe 10.2.2. ont été âgées de 3 mois, on les a plantées dans les microparcelles à raison d'une bouture par microparcelle. En outre on a apporté au début de l'expérience, à chaque microparcelle, une fertilisation P et K et une solution nutritive dans les proportions indiquées au paragraphe 10.2.4.

10.3.- Plantes issues de multiplication végétative par les techniques de micropropagation

En fait, nous avons multiplié végétativement les individus d'arbres sélectionnés en fonction de leurs caractéristiques particulières (par exemple, aptitude à la nodulation). La multiplication végétative a été assurée par les techniques de micropropagation à partir d'explants sous forme de fragments de rameaux photosynthétiques (Torrey et Berg, 1988) ou d'inflorescences femelles immatures (IFI).

10.3.1.- Micropropagation à partir d'explants sous forme de rameaux photosynthétiques de *Casuarina equisetifolia*

Des fragments d'une longueur de 10 à 12 mm constitués chacun de trois verticilles squamiformes ont été soigneusement lavés à l'eau courante. Ensuite les fragments ont été désinfectés pendant 30 min dans une solution aqueuse de SDS ⁽²⁾ 0,01%, ce détergent facilitant la désinfection ultérieure. Celle-ci a été effectuée par trempage des explants pendant 1 min dans une solution aqueuse de HgCl_2 0,1%. Les explants ont été rincés abondamment à l'eau distillée stérile avant d'être introduits dans des tubes de culture de (24 x 150 mm) contenant 20 ml d'une solution nutritive gélosée. Les paniers contenant les tubes ont été entreposés dans une chambre de culture de 28°C sous une lumière incidente d'environ $50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ assurée par des tubes fluorescents au néon (Philips-TL. 40W 55) avec une photopériode de 17 h par jour.

10.3.2.- Micropropagation à partir d'inflorescences femelles immatures (IFI)

Les explants ont été constitués par des inflorescences femelles immatures désignées sous le terme de IFI. Les IFI sont récoltées 3-4 semaines avant leur floraison sur un arbre femelle, âgé de 10 à 15 ans et cultivé à la station ORSTOM, Dakar, Sénégal. Une IFI mesure 6 mm et comprend 2 régions : la partie supérieure ovoïde de 1 mm de large, composée de nombreuses bractées, chacune ayant à l'aisselle un méristème floral (Flores et Moseley, 1982) et une partie basale cylindrique qui porte des méristèmes végétatifs à l'aisselle de chaque bractée. Dans les conditions climatiques de Dakar, la floraison a lieu en février-mars. Celle-ci peut être prolongée pendant 6 à 8 mois en arrosant régulièrement les arbres, ce qui permet une récolte des IFI pendant une longue période de l'année. Sitôt prélevées, le lavage et la désinfection des IFI ont été effectués suivant la méthode décrite au paragraphe 10.3.1. Ensuite les IFI ont été placées verticalement, apex vers le haut, dans des boîtes de Petri (environ 20 par boîte) contenant le milieu de culture gélosé. Les boîtes scellées au Parafilm ont été entreposées dans une chambre de culture.

10.3.3.- Milieux de culture

Quatre milieux de culture ont été utilisés :

10.3.3.1.- Le milieu (A) d'induction de la caulogénèse : le milieu de Murashige et Skoog (1962) additionné de vitamines (Nitsch et Nitsch, 1965), 30 g.litre⁻¹ de saccharose, 0,01 mg.litre⁻¹ d'acide α -naphtalène acétique (ANA), 6-benzylaminopurine (BAP de 2 à 3 mg.litre⁻¹ (tableau 11).

10.3.3.2.- Le milieu (B) d'élongation : c'est le milieu (A) additionné de charbon actif Merck (2186) à raison de 20 g.litre⁻¹.

10.3.3.3.- Le milieu (C) d'enracinement : c'est le milieu (A) dépourvu de BAP et de charbon actif. Les essais de rhizogénèse ont été tentés avec de l'ANA aux concentrations suivantes : 0,01 ; 0,02 ; 0,03 et 0,05 mg.litre⁻¹.

Tous les milieux ont été ajustés à pH 5,5 avant d'être solidifiés avec du Bitek Agar difco à 0,8%. La stérilisation a été effectuée pendant 30 min à 110°C.

Tableau 11 - Le milieu de Murashige et Skoog (1962) utilisé comme milieu de culture in vitro

A - Solutions de base	
Macro-éléments de Murashige et Skoog (solution 1)	Concentration en g dans 1,5 litre d'eau distillée
NH ₄ NO ₃	20,62
KNO ₃	23,75
CaCl ₂ .2H ₂ O	5,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	4,62
KH ₂ PO ₄	2,12
Micro-éléments de Murashige et Skoog (solution 2)	Concentration en mg dans 1 litre d'eau
H ₃ BO ₃	620
MnSO ₄ .4H ₂ O	2230
ZnSO ₄ .4H ₂ O	86
KI	83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,5
CoCL ₂ .6H ₂ O	2,5
Fe.EDTA d'après Lin et Staba (1961) (solution 3)	Concentration en mg dans 100 ml d'eau distillée
Na ₂ EDTA	74
FeSO ₄ .7H ₂ O	55,7
Solution de vitamines d'après Nitsch et Nitsch (1965) (X 10) (solution 4)	Concentration en mg dans 50 ml d'eau distillée
Mésoinositol	1000
Glycine	20
Acide nicotinique	50
Pyridoxine HCl	5
Thiamine HCl	5
Acide folique	5
Biotine	0,5
Pantothénate de Ca	10
NB : Pour dissoudre, ajouter quelques gouttes de NaOH 1N	
B - Milieu de culture	
Solution 1 macro-éléments	200 ml/l
Solution 2 micro-éléments	10 ml/l
Solution 3 FeEDTA	5 ml/l
Solution 4 solution de vitamines	5 ml/l
Saccharose	30 g/l
Charbon actif référence Merck 2186	20 g/l
- ANA, BAP	q.s.p.
- Agar	8 g/l
- Eau distillée	1 litre
Ajuster le pH à 5,6	

11 - METHODES D'INOCULATION

11.1. - Inoculation avec une suspension de nodules broyés

Préalablement au semis, l'inoculation a été réalisée en arrosant le milieu de culture avec une suspension obtenue en broyant finement dans 40 litres d'eau distillée 2 kg de nodules frais récoltés dans le parc forestier de Hann, Dakar, Sénégal.

11.2.- Inoculation avec les souches de *Frankia*

Au moment de la mise en place des semis ou des boutures, on a procédé à l'inoculation en apportant sur les racines de chaque jeune plante ou bouture 2 ml d'une culture de *Frankia* âgée de 3 semaines équivalente à 20 μ g de protéines (Lowry et al., 1951). L'inoculation a été réalisée de la même manière pour les tubes, les gaines de polyéthylène, les récipients de culture et les buses.

11.3.- Inoculation avec les billes d'alginate

L'inoculum PEM a été appliqué aux plantes soit sous forme séchée, soit sous forme d'une pseudo-solution obtenue en mettant les billes d'alginate (cf. paragraphe 8) dans une solution tampon (0,03 M KH_2PO_4 plus 0,17 M K_2HPO_4 , pH 7,4) pendant 4-8 h.

11.4.- Inoculation avec les souches de champignons ectomycorhiziens

L'inoculation a eu lieu lorsque les jeunes plantes ont bien développé leur système racinaire. Deux implants mycéliens préalablement régénérés par repiquage sont déposés à la surface du substrat contenu dans les tubes de verre.

12 - METHODES D'ANALYSE

12.1.- Echantillonnage et pesée des parties aériennes et souterraines des plantes

Les plantes âgées de 6 à 12 mois, ont été récoltées séparément : rameaux photosynthétiques, tiges, racines et nodules dans le cas des plantes inoculées. Par contre, avec les plantes âgées de plus d'un an, l'échantillonnage a été effectué suivant la méthode préconisée par C.B. Davey figurant au tableau 12.

Tableau 12 - Biomass sampling technique (C.B. Davey and C.A. Schenck, personal communication)

1. A random sample of trees should be taken from the planting. If the trees are uniform only 5 to 10 trees need to be sampled. If the planting is highly variable, the number of trees to be sampled may be as high as 25. Therefore if the trees are uniform and the plot size is small, 3 trees per plots should be taken. With four replications this will give 12 trees per treatment. If only a separate plot is to be used for destructive sampling, the 5 random trees will be taken at random.
2. Basic measurements to be taken for each sample tree :
 - a. DOB (diameter outside bark) at ground line
 - b. BBH (DOB at 1.4 m) above ground line
 - c. Total height of the tree
 - d. DOB at 1/4, 1/2, 3/4 of total height.
3. Sample disks, approximately 5 cm long should be taken at the 1/4, 1/2, and 3/4 total height points. These are used for obtaining the dry weight and weighted average moisture content of the whole tree.
4. The disk taken at 1/2 total height is also used for nutrient and energy analyses. This disk gives the best estimate of these variables for the entire bole (stem wood plus bark).
5. Cut all branches from the stem and determine their total green weight. Keep branches separate from the upper, mid, and lower 1/3 of the crown. Select an average branch from each third and weigh it separately with and without leaves attached.
6. Composite foliage and branch samples should be taken for moisture, nutrient, and energy content analysis.
7. Yield equations to predict tree and plantation weights, nutrient and energy contents may be developed using least squares regression. Equations based on $DBH^2 \times \text{total height}$ work well for trees with DBH ranging from 2 to 18 cm.

Additional reading and references on this subject may be found in the following paper :

Messina, M.G., R. Ballard, D.J. Frederick, and A. Clark, III. 1983. A test of a single disk for estimation of hardwood bole and branch nutrient concentrations. *Forest Science* 29:618-626.

Quel que soit l'âge, après la récolte, nous avons séché les différentes parties aériennes et souterraines des plantes à l'étuve pendant 72 h à 70°C jusqu'à poids constant avant de déterminer les masses de matière sèche, la teneur en N total et l'excès isotopique, cette dernière analyse ayant été effectuée au laboratoire de l'A.I.E.A. à Seibersdorf, Autriche, avec un spectromètre de masse VG 602 (Fiedler et Proksch, 1975).

12.2.- Evaluation de la fixation symbiotique

Il existe plusieurs méthodes pour estimer la fixation de N₂ dans les conditions réelles de culture au champ (Larue et Patterson, 1981 ; Peoples et al., 1989). Nous avons fait appel ici à trois méthodes.

12.2.1. - Dosage de l'activité nitrogénase (Postgate, 1972)

Lorsqu'un nodule fixateur de N₂ est incubé dans une atmosphère contenant au moins 10% de C₂H₂ pendant 30-120 min, les autres substrats de la nitrogénase sont inhibés par l'acétylène (Koch et al., 1967 ; Hardy et al., 1968). La quantité d'éthylène formé dans ces conditions pendant un temps donné, correspond donc au flux total d'électrons transférés par la nitrogénase ; cette dernière réduit l'acétylène en éthylène suivant la réaction :

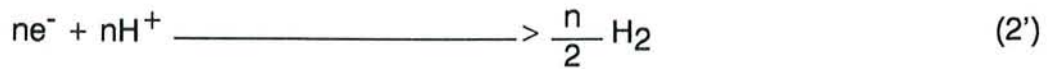


La quantité d'acétylène réduit est une mesure de l'activité réductrice de la nitrogénase, abrégée ARA (Activité Réductrice d'Acétylène).

Pendant longtemps on a admis que la réaction de fixation de N₂ était la suivante (fig.4).



En conséquence à une mole de N_2 réduit correspond 3 moles d'éthylène (Hardy et al., 1973), le rapport de conversion $C_2H_2 : N_2$ étant alors de 6 : 2. En réalité la réaction de fixation de N_2 est plus complexe et implique les deux réactions suivantes :



En additionnant les équations (2) et (2'), on obtient



le nombre d'électrons mis en jeu n'est pas de 6, mais de $(6 + n)$, le rapport de conversion de $C_2H_2 : N_2$ est donc $(6 + n)/2$, c'est-à-dire $(6 + n)e^-$ pour une mole de N_2 réduite (équation 3) et $2 e^-$ pour une mole de C_2H_2 réduite (équation 1). Suivant les systèmes fixateurs (par ex. plantes hôtes) et les conditions d'incubation (par ex. température, irradiation, flux d'électrons) la valeur de n varie de 4 à 6 (Witty et Minchin, 1988).

Dans notre travail, nous n'avons pas cherché à utiliser l'ARA pour quantifier la fixation de N_2 , mais pour classer les activités nitrogénasiques comparées de différents systèmes symbiotiques, de sorte que nous n'avons pas eu à déterminer la valeur exacte du coefficient de conversion.

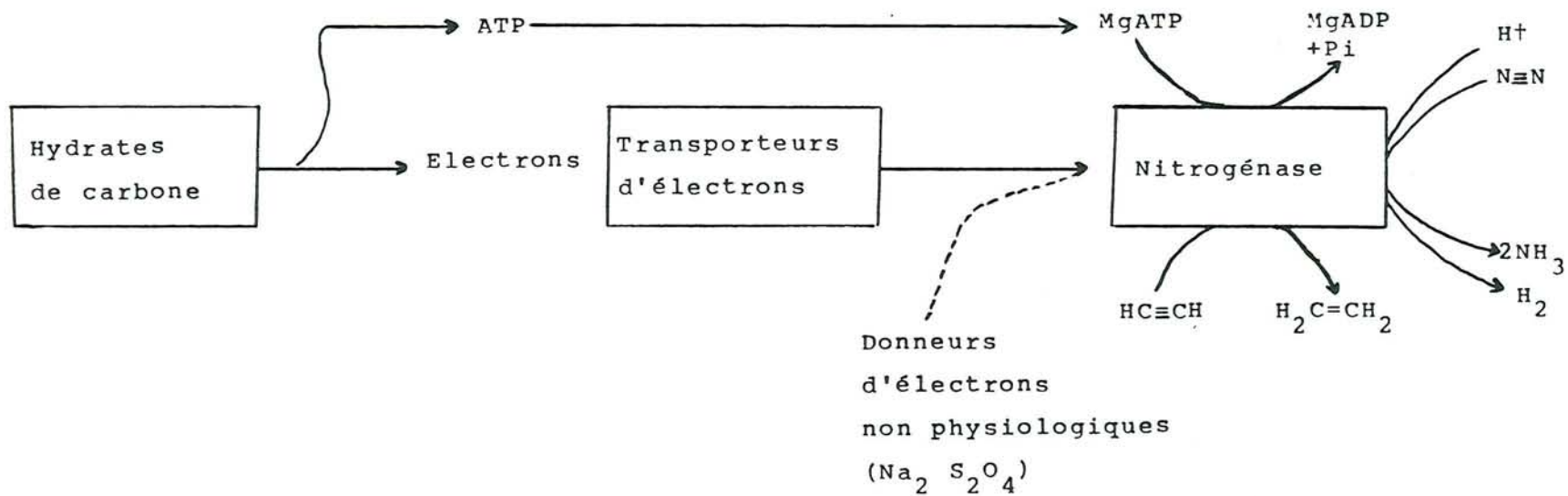


Figure 4 - Schéma du mécanisme de la fixation de N₂ par la nitrogénase (Evans et Barber, 1977)

12.2.1.1.- Incubation sous acétylène et mesures

Le système racinaire portant les nodules a été enfermé de façon étanche dans un flacon sérum de 140 ml dans lequel nous avons injecté en surpression 12 ml d'acétylène. Après 30 et 60 min d'incubation à 28°C, nous avons effectué des prélèvements gazeux de 0,5 ml que nous avons analysés au moyen d'un chromatographe à ionisation de flamme Varian Aerograph 1400, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme.

Le chromatographe était équipé d'une colonne en acier inoxydable de 150 x 0,3 cm remplie de Spherosil x 013 075, 80-100 mesh (Girdel) imprégné de 10% Na_2HPO_4 .

Les gaz apparaissent au niveau du détecteur dans l'ordre suivant : méthane, éthylène, propane et acétylène. Les débits et températures ont été ajustés de manière à obtenir une séparation correcte des constituants du mélange gazeux injecté, avec un temps de rétention minimal.

Températures :

- injecteur.....	26°C
- four colonne	60°C
- détecteur	150°C

Débit :

- azote	40 ml/min
- hydrogène.....	30 ml/min
- air	360 ml/min

Dans ces conditions, les pics d'éthylène et d'acétylène apparaissent 40 et 50 secondes après l'injection.

12.2.1.2.- Mode de calcul

La transformation des hauteurs de pics d'éthylène en nmoles C_2H_4 se fait par référence à un étalon. Une dilution étalon d'éthylène est préparée par introduction de 0,57 ml d'éthylène dans un flacon sérum de 140 ml (dilution 1/1000). La concentration de cette dilution étalon est de $10^6/22400$ nmoles C_2H_4 /ml.

L'injection au chromatographe de 0,5 ml de cette dilution donne un pic de hauteur :

$h \times A$ (A = facteur d'atténuation ; h = pic mesuré en cm).

Les hauteurs des pics étant proportionnelles aux quantités injectées, un pic de 1 cm correspond à :

$$\frac{10^6 \times 0,5}{22400} \times \frac{1}{h \times A} \text{ nmoles } C_2H_4 / \text{ cm de pic}$$

Etant donné un échantillon de volume V (ml), si l'on prélève un volume v (ml) qu'on injecte au chromatographe, on obtient un pic correspondant à $X = h_1 \times A_1$. La quantité d'éthylène totale produite est donc :

$$\frac{10^6 \times 0,5}{22400} \times \frac{1}{h \times A} \times h_1 A_1 \frac{V}{v} \text{ nmoles } C_2H_4$$

h_1 = hauteur du pic C_2H_4 en cm.

h = hauteur du pic standard en cm.

A_1 = atténuation due à l'échantillon.

A = atténuation due au témoin standard

V = volume du flacon d'incubation en ml.

v = volume injecté dans le chromatographe = 0,5 ml.

L'ARA totale est exprimée en lmoles de C_2H_4 /h/plante. L'ARA spécifique (SARA) est exprimée par unité de poids sec de nodules (nmoles C_2H_4 /h/g de nodules).

12.2.2.- Méthode par différence (Weber, 1966)

On peut admettre que N_2 fixé est représenté par la différence entre la quantité totale de N contenu dans la biomasse d'une plante fixatrice de N_2 et la quantité totale de N contenu dans une plante non fixatrice de N_2 , à condition que les plantes inoculées et les plantes non inoculées absorbent des quantités de N du sol identiques. Cette condition n'étant pas toujours remplie, on s'en rapproche toutefois sensiblement lorsque le sol utilisé est très pauvre en azote minéral ou minéralisable. Cependant dans le cas d'une culture sur un milieu absolument dépourvu en N combiné (par exemple, un sol lavé à l'acide chlorhydrique), le témoin non inoculé ne pousse pas. Les plantes inoculées tirent l'azote nécessaire à leur développement de N_2 de l'air ; leur teneur en N total représente la quantité de N_2 fixé.

12.2.2.1.- Dosage de l'azote total

Le matériel végétal à doser a été préalablement séché pendant 72 h à l'étuve à 70°C puis broyé. Le dosage a été effectué par la méthode Kjeldhal à l'aide d'un système de dosage Büchi.

La minéralisation a été réalisée dans des tubes Büchi (50 à 100 mg de matière sèche broyée par tube) en présence de 1 ml de la solution de minéralisation suivante : 1,6 g de sélénium amorphe, 1,6 sulfate de cuivre anhydre et 97 g de sulfate de sodium dissous dans 1 litre d'acide sulfurique concentré (Guiraud, 1984). Les tubes sont placés pendant 3 h dans un digesteur (Büchi 430) muni de calottes à chauffage infrarouge.

12.2.2.1.1.- Distillation et titration

Après refroidissement, le tube contenant le digestat est placé dans un distillateur (Büchi 322). Cet appareil permet d'effectuer automatiquement les opérations suivantes : adjonction d'eau et de soude au digestat, distillation puis aspiration des résidus de distillation. La titration est réalisée avec une solution d'acide chlorhydrique N/28 apportée par une burette à piston (Schott Geräte T100), contrôlée par un titrimètre à point final (Schott Geräte TR156).

12.2.2.1.2.- Calculs

Minéralisation, distillation et dosage correspondent aux réactions chimiques suivantes :



1 mole d'azote (soit 14 g) est neutralisée par 1 mole HCl. On peut donc écrire que 1 ml (N/28) HCl correspond à 14 mg N.

Compte tenu des petites quantités d'azote contenues dans les échantillons analysés, la solution d'acide utilisée pour le dosage est très diluée :

1 ml HCl N/28 correspond à $14/28 = 0,5$ mg-N

Soit p le poids sec de l'échantillon (en mg) et v le volume de la solution HCl utilisée (en ml).

La teneur en azote de l'échantillon se calcule ainsi :

$$\text{N\%} = 50 \text{ V/P}$$

12.2.3.- Méthodes isotopiques

Deux types de méthodes basées sur l'apport d'engrais marqué au ^{15}N ont été développées.

12.2.3.1.- Méthode de dilution isotopique

Cette méthode permet d'estimer avec précision la fixation de N_2 chez les légumineuses (Bremner, 1975 ; Rennie et al., 1978 ; Rennie, 1979 ; Vose et al., 1981) et les non légumineuses fixatrices de N_2 (Rennie, 1980).

Le principe de la méthode est que la plante non fixatrice et la plante fixatrice de N_2 utilisent dans les mêmes proportions l'azote du sol et l'azote marqué provenant de l'engrais (Fried et Broeshart, 1975 ; Fried et Middleboe, 1977). Les plantes fixatrices utilisent en plus N_2 de l'air, cette source d'azote supplémentaire entraînant une dilution de l'azote marqué au sein du système fixateur de N_2 .

On a cultivé simultanément dans des récipients de 15 l des plantes fixatrices de N_2 (*Casuarina* inoculés) et des plantes témoins (*Casuarina* non inoculés), le sol ayant reçu dans les deux cas une même quantité d'engrais marqué au ^{15}N .

Si l'on apporte la même quantité d'azote au système fixateur et au système non fixateur de N_2 , le calcul de N_2 fixé découle des relations suivantes (Rennie et al., 1976 ; Bardin et al., 1977 ; Fried et Middleboe, 1977).

Si l'on désigne d'une part :

%Ndfso : "percent plant N derived from soil" : pourcentage de l'azote de la plante provenant du sol pour les plantes non fixatrices de N_2 .

%Ndffo : "percent plant N derived from fertilizer" : pourcentage de l'azote de la plante provenant de l'engrais pour les plantes non fixatrices de N_2 .

On peut écrire pour la plante non fixatrice de N_2 :

$$\% \text{Ndffso} + \% \text{Ndffo} = 1 \quad (1)$$

et d'autre part,

$\% \text{Ndffsn}$: pourcentage de l'azote de la plante provenant du sol pour la plante fixatrice de N_2 ,

$\% \text{Ndffn}$: pourcentage de l'azote de la plante provenant de l'engrais pour la plante fixatrice de N_2 ,

$\% \text{Ndfa}$: pourcentage de l'azote de la plante dérivée de l'atmosphère (N_2 fixé),

On peut écrire pour la plante fixatrice de N_2 :

$$\% \text{Ndffsn} + \% \text{Ndffn} + \% \text{Ndfa} = 1 \quad (2)$$

En admettant que N du sol et N de l'engrais sont absorbés dans les mêmes proportions par les plantes fixatrices et non fixatrices de N_2 , on peut donc écrire :

$$\frac{\% \text{Ndffo}}{\% \text{Ndffso}} = \frac{\% \text{Ndffn}}{\% \text{Ndffsn}} \quad (3)$$

On tire des trois équations (1), (2) et (3)

$$\% \text{Ndfa} = 1 - \frac{\% \text{Ndffn}}{\% \text{Ndffsn}}$$

Etant donné que les mêmes quantités d'engrais marqué ont été appliquées aux plantes fixatrices et non fixatrices, on peut écrire :

$$\frac{\% \text{Ndffn}}{\% \text{Ndffsn}} = \frac{\% \text{ }^{15}\text{N en excès dans la plante}}{\% \text{ }^{15}\text{N en excès dans l'engrais}}$$

$$\text{le pourcentage de } N_2 \text{ fixé} = 1 - \frac{\% \text{ }^{15}\text{N en excès dans la plante fixatrice}}{\% \text{ }^{15}\text{N en excès dans l'engrais}}$$

et donc la quantité de N_2 fixé ($g.plante^{-1}$) = $(1 - \frac{\% \text{ } ^{15}N \text{ en excès dans la plante fixatrice}}{\% \text{ } ^{15}N \text{ en excès dans l'engrais}}) \times N$

N étant la teneur en N total de la plante fixatrice de N_2 .

En outre on a calculé pour les plantes fixatrices et non fixatrices de N_2 , le pourcentage Ndfs :

$$\% Ndfs = N_{total} (plante) - (N_2 \text{ fixé}) - [N_{total} (plante). \% Nff(fraction)]$$

12.2.3.2.- Méthode de la valeur "A" (availability index)

Cette méthode est en fait une variante de la méthode de dilution isotopique ; elle consiste à appliquer des petites doses d'engrais marqué au ^{15}N aux plantes fixatrices et des doses d'engrais marqué au ^{15}N plus importantes aux plantes témoins (Fried et Broeshart, 1975). L'avantage de cette méthode est lié au fait que les témoins grâce à un apport d'engrais plus important, ont des croissances semblables aux plantes fixatrices de N_2 .

La méthode de la valeur "A" est basée sur un postulat qui suppose que l'absorption de N à partir des différentes sources (N du sol, N_2 de l'air, N de l'engrais) est directement proportionnelle à la quantité de N disponible dans chaque source, cette quantité étant mesurée par la même unité, la valeur "A".

$$\frac{\% Ndff}{A (fertilizer)} = \frac{\% Ndfa}{A (fixation)} = \frac{\% Ndfs}{A (soil)}$$

On a cultivé simultanément dans des microparcelles de $1 m^2$ et dans des récipients de 15 l et 50 l des plantes fixatrices d'azote (*Casuarina* inoculés) et des plantes non fixatrices d'azote (*Casuarina* non inoculés), les doses d'engrais marqué au ^{15}N appliquées étant plus importantes chez les plantes non fixatrices de N_2 .

Si l'on désigne par :

A_o , la valeur "A" de la plante non fixatrice de N_2 ,

A_n , la valeur "A" de la plante fixatrice de N_2 ,

on peut écrire :

- pour la plante non fixatrice de N_2 ,

$$A_o = \frac{100 - \% Ndffo}{\% Ndffo} \times Nf_o$$

Nf_o étant la quantité d'engrais marqué au ^{15}N appliqué aux plantes non fixatrices de N_2 .

- pour la plante fixatrice d'azote :

$$A_n = \frac{100 - \% Ndffo}{\% Ndffo} \times Nf_n$$

Nf_n étant la quantité d'engrais marqué au ^{15}N appliquée aux plantes fixatrices de N_2 .

Etant donné que les quantités d'engrais marqué au ^{15}N appliquées aux plantes non fixatrices et aux plantes fixatrices de N_2 ne sont pas identiques, la valeur "A" de N_2 fixé que l'on a désigné par A_{fix} est obtenue comme suit :

$$A_{fix} = A_n - A_o$$

La quantité de N_2 fixé par la méthode de la valeur "A" est donnée par la formule :

$$\text{Quantité de } N_2 \text{ fixé (g.plante}^{-1}\text{)} = A_{fix} \times \frac{\% Ndffn}{\text{quantité d'engrais marqué}} \times N$$

N étant la teneur en azote de la plante fixatrice de N_2 .

En outre, on a calculé pour les plantes fixatrices et non fixatrices de N_2 , le coefficient d'utilisation de l'engrais en pourcentage (FUE = fertilizer use efficiency)

$$FUE = \frac{\% \text{ Ndff (fraction)} \times N}{\text{quantité d'engrais appliqué}} \times 100,$$

N étant la teneur en azote de la plante considérée

N étant la teneur en azote de la plante considérée.

13 - ANALYSES STATISTIQUES

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées sur microordinateur avec un logiciel STATITCF.

REFERENCES

- ALEXANDER M. (1965).- Most Probable Number Method for Microbial Population. In : Methods of soil analysis, Part. 2 (BLACK C.A. ed.), American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, 1467-1471.
- ALLEN O.N. & ALLEN E.K. (1981).- The Leguminosae, A Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation, The University of Wisconsin Press, Madison Wisconsin.
- BARDIN R., DOMENACH A.M. & CHALAMET A. (1977).- Rapports isotopiques naturels de l'azote II. Applications à la mesure de la fixation symbiotique de l'azote *in situ*, Rev. Ecol. Biol. Sol., 14, 395-402.
- BREMNER J.M. (1975).- Use of Nitrogen-tracer techniques for research on nitrogen fixation. In : Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics (AYANABA A. et DART P.J. eds), JOHN WILEY & SONS, CHICHESTER, 335-352.
- BREWBAKER J.L. (1983).- In : Leucaena research in the Asian-Pacific region : proceedings of a workshop held in Singapore, 23-26 Nov. 1982, Ottawa, Ont., IDRC, 17-32.
- BROWNE F.G., (1955).- Forest Trees of Sarawak and Brunei and their Products. (Government Printing Office : Kuching).
- CALLAHAM D., DEL TREDICI P. and TORREY J.G. (1978).- Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia* Science, 199, 899-902.

DIEM H.G. & DOMMERGUES Y. (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. et TJEPKEMA J.D. ed.) Academic Press, New York, 317-342.

DIEM H.G., BEN KHALIFA, K. NEYRA, M. & DOMMERGUES, Y.R. (1988).- Recent advances in the inoculant technology with special emphasis on plant symbiotic microorganisms. AISI - Italian Association for International Development. Workshop on "Advanced technologies for increased agricultural production" (Santa Margherita Ligure, Italy, 25-29 September 1988), pp. 196-210.

DIEM H.G., GAUTHIER D. & DOMMERGUES Y. (1983).- An effective strain of *Frankia* from *Casuarina* sp., Can. J. Bot., 61, 2815-2821.

DIEM H.G., GAUTHIER D. and DOMMERGUES Y. (1982).- Isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina equisetifolia*, Can. J. Microbiol., 28, 526-530.

DOMMERGUES Y.R. (1987).- The role of biological nitrogen fixation in agroforestry. In : Agroforestry, a decade of development (Steppler H.A. et Nair P.K.R., ed.), ICRAF, Nairobi, 245-271.

EVANS H.J. & BARBER L.E., (1977).- Science, 197, pp. 332.

FELKER P. & CLARK P.R. (1980).- Nitrogen fixation (Acetylene reduction) and cross inoculation in 12 *Prosopis* (Mesquite) species. Plant and Soil, 57, 177-186.

FIEDLER R. & PROKSCH G. (1975).- The determination of nitrogen-15 by emission and mass spectrometry in biochemical analysis : a review, Analytica Chimica Acta 78, 1-62.

FLORES E.M. & MOSELEY Jr. M.F., (1982).- The anatomy of the pistillate inflorescence and flower of *Casuarina verticillata* Lamarck (Casuarinaceae) Can. J. Bot., 69(10), 1673-1684.

FLORES E.M., (1978).- The shoot apex of *Casuarina* (Casuarinaceae). *Revista de Biologia Tropical*, 26, 247-260.

FRIED M. & MIDDLEBOE V. (1977).- Measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop., *Plant and Soil*, 47, 713-715.

FRIED M. & BROESHART H. (1975).- An independent measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop, *Plant and Soil*, 43, 707-711.

GUIRAUD G. (1984).- Contribution du marquage isotopique à l'évaluation des transferts d'azote entre les compartiments organiques et minéraux dans les systèmes sol-plantes. Thèse de doctorat d'Etat, Université Paris VI.

HARDY R.W.F., BURNS R.C. & HOLSTEN R.D., (1973).- Applications of the acetylene reduction assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil. Biol. Biochem.*, 5, 47-81.

HARDY R.W.F. & HAVELKA U.D. (1968).- The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation : Laboratory and field evaluation, *Plant. Physiol.*, 43, 1185-1207.

HEWITT E.J. (1966).- Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical communication no 22 (2nd ed.). Commonwealth Agricultural Bureau, London, 431-432.

HOAGLAND D.R. & ARNON D.I. (1938).- The water culture method for growing plant without soil. *Calif. Agric. Exp. Stn. Circ.* 347.

JOHNSON L.A.S., (1988).- Notes on Casuarinaceae III : the new genus *Ceuthostoma*. *Telopea* 3, 133-137.

JOHNSON L.A.S., (1982).- Notes on Casuarinaceae II. *Journal of Adelaide Botanical Garden*, 6, 73-87.

JOHNSON L.A.S., (1980).- Notes on Casuarinaceae I. *Telopea* 2, 83-84.

KOCH B., EVANS H.J. & RUSSELL S. (1967).- Properties of nitrogenase system in cell-free extracts of bacteroids from soybean root nodules. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 58, 1343.

LALONDE M., CALVERT H.E. & PINE S. (1981).- Isolation and use of *Frankia* strains in actinorhizae formation. In : *Current perspectives in nitrogen fixation*. (Gibson A.H. et Newton W.E., ed.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York, 296-299.

LALONDE M. & CALVERT H.E. (1979).- Production of *Frankia* hyphae and spores as an infective inoculant for *Alnus* species. In : *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests*. (Gordon J.C., Wheeler C.T. et Perry D.A. eds), Forest Research Laboratory, Corvallis, Or., 95-110.

LARUE T.A. & PATTERSON T.G. (1981).- How much nitrogen do legumes fix ? In : *Advances in agronomy*. Academic Press, New York, vol. 34, pp. 15.

LIN M. & STABA E.J. (1961).- Peppermint and spearmint tissue culture callus formation and submerged culture. *Lyoydia*, 24, 139-145.

LOWRY O.H., ROSEBKOUGH N.J., FARR A.L. & RANDALL R.J. (1951).- Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

MARX D.H. (1969).- The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. I - Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic and soil bacteria. *Phytopathol.* 59, 153-163.

MURASHIGE R. & SKOOG F. (1962).- A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.

MURRY M.A., FONTAINE M.S. & TORREY J.G. (1984).- Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp. HFP Ar 13 grown in batch culture. Plant and soil, 78, 61-78.

NITSCH J.P. & NITSCH C. (1965).- Néof ormation de fleurs *in vitro* chez une espèce de jours courts : *Plumbago indica* L., Ann. Physiol. Veg., 7, 251-256.

OLSEN S.R., COLE L.V., WATANABE F.S. & DEAN L.A. (1954).-Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate, Circ. U.S. Dep. Agric., 939.

PEOPLES M.B., FAIZAH A.W., RERKASEM B. & HERRIDGE D.F. (1989).- Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. ACIAR Monograph n° 11, VII + 76 p.

POSTGATE J.R., (1972).- The acetylene reduction test for nitrogen fixation. In : Methods in Microbiology (NORRIS J.R. et RIBBONS D.W. ed.). Academic Press, New York, vol. 6B, 343-356.

RENNIE R.J. (1980).- N-15 isotope dilution as a measure of dinitrogen fixation by *Azospirillum brasilensis* associated with maize. Can. J. Bot., 58, 21-24.

RENNIE R.J. (1979).- Comparison of N-15 added methods for determining symbiotic dinitrogen fixation. Rev. Ecol. Biol. Soil 16, 455-463.

RENNIE R.J., RENNIE D.A. & FRIED M. (1978).- Concepts of N-15 usage in dinitrogen fixation studies. In : Isotope and biological dinitrogen fixation, A.I.E.A., Vienne, 107-133.

RENNIE D.A., PAUL E.A. & JOHNS L.E. (1976).- Natural N-15 abundance of soil and plant samples. Can. J. Soil Sci., 56, 43-50.

THIAGALINGAM K. (1983).- In : Casuarina ecology, management and utilization. (Midgley S.J., Turnbull J.W., Johnston R.D. eds), CSIRO, Melbourne, 175-179.

TORREY J.G. & BERG R.H. (1988).- Some morphological features for genetic characterization among the Casuarinaceae. Amer. J. Bot. 75, 864-874.

VINCENT J.M. (1970).- A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook n° 15, Blackwell, Oxford, 164.

WITTY J.F. & MINCHIN F.R. (1988).- Measurement of Nitrogen Fixation by Acetylene Reduction Assay : Myths and Mysteries. In : Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture. (Beck D.P. et Materon L.A. ed). Martinus Nijhoff Dordrecht, 331-343.

VOSE P.B., RUSCHEL A.P., VICTORIA R.L., TSAI SAITO S.M., MATSUI E. (1981).- N-15 as a tool in biological nitrogen fixation research. In : Biological nitrogen fixation for tropical agriculture. (Graham P.H. et Harris S.E. ed), Centro International de Agricultura Tropical, Cali, Columbia 575-592.

WEBER C.R., (1966).- Nodulating and non-nodulating soybean isolines. In : Agronomic and chemical attributes. Agron. J., 58, 43-46.

WILSON K.L. & JOHNSON L.A.S., (1989).- Casuarinaceae. In : Flora of Australia Volume 3, Hamamelidales to Casuarinales. Australian Government Publishing Service : Canberra, pp. 100-203.

WORONIN M. (1866).- Über die bei der schwarzerle (*Alnus glutinosa*) und der gewöhnlichen Garten-Lupine (*Lupinus mutabilis*) auftretenden Wurzelanschwellungen, Mem. Acad. Imp. Sci. St Petersburg, 7, 10, 1-13.

III. RESULTATS

A. Le spectre d'hôte de quatre souches de *Frankia* isolées d'*Allocasuarina* sp

**ETUDE DE L'INFECTIVITE, DE L'EFFECTIVITE
ET DU SPECTRE D'HOTE DE
QUATRE SOUCHES DE *FRANKIA* ISOLEES
D'*ALLOCASUARINA* SP.**

RESUME

L'infectivité, l'effectivité et le spectre d'hôte de quatre souches de *Frankia Allocasuarina* - compatibles CFN 022901 (syn : Dec), ORS 022602 (syn : TA), CFN 022302 (syn : URU₂) et HFP 022801 (syn : ALL₁) isolées respectivement d'*Allocasuarina decaisneana*, *Allocasuarina torulosa*, *Allocasuarina verticillata* et *Allocasuarina lehmanniana* ont été étudiés chez six espèces appartenant à la famille des Casuarinacées : trois *Casuarina sensu stricto* (*C. cunninghamiana*, *C. equisetifolia*, *C. glauca*) et trois *Allocasuarina* sp. (*A. decaisneana*, *A. torulosa*, *A. verticillata*) cultivés séparément pendant cinq mois en tubes de gélose inclinée et en vase de végétation. En fonction des réponses à l'inoculation on a constaté que :

- Les souches de *Frankia* d'*Allocasuarina* - ORS 022602 et CFN 022302 ont été infectives et effectives pour toutes les espèces de Casuarinacées testées, à l'exception de *Allocasuarina torulosa* pour laquelle elles ont été seulement infectives.
- Les souches de *Frankia* d'*Allocasuarina* - CFN 022901 et HFP 022801 ont été infectives et effectives pour toutes les espèces de Casuarinacées testées, à l'exception de *Allocasuarina torulosa* qu'elles n'ont pas nodulé.

Mots-clés : *Allocasuarina*, *Casuarina*, Effectivité, *Frankia*, Infectivité, Spectre d'hôte.

INTRODUCTION

Les *Frankia* présentent une grande diversité génétique que l'on commence seulement à explorer. En se fondant sur une des méthodes d'identification de *Frankia*, le concept d'inoculation croisée, on distingue avec Tjepkema et al. (1986) trois groupes principaux : un premier groupe constitué de souches nodulant *Alnus* et *Myrica* (y compris *Comptonia*), un second groupe composé de souches nodulant les Elaeagnacées (*Elaeagnus*, *Sherpherdia* et *Hippophae*) ainsi que les Rhamnacées et un troisième groupe englobant les souches compatibles avec les Casuarinacées. Cependant il y a des transgressions d'un groupe à l'autre. Une classification un peu différente vient d'être proposée par Baker (1987).

En ce qui concerne la seule famille des Casuarinacées, il s'agit là d'un modèle de relation plante-endophyte d'une grande complexité. Cette famille est divisée en quatre genres : le genre *Casuarina*, le genre *Allocasuarina*, le genre *Gymnostoma* et le genre *Ceuthostoma* (Johnson, 1988). Sur les 90 espèces connues, on sait seulement que 30 espèces nodulent (Bond, 1976 ; Lawrie, 1982, 1983 ; Reddell et al., 1986).

Afin d'étudier la compatibilité entre la plante-hôte et le microorganisme, les premières investigations ont concerné la réalisation d'inoculation croisée avec des suspensions de nodules broyés (Coynes, 1983 ; Gauthier, 1984 ; Reddell et Bowen, 1986). Une telle étude n'est cependant pas sans critique étant donné que les nodules des Casuarinacées peuvent contenir différentes souches de *Frankia*, chacune d'elles ayant des degrés de compatibilité variables avec différentes plantes (Reddell et Bowen, 1985). Antérieurement les expériences que nous avons effectuées en collaboration avec D. Gauthier (1983) ainsi que les travaux menés sur l'étude de l'infectivité et de l'effectivité des souches de *Frankia* isolée des Casuarinacées nous ont conduit à définir trois groupes de *Frankia*.

- Le groupe 1 : groupe des *Frankia* à spectre d'hôte large : c'est le cas des souches HFP022801 (syn : ALII₁) et HFP020203 (syn : Ccl₃) isolées respectivement de *Allocasuarina lehmanniana* et *Casuarina cunninghamiana* et nodulant certaines espèces appartenant au genre *Casuarina sensu stricto*, au genre *Allocasuarina*, une espèce appartenant au genre *Gymnostoma* (*G. papuanum*) (Zhang et Torrey, 1985 ; Torrey et Racette, 1989) et une espèce appartenant au genre *Myrica* (*M. gale*).

- Le groupe 2 : le groupe des *Frankia* à spectre restreint : c'est le cas de la souche ORS021001 (syn : Cj.1.82) isolée de *Casuarina junghuhniana* (Diem et al., 1983), nodulant uniquement les espèces appartenant au genre *Casuarina sensu stricto* (Sougoufara, 1983).

- Le groupe 3 : le groupe des *Frankia* à spectre aberrant : c'est le cas des souches HFP020202 (syn : Ccl₂) et ORS020602 (syn : D11) isolées respectivement de *Casuarina cunninghamiana* (Zhang et al., 1984) et *Casuarina equisetifolia* (Diem et al., 1982) ne nodulant pas leur hôte d'origine, mais nodulent certaines espèces appartenant à l'ordre des rhamnales (*Hippophaë*, *Elaeagnus*, *Colletia*).

Dans ce travail, notre objectif est de définir des groupes d'inoculation croisée à travers l'étude d'un spectre d'hôte testant quatre souches de *Frankia* d'*Allocasuarina* - CFN022901 (syn : Dec), ORS022602 (syn : TA), CFN022302 (syn : URU2), HFP022801 (syn : ALII₁) isolées respectivement de *Allocasuarina decaisneana*, *Allocasuarina torulosa*, *Allocasuarina verticillata* et *Allocasuarina lehmanniana*, sur 3 espèces de *Casuarina sensu stricto* (*C. equisetifolia*, *C. cunninghamiana*, *C. glauca*) et 3 espèces d'*Allocasuarina* (*A. decaisneana*, *A. torulosa*, *A. verticillata*).

2 - MATERIELS ET METHODES

2.1.- Matériel végétal

La liste des Casuarinacées étudiées est la suivante :

<u>Genres</u>	<u>Espèces</u>
<i>Casuarina</i>	<i>equisetifolia</i>
	<i>cunninghamiana</i>
	<i>glauca</i>
<i>Allocasuarina</i>	<i>decaisneana</i>
	<i>torulosa</i>
	<i>verticillata</i> (= <i>C. stricta</i>)

2.2.- Souches de *Frankia*

La liste des souches utilisées est donnée au tableau (1). Parmi ces souches, deux (Dec et URU2) ont été isolées par nous-mêmes suivant la technique de H.G. Diem. Les deux autres font partie de la collection du laboratoire de microbiologie des sols de l'ORSTOM de Dakar.

2.2.1.- Isolement des souches de *Frankia*

Afin d'isoler *Frankia*, il est nécessaire de disposer de nodules jeunes. Pour cela, nous avons utilisé une méthode de piégeage classique consistant à cultiver séparément les plantes hôtes, constituées par *Allocasuarina decaisneana* et *Allocasuarina verticillata*, dans un sol stérile respectivement inoculé avec une suspension de nodules broyés de *Casuarina equisetifolia* du parc forestier de Hann et d'*Allocasuarina verticillata* d'Uruguay.

L'isolement de *Frankia* a été effectué suivant la technique de H.G. Diem. Sitôt prélevés, les lobes des nodules de chaque plante hôte ont été lavés et stérilisés superficiellement avec une solution aqueuse de OsO_4 à 3% pendant 2 à 3 min.

Après plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile, ces lobes ont été découpés aseptiquement en fragments minuscules.

On a ensuite fait une suspension de ces fragments dans 3-5 ml d'eau distillée stérile que l'on a étalée sur 3 à 6 boîtes de Petri contenant un milieu de croissance BAP gélosé à 0,8% (poids/volume) fondu à 40°C.

Les boîtes de Petri ainsiensemencées ont été scellées avec du Parafilm et incubées à 28-30°C. Après 2 mois d'incubation, les fragments non contaminés ayant apparu comme porteurs d'une colonie de *Frankia* ont été prélevés puis dispersés par agitation (30-60 min) dans un flacon sérum de 125 ml contenant 50 ml de milieu BAP liquide et un barreau aimanté. La suspension ainsi obtenue a servi à ensemercer un milieu BAP complet neuf liquide ou gélosé dans lequel les colonies de *Frankia* se sont développées lentement (planche 1, fig. 1 et 2).

2.2.- Milieu de culture pour *Frankia*

Le milieu complet appelé BAP a été utilisé pour la croissance des souches de *Frankia* (Murry et al., 1984) (Tableau 2).

2.3.- Milieu de culture pour les plantes hôtes

2.3.1.- Stérilisation et germination des graines

On a désinfecté les graines par immersion dans l'acide sulfurique concentré pendant 3 min. Puis on les a rincées abondamment à l'eau distillée stérile. Les graines ont été mises à germer à 28° C et à l'obscurité dans des boîtes de Petri contenant 10 ml d'eau gélosée à 1,6%, les boîtes étant renversées afin que la radicelle ne s'enfonce pas dans l'agar. Les jeunes plantes de 1 à 2 cm de long ont été repiquées dans le sol en pots ou en culture hydroponique dans des tubes de gélose au charbon (20 g/litre) inclinée.

2.3.2.- Milieu de culture des plantes

Le milieu Hoagland et Arnon (1938) dilué au 1/4 a été utilisé pour les cultures en tube des plantes (Tableau 3).

Le pH étant ajusté à 6,8, on a autoclavé le milieu pendant 20 min à 120° C.

2.4.- Culture des plantes

2.4.1.- Culture en vases de végétation (pots en terre cuite)

Le sol utilisé est un sol dunaire dit sol de Cambérène. Il a été stérilisé à l'autoclave pendant 1 h à 120°C. Ce sol, très sableux (98% de sable), acide (pH eau = 5,0) très pauvre en N (0,01 %) et en C (0,12 %), a été additionné de billes de polystyrène de 2 mm de diamètre (1/4 billes, 3/4 sol en volume), puis réparti dans des pots en terre cuite de 18 cm de diamètre à raison de 2 kg de mélange par pot. Les jeunes plantes stériles obtenues comme indiqué au paragraphe 2.3.1. ont été repiquées dans les pots à raison de 1 plante par pot. Durant leur séjour en pépinière les plantes ont été quotidiennement arrosées à l'eau du robinet. En outre, une fois par semaine, on a apporté à chaque plante 50 ml de milieu Hoagland et Arnon (1938) dilué au 1/4 sans azote.

2.4.2.- Cultures en tubes

La technique utilisée est celle mise au point par Gibson (Vincent, 1970). Après germination des graines, chaque jeune plante a été mise en culture sur un tube de (22 x 220) mm contenant une gélose nutritive inclinée (Hoagland et Arnon, 1938) muni d'un capuchon constitué par une feuille d'aluminium percée d'un trou. La racine a été introduite dans le tube de façon à être en contact avec la gélose, la tige restant à l'air libre. Pendant 60 jours, la plante a été cultivée sur le milieu Hoagland et Arnon (1938) dilué au 1/4 auquel on a ajouté 17 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Lorsque les plantes ont été âgées de 2 mois environ, on a remplacé le milieu Hoagland et Arnon (1938) dilué au 1/4 avec azote par le même milieu sans azote et on a procédé 1 semaine plus tard à l'inoculation. Les plantes ont

été placées dans une chambre de culture (température 28°C ; éclairage 50 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$; photopériode 17/24 h). Tous les 3-5 jours on a ajouté lorsque nécessaire une quantité suffisante de solution nutritive.

La culture hydroponique telle qu'on l'a adoptée présente trois avantages :

- 1) L'élimination partielle de certaines contaminations, notamment les algues,
- 2) le contrôle plus strict de l'inoculation du fait de la limpidité du milieu,
- 3) l'obtention de nodules propres utilisables pour la microscopie électronique.

2.5.- Inoculation des plantes

Pour chaque condition de culture, les essais ont comporté :

- 24 traitements non inoculés avec 3 répétitions.
- 24 traitements inoculés avec 9 répétitions.

L'inoculation a été effectuée en apportant sur les racines de chaque plante 2 ml d'une culture de *Frankia* âgée de 3 semaines, équivalente à 20 μg de protéines (Lowry et al., 1951). L'inoculation a été réalisée de la même manière pour les tubes de gélose inclinée et les vases de végétation.

2.6.- Contrôle de la nodulation et évaluation de la fixation de N_2

Cinq mois après le repiquage, on a récolté les plantes cultivées en vases de végétation sur lesquelles on a effectué des mesures d'activité réductrice d'acétylène (ARA), les plantes cultivées en tubes ayant servi au contrôle de la nodulation, et à l'étude ultrastructurale ultérieure des nodules (planche 2, fig. 1).

3 - RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1.- Isolement des souches de *Frankia*

Nous avons isolé deux souches de *Frankia* (Dec) et (URU2) respectivement à partir de nodules d'*Allocasuarina decaisneana* et *Allocasuarina verticillata*.

Les cultures de ces souches, comme les autres souches de *Frankia* forment au bout de 3 semaines dans le milieu de culture des colonies floconneuses qui se rassemblent au fond des récipients de culture. Sous le microscope, on distingue classiquement trois structures :

- les hyphes : elles sont constituées de filaments septés ramifiés, ce sont des structures végétatives (planche 1, fig. 3).
- les sporanges : très polymorphes, elles sont productrices de spores qui assurent la dispersion et la conservation de la bactérie. Ce sont des structures de survie (planche 1, fig. 4).
- les vésicules : ce sont des sphères cloisonnées apparaissant à l'extrémité de certains hyphes. Elles sont le siège de la fixation d'azote atmosphérique (planche 1, fig. 5).

Il existe une quatrième structure qui n'est pas représentée ici et qu'on peut observer dans certaines conditions de cultures âgées. Elle est désignée par Diem et Dommergues (1985) sous le nom d'hyphes toruleuses reproductives qui résultent de l'élargissement suivi de cloisonnement multiple des hyphes normales. Selon ces auteurs, ces hyphes toruloses reproductives permettraient à *Frankia* de survivre au moment de la lyse des hyphes végétatives et joueraient un rôle important dans la régénération de *Frankia*.

3.2.- Spectre d'hôte, infectivité et effectivité

3.2.1.- Infectivité

Quatre faits ressortent du tableau 4 :

1) Les quatre souches de *Frankia* CFN 022901, ORS 022602, CFN 022302 et HFP 022801 isolées de différentes espèces d'*Allocasuarina* induisent une nodulation sur toutes les espèces de Casuarinacées testées à l'exclusion de CFN 022901 et HFP 022801 qui n'infectent pas *Allocasuarina torulosa*, ceci quelles que soient les conditions de culture (planche 2, fig. 2, 3, 4 et 5).

2) *Allocasuarina torulosa* semble noduler difficilement et être très spécifique, contrairement à *Gymnostoma papuanum*, espèce "promiscuous" qui est nodulée par une large gamme de souches de *Frankia* (Zhang et Torrey, 1989).

3) Les *Casuarina senso stricto* forment plus facilement des nodules que les *Allocasuarina*, ce fait pouvant être rapproché aux observations *in situ* de Lawrie (1982) et Reddell et al. (1986) suivant lesquelles le nombre de *Casuarina senso stricto* qui nodulent spontanément est plus élevé que celui d'*Allocasuarina sp.*

4) Si l'on compare le pourcentage des plantes ayant nodulé après inoculation dans les deux cas de conditions de culture parallèlement menées, on constate que le pourcentage de nodulation positive est souvent plus élevé en tubes de gélose inclinée qu'en vases de végétation, alors que Torrey et Racette (1989) avaient obtenu l'inverse.

Ces résultats confirment le fait que contrairement aux souches à spectre restreint isolées de *Casuarina sp.* qui nodulent seulement les *Casuarina senso stricto*, les souches à spectre large isolées d'*Allocasuarina sp.* nodulent à la fois les *Casuarina senso stricto* et les *Allocasuarina* (Zhang et Torrey, 1985 ; Torrey et Racette, 1989).

3.2.2.- Effectivité

Pour étudier l'effectivité, nous avons fait appel à quatre souches de *Frankia* isolées d'*Allocasuarina* dont l'infectivité a été étudiée au paragraphe 3.2.1 et auxquelles on a ajouté la souche ORS 021001 (syn : Cj.1.82) étudiée antérieurement (Sougoufara, 1983) et utilisée ici à titre de comparaison. Le tableau 5 montre que :

1) La souche ORS 021001 est efficace seulement lorsqu'elle est associée aux espèces appartenant au genre *Casuarina*. Le caractère spécifique de cette souche déjà noté en ce qui concerne son infectivité se retrouve en ce qui concerne son efficacité.

2) Les souches de *Frankia* isolées d'*Allocasuarina* CFN 022901, ORS 022602, CFN 022302 et HFP 022801 sont infectives et efficaces pour les espèces de Casuarinacées testées à l'exclusion de *Allocasuarina torulosa* qu'elles ne nodulent pas. Cependant il faut retenir le cas particulier des souches ORS 022602 et CFN 022302 qui, bien qu'ineffectives, sont infectives pour *Allocasuarina torulosa*.

Ces résultats apportent une confirmation à la classification en 3 groupes des souches de *Frankia*, proposé dans l'introduction.

En ce qui concerne la spécificité des souches de *Frankia* :

- les souches isolées d'*Allocasuarina* sp. se classent dans le groupe des *Frankia* à spectre large (groupe 1) ;
- la souche ORS 021001 appartient au groupe des *Frankia* à spectre restreint (groupe 2).

Nous n'avons pas eu l'occasion dans notre étude d'isoler des souches appartenant au groupe de *Frankia* à spectre aberrant (groupe 3).

En ce qui concerne la spécificité des plantes hôtes :

- on constate que *Allocasuarina torulosa* se distingue par sa spécificité remarquable se traduisant par le fait que nous n'avons pu noduler cette espèce que par deux souches de *Frankia*, encore sont-elles inefficaces,
- la classification récente des Casuarinacées proposée par Johnson (1988), qui aboutit à la séparation des genres *Casuarina*, *Allocasuarina*, *Gymnostoma* et *Ceuthostoma* trouve dans notre étude une confirmation en ce qui concerne la séparation des genres *Casuarina* et *Allocasuarina* ; les *Casuarina sensu stricto* présentent des caractéristiques symbiotiques nettement différentes de celles des *Allocasuarina* sp.

4. CONCLUSION

Les résultats obtenus nous ont amenés à faire une distinction entre la spécificité relative à la nodulation et la spécificité relative au potentiel fixateur de N_2 . L'intérêt d'une telle étude réside dans le fait que leur connaissance précise est nécessaire avant toute tentative d'introduction des espèces hors de leur aire d'origine. Il est probable que l'échec de l'introduction au Sénégal de *Allocastraria decaisneana* (arbre remarquable par sa résistance à la sécheresse) soit due à l'absence de l'endophyte propre à cette espèce.

REFERENCES

- BAKER D. (1987).- Relationships among pure cultured strains of *Frankia* based on host specificity. *Physiol. Plant.*, 70, 245-248.
- BOND G. (1976).- The results of the IBP survey of root-nodule formation in non-léguminous angiosperms. In : *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*, (Nutman P.S., Cambridge University Press : Cambridge ed), 443-474.
- COYNE P.D. (1973).- Some aspects of the autoecology of *Casuarinas* with particular reference to nitrogen fixation. PhD Thesis. Australian National University.
- DATE R.A. & HALLIDAY J. (1980).- Relationship between rhizobium and tropical forage legumes. In : *Advances in legume sciences* (Summerfield R.J. et Bunting A.H. ed), Royal Botanical Gardens, Kew, 597-601.
- DIEM H.G. & DOMMERGUES Y.R. (1985).- *In vitro* production of specialized reproductive torulose hyphae by *Frankia* strain ORS021001 isolated from *Casuarina junghuhniana* root nodules. *Plant and Soil*, 87, 17-29.
- DIEM H.G., GAUTHIER D. & DOMMERGUES Y.R. (1983).- An effective strain of *Frankia* from *Casuarina* sp. *Can J. Bot.*, 61, 2815-2821.
- DIEM H.G., GAUTHIER D. & DOMMERGUES Y.R. (1982).- Isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina equisetifolia*, *Can. J. Microbiol.*, 28, 526-530.
- DREYFUS B.L., DIEM H.G. & DOMMERGUES Y.R. (1988).- Future directions for biological nitrogen fixation research. *Plant and Soil*, 108, 191-199.
- DREYFUS B. & DOMMERGUES Y.R. (1981).- Nodulation of *Acacia* species by fast and clone growing tropical strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 97-99.

GAUTHIER D. (1984).- La symbiose *Frankia-Casuarina equisetifolia*, Thèse de doctorat d'Etat, Université Paris VII.

HOAGLAND D.R. & ARNON D.I. (1938).- The water culture method for growing plants without soil. Calif. Agric. Exp. Stn. Circ. 347.

JOHNSON L.A.S. (1988).- Notes on Casuarinaceae III : the new genus *Ceuthostoma*, Telopea 3, 133-137.

LAWRIE A.C. (1983).- Field nodulation in some Victorian *Casuarina* species. In : Casuarina ecology management and utilization (Midgley S.J., Turnbull J.W. et Johnston R.D., eds), (CSIRO), Canberra, ACT, Australia, p. 218.

LAWRIE A.C. (1982).- Field nodulation in nine species of *Casuarina* in Victoria. Aust. Bot. 30, 447-460.

LOWRY O.H., ROSEBKOUGH N.J., FARR A.L. & RANDALL R.J. (1951).- Protein measurements with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-275.

MURRY M.A., FONTAINEM.S. & TORREY J.G. (1984).- Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp. HFP Ar 13 grown in batch culture. Plant and Soil, 78, 61-78.

NESME X., NORMAND P., TREMBLAY F.M. & LALONDE M. (1985).-Nodulation speed of *Frankia* sp. on *Alnus glutinosa*, *Alnus crispa* and *Myrica gale*. Can. J. Bot., 63, 1292-1295.

REDDELL P. & BOWEN G.D. (1986).- Host-*Frankia* specificity within Casuarinaceae. Plant and Soil, 93, 293-298.

REDDELL P., BOWEN G.D. & ROBSON A.D. (1986).- Nodulation of casuarinaceae in relation to host species and soil properties. Aust. J. Bot., 34, 435-444.

REDDELL P. & BOWEN G.D. (1985).- Do single nodules of Casuarinaceae contain more than one *Frankia* strain ? Plant and Soil 88, 275-279.

SELLSTEDT A. (1988).- Nitrogenase activity, hydrogen evolution and biomass production in different *Casuarina* symbioses. Plant and Soil, 105, 33-40.

SOUGOUFARA B. (1983).- Méthodologie impliquée dans l'étude de la symbiose d'une non-légumineuse forestière tropicale (*Casuarina*) avec *Frankia* , DEA soutenu le 27 novembre 1983 à l'Université de Nancy I.

STEELE D.B., RAMIREZ M.D. & STOWERS (1989).- Host plant growth response to inoculation with *Frankia*. Plant and Soil, 118, 139-143.

TJEPKEMA J.D., SCHWINTZER C.R. & BENSON D.R. (1986).- Physiology of actinorhizal nodules. Ann. Rev. Plant. Physiol. 37, 209-232.

TORREY J.G. & RACETTE S. (1989).- Specificity among the Casuarinaceae in root nodulation by *Frankia*. Plant and Soil, 118, 157-164.

VINCENT J.M., (1970).- A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook No 15, Blackwell, Oxford, 164.

ZHANG Z. & TORREY J.G. (1985).- Studies of an effective strain of *Frankia* from *Allocasuarina lehmanniana* of the Casuarinaceae. Plant and Soil, 87, 1-16.

ZHANG Z., LOPEZ M.F. & TORREY J.G. (1984).- A comparison of cultural characteristics and infectivity of *Frankia* isolates from root nodules of *Casuarina* species. Plant and Soil, 78 (1/2), 79-90.

Tableau 1 - Liste des souches de *Frankia* isolées d'*Allocasuarina* utilisées

Souches	Nom	Hôte d'origine	Provenance	Laboratoire d'isolement	Références
ALII ₁	HFP022801	<i>A. lehmannia</i>	Australie	Harvard Forest, Massachu.	Zhang et Torrey, (1985)
Dec	CFN022901	<i>A. decaisneana</i>	Sénégal	BSFT (2) Nogent s/Marne	B. Sougoufara et H.G. Diem (non publié)
TA	ORS022602	<i>A. torulosa</i>	Australie	ORSTOM Dakar, Sénégal	H.G. Diem (non publié)
URU ₂	CFN022302	<i>A. verticillata</i> (= <i>C. stricta</i>)	Uruguay	BSFT Nogent s/Marne	B. Sougoufara et H.G. Diem (non publié)

(2) BSFT : Laboratoire de biotechnologie des symbioses forestières tropicales

Tableau 2 - Milieu BAP utilisé comme milieu de culture de *Frankia* (d'après Murry et al., 1984)

	Concentration en g dans 1 litre d'eau	Dose en ml/l
Mg SO ₄ , 7H ₂ O	0,05	
Ca Cl ₂ , 2H ₂ O	0,01	
NH ₄ Cl	0,267	
Propionate de Na	0,48	
Fe Na EDTA	0,01	
Oligo éléments		1
Vitamines BAP		1
Tampon BAP		10

NB : Le tampon BAP doit être stérilisé à part. Ajuster le pH à 6-7-6-8. Pour solidifier, ajouter du Bitek agar Difco à 0,8%.

Tableau 3 - Le milieu de Hoagland et Arnon (1938) dilué au 1/4 sans azote

	Concentration en g dans 1 litre d'eau
K ₂ SO ₄	0,109
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,123
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0,029
CaSO ₄ , 2H ₂ O	0,086
FeNa EDTA 0,2%	2 ml
Solution oligo éléments (tableau 2.1)	0,25 ml

Ajuster le pH à 6,8

NB : Pour avoir le milieu nutritif azoté, ajouter 17 mg de (NH₄)₂SO₄.

Tableau 4 - Pourcentage de plants de Casuarinacées âgés de 5 mois cultivés en tubes de gélose inclinée et en vases de végétation nodulant après inoculation avec les souches de *Frankia* CFN 022901, ORS 022602, CFN 022302 et ALII₁

Plantes testées	Inoculation avec la souche (+)							
	CFN 022901 (<i>A. decaisneana</i>)		ORS 022602 (<i>A. torulosa</i>)		CFN 022302 (<i>A. verticillata</i>)		ALII ₁ (<i>A. lehmanniana</i>)	
	Tubes	Pots	Tubes	Pots	Tubes	Pots	Tubes	Pots
<i>Casuarina</i>								
<i>C. equisetifolia</i>	88	100	55	44	66	55	77	66
<i>C. cunninghamiana</i>	100	88	44	55	77	77	88	100
<i>C. glauca</i>	100	77	66	55	77	88	88	77
<i>Allocasuarina</i>								
<i>A. decaisneana</i>	66	88	33	44	88	66	77	66
<i>A. torulosa</i>	0	0	22	11	11	11	0	0
<i>A. verticillata</i>	77	77	88	88	100	77	66	88

(+) entre parenthèses sous la référence de chaque souche, l'hôte d'origine.

Tableau 5 - Nodulation et fixation de N₂ mesurée par l'Activité Réductrice d'Acétylène (ARA) chez trois *Casuarina sensu stricto* et trois *Allocasuarina sp* âgés de 5 mois cultivés en vase de végétation et inoculés avec quatre souches de *Frankia* isolées d'*Allocasuarina* CFN 022901 (syn : Dec), ORS 022602 (syn : TA), CFN 022302 (syn : URU₂) et HFP 022801 (syn : ALII₁)

Souches de <i>Frankia</i> isolées d' <i>Allocasuarina</i> et de <i>Casuarina</i> (1)	Hôte d'origine	Plantes testées					
		C.	C.	C.	A.	A.	A.
		<i>equisetifolia</i>	<i>cunninghamiana</i>	<i>glauca</i>	<i>decaisneana</i>	<i>torulosa</i>	<i>verticillata</i>
CFN 022901	<i>A. decaisneana</i>	E	E	E	E	0	E
ORS 022602	<i>A. torulosa</i>	E	E	E	E	I	E
CFN 022801	<i>A. verticillata</i>	E	E	E	E	I	E
HFP 022801	<i>A. lehmanniana</i>	E	E	E	E	0	E
ORS 021001 (1)	<i>C. junghuhniana</i>	E	E	E	0	0	0

(1) Essai effectué antérieurement (Sougoufara, 1983).

E = nodulation effective ; I = nodulation ineffective ; 0 = pas de nodulation.

PLANCHE 1

Fig. 1 Une colonie de *Frankia* d'*Allocasuarina decaisneana* issue d'un fragment de lobe après 7 semaines d'incubation à 28°C dans le milieu BAP complet gélosé (Barre = 50 μ m).

Fig. 2 Une colonie de *Frankia* d'*Allocasuarina verticillata* après 2 semaines de culture dans le milieu BAP complet gélosé (Barre = 100 μ m).

Fig. 3 Hyphes (H) obtenues après 3 semaines de culture de la souche CFN 022901 (syn : Dec) dans le milieu BAP complet liquide (Barre = 50 μ m).

Fig. 4 Sporanges (Sp) obtenues après 1 semaine de culture de la souche CFN 022901 (syn : Dec) dans le milieu BAP liquide sans N (Barre = 10 μ m).

Fig. 5 Vésicules (V) obtenues après 3 semaines de culture de la souche CFN 022901 (syn : Dec) dans le milieu BAP complet gélosé (Barre = 10 μ m).

PLANCHE 1

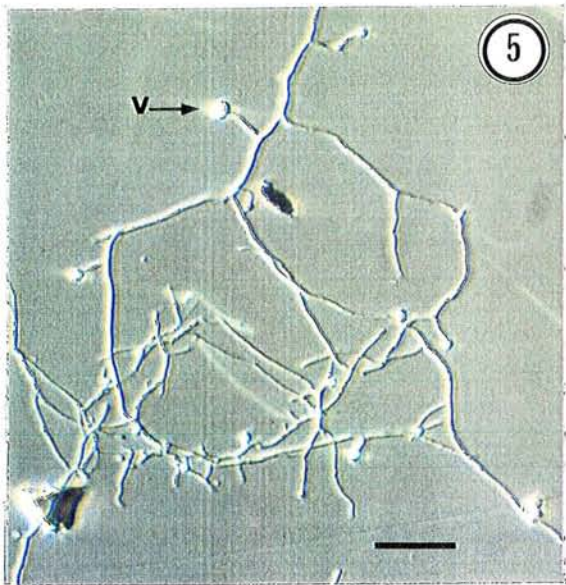
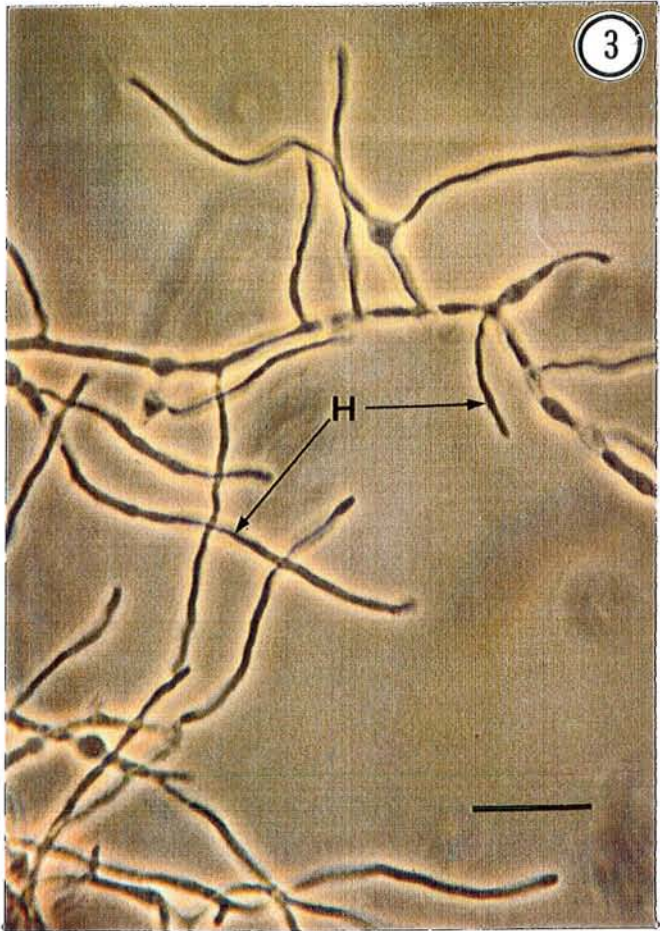
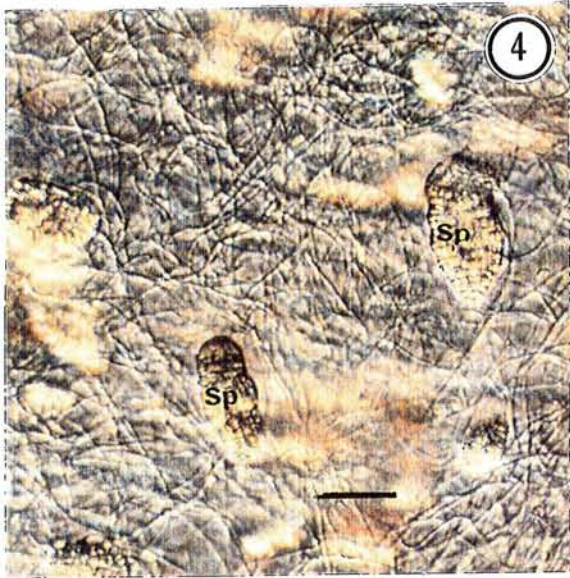
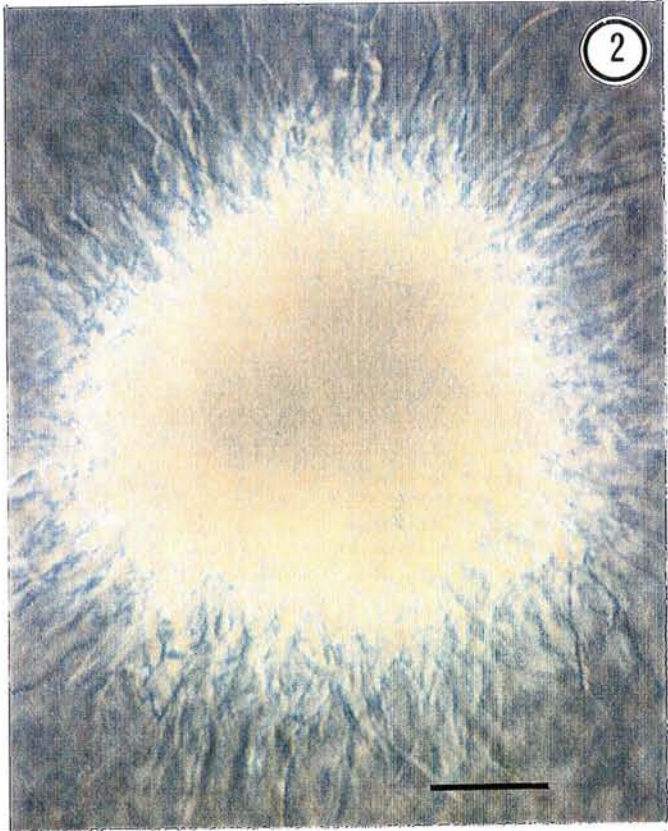
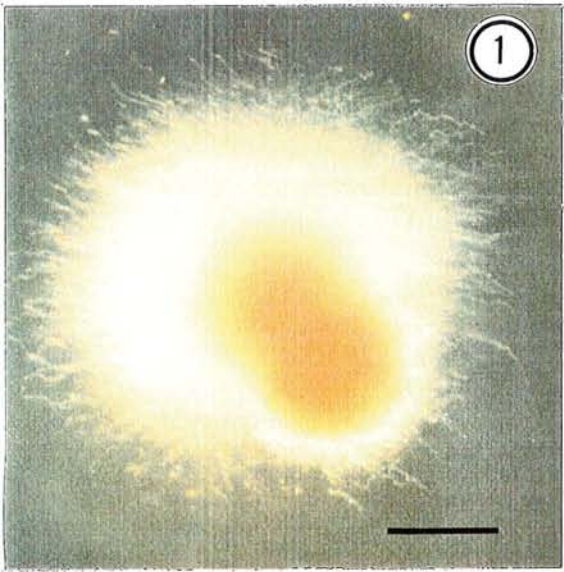


PLANCHE 2

Fig. 1 Dispositif de Gibson (Vincent modifié, 1970) pour tester l'infectivité (aptitude à noduler) des souches de *Frankia* (Barre = 5 cm).

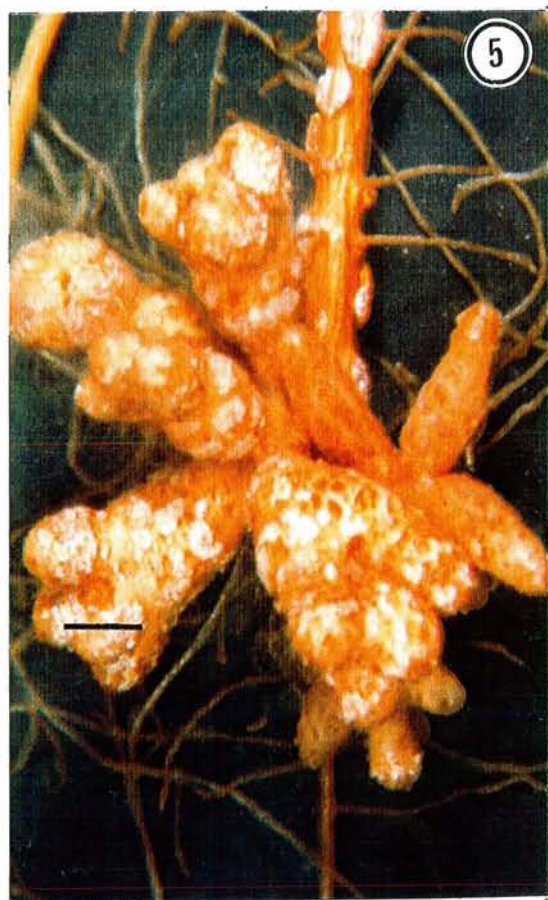
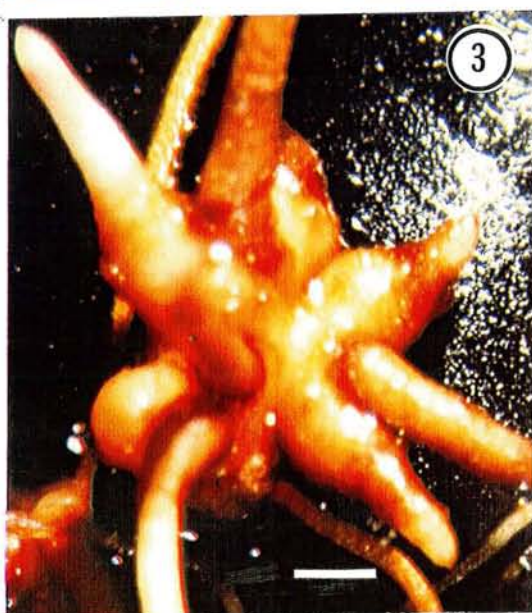
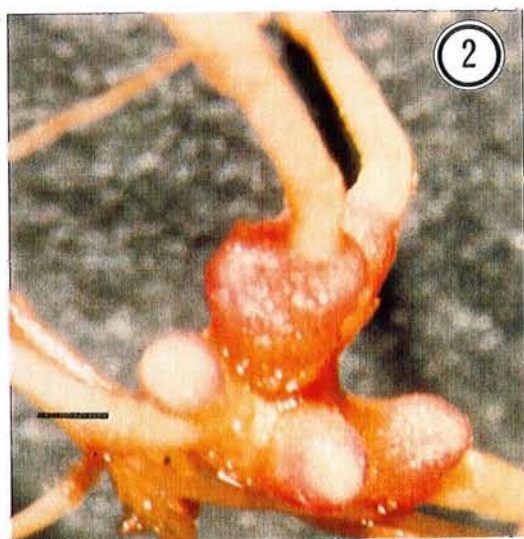
Fig. 2 Nodule de *Casuarina equisetifolia* obtenu 21 jours après inoculation avec la souche de *Frankia* ORS 022602 (syn : TA) (Barre = 1 mm).

Fig. 3 Nodule de *Casuarina glauca* obtenu 21 jours après inoculation avec la souche de *Frankia* ORS 022602 (syn : TA) (Barre = 1 mm).

Fig. 4 Nodule de *Allocasuarina decaisneana* obtenu 45 jours après inoculation avec la souche de *Frankia* ORS 022602 (syn : TA) (Barre = 1 mm).

Fig. 5 Nodule de *Allocasuarina verticillata* obtenu 45 jours après inoculation avec la souche de *Frankia* CFN 022901 (syn : Dec) (Barre = 1 mm).

PLANCHE 2



B. La synthèse mycorhizienne *in vitro* de *Casuarina senso stricto* et d'*Allocasuarina sp* avec *Pisolithus tinctorius*

In vitro mycorrhization of Casuarina and Allocasuarina
species by Pisolithus isolates.

by

Daniel THOEN (1 & 2), Bassirou SOUGOUFARA (2 & 3)
and Yvon DOMMERGUES (4)

1 : Fondation Universitaire Luxembourgeoise (F.U.L.), avenue de Longwy, 85, B-6700 Arlon, Belgique.

2 : Laboratoire de Microbiologie du Sol, Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (O.R.S.T.O.M.), B.P. 1386, Dakar, Sénégal.

3 : Ministère de la Protection de la Nature, B.P.1832, Dakar, Sénégal.

4 : Biotechnologie des Systèmes symbiotiques forestiers tropicaux (B.S.S.F.T.) (ORSTOM / CTFT / CNRS), 45 bis avenue de la Belle Gabrielle, 94736 Nogent sur Marne, France.

Summary

Five Casuarina species and five Allocasuarina species were inoculated in vitro with three isolates of Pisolithus sp. (ORS.X004 and ORS.7870 from Senegal, PR86 from Australia) to test their ability to form ectomycorrhizas. The mycorrhiza-forming ability varied between fungal isolates. The greatest differences occurred between Casuarina and Allocasuarina species. On Casuarina species, Pisolithus isolates formed only a fungal sheath. However ORS.X004 induced well-developed ectomycorrhizas on Casuarina equisetifolia. PR86 failed to form any fungal sheath on Casuarina cunninghamiana. On Allocasuarina species Pisolithus isolates formed generally well-developed ectomycorrhizas. In addition isolates ORS.7870 and PR86 invaded the cortical cells respectively of Allocasuarina luehmannii and Allocasuarina decaisneana, thus forming ectendomycorrhizas. Epidermal cells of both Casuarina and Allocasuarina mycorrhizas showed tannin deposits. In fully developed ectomycorrhizas, the epidermal cells were radially elongated and Hartig net never developed beyond the epidermal cells. In general the ability to form ectomycorrhizas was more common with the genus Allocasuarina than the genus Casuarina.

Key words : Casuarina, Allocasuarina, Pisolithus,
ectomycorrhizas.

Résumé

Cinq espèces de Casuarina et cinq espèces d'Allocasuarina ont été inoculées in vitro par trois isolats de Pisolithus sp. (ORS.X004 et ORS.7870 du Sénégal, PR86 d'Australie) afin de tester leur infectivité et leur aptitude à former des ectomycorhizes. L'infectivité des isolats de Pisolithus est variable. Les plus importantes différences d'infectivité ont été observées entre les espèces de Casuarina et d'Allocasuarina. Chez les Casuarina les isolats de Pisolithus forment généralement un manteau fongique et pas de réseau de Hartig. Néanmoins l'isolat ORS.X004 a formé des ectomycorhizes complètes sur Casuarina equisetifolia, tandis que l'isolat PR86 n'a formé aucune mycorhize sur Casuarina cunninghamiana. Sur les espèces d'Allocasuarina, les isolats de Pisolithus forment généralement des ectomycorhizes bien développées. Les isolats ORS.7870 et PR86 ont envahi des cellules corticales respectivement d'Allocasuarina luehmannii et d'Allocasuarina decaisneana, formant donc des ectendomycorhizes. Les cellules épidermiques des mycorhizes de Casuarina et d'Allocasuarina sont remplies de tannins. Chez les ectomycorhizes bien développées, le réseau de Hartig est limité aux cellules épidermiques qui sont allongées radialement. L'aptitude à former des ectomycorhizes est plus grande dans le genre Allocasuarina que dans le genre Casuarina.

Mots clés : Casuarina, Allocasuarina, Pisolithus, ectomycorhizes.

Introduction

The Casuarinaceae comprise about 80 species of shrubs and trees native to the southern hemisphere, mostly to Australia and Malaysia. They occur in tropical, subtropical and temperate coastal regions as well as in the arid inland (National Research Council, 1984). Some species are widely used in afforestation programs of adverse sites.

Among the Casuarinaceae, the genera Casuarina and Allocasuarina are known to possess ectomycorrhizal species (Tandy, 1975; Bamber et al., 1980; Warcup, 1980; National Research Council, 1984; Reddel et al., 1986; Ba et al., 1987). The fungi involved in the ectomycorrhizas of the Casuarinaceae are, however, not well documented. To our knowledge, the only experimental ectomycorrhizas obtained in the Casuarinaceae with an identified fungus are those of Allocasuarina distyla with Pisolithus tinctorius (Bamber et al., 1980). In Senegal, field observations of sporocarps, rhizomorphs and mycorrhizas led to the conclusion that Casuarina equisetifolia was naturally ectomycorrhizal with Pisolithus sp. (Ba et al., 1987). According to Reddel et al. (1986) ectomycorrhizas are more common in Allocasuarina than in Casuarina.

The objective of the study reported here was to test the ability of three isolates of Pisolithus sp. to form mycorrhizas in five species of Casuarina and five species of Allocasuarina.

Materials and methods

Origin of Pisolithus isolates

PR86 : isolated by P. Reddel from sporocarp growing under Eucalyptus spp. at Lobethal, South Australia;

ORS.X004 : isolated in 1986, from sporocarp fruiting under Eucalyptus camaldulensis Dehn, at Djibélor, Senegal;

ORS.7870 : isolated in 1987, from sporocarp fruiting under Racosperma holosericea (Cunn. ex G. Don) Pedley (syn. Acacia holosericea Cunn. ex G. Don), at Sangalkam, Senegal.

The isolates ORS.X004, ORS.7870 and PR86 have been deposited at the B.S.S.F.T. (Nogent sur Marne, France).

The Pisolithus strains were isolated on MNM agar (Marx, 1969) and subcultured on the same medium before inoculating the host trees. They originated from sporocarps which differed from Pisolithus tinctorius (Pers.) Coker & Couch (syn. P. arhizus (Pers.) Rausch) by the straight ornamentation of the spores and by the white colour of the peridium of young sporocarps (Demoulin & Dring, 1974; Thoen, 1985). As far as is known, these forms of Pisolithus are confined to tropical regions where they mainly grow under introduced Eucalyptus spp. (Thoen, 1985).

Origin of the seeds

Certified seeds of Casuarina cristata F. Muell. ex Miq., C. cunninghamiana Miq., C. glauca Sieb ex Spreng., C. obesa Miq., Allocasuarina campestris (Diels) L. Johnson, A. decaisneana (F. Muell.) L. Johnson, A. luehmannii (R.T. Bak.) L. Johnson, A. torulosa (Ait.) L. Johnson and A. verticillata (Lam.) L. Johnson⁽⁺⁾ were provided by Kimberely seeds Pty Ltd. The seeds of Casuarina equisetifolia Forst. were collected at Kayar (Senegal) in May 1986 (86/1398/ISRA/CNRF).

(+)

51 King Edward Road, Osborne Park, W.A., 6017 Australia.

Seeds were surface sterilized by immersion for 3 min in concentrated sulfuric acid and rinsed five times in sterile distilled water. The seeds were allowed to germinate in the dark at 30°C for 5d in Petri dishes filled with water agar (8 g l⁻¹). The germinants were transferred in 125 x 4cm test tubes filled with 90ml of a perlite, peat and water mixture (90/5/17.5 by vol.) previously autoclaved twice at 120°C for 20 min.

Seedlings were placed for 5 to 6 weeks in a growth chamber (28°C day 18°C night; day length 16 h; light intensity 107 E m⁻² s⁻¹). Before inoculation 50 ml sterile liquid MNM medium was added to the tubes. Agar plugs 8 mm diam of actively growing Pisolithus sp. were put for 4 d on fresh agar MNM medium to stimulate the regeneration of the hyphal tips. Three plugs were then transferred to each test tube. Inoculations were replicate three times. Two months after inoculation, the seedlings were carefully removed from the test tubes and gently washed under running tap water. Root tips were examined under the dissecting microscope for fungal sheath formation. Root tips showing a fungal sheath were hand sectioned, cleared in 15% sodium hypochloride, rinsed in distilled water and stained with 0.5% Congo red. Root sections were examined under a differential interference contrast (DIC) microscope. Tannin deposits in epidermal and cortical cells were located by examining uncleared root sections under the stereoscopic microscope.

Results

Table 1 shows the degree of mycorrhiza formation two months

after inoculation of three Pisolithus isolates on five Casuarina and five Allocasuarina species. The isolates behaved differently on Casuarina vs. Allocasuarina species.

On Casuarina equisetifolia, only isolate ORS.X004 formed well developed ectomycorrhizas, viz. with fungal sheath and Hartig net (Fig. 1a), whereas ORS.7870 and PR86 formed only a fungal sheath. On the other Casuarina species, the three Pisolithus isolates achieved a well developed fungal sheath but no Hartig net, except for PR86, which failed to form any sheath on C. cunninghamiana.

On the five Allocasuarina species, all Pisolithus isolates formed well developed ectomycorrhizas. Isolates ORS.7870 and PR86 invaded some cortical cells of A. luehmannii and A. decaisneana to form ectendomycorrhizas (Fig. 1b).

Ectomycorrhizas occurred on single root tips as well as on ramified roots (Fig. 1c). The surface of the fungal sheath was yellow, felty with numerous emanating hyphae (Fig. 1d).

Table 2 shows the main anatomical characteristics of Casuarina and Allocasuarina mycorrhizas. The values of the table are established on single observations and the mean values of columns A, B, C, D, E are only indicative. Sections of mycorrhizas are illustrated in figures 1 and 2. Epidermal cells of mycorrhizas devoid of Hartig net were not radially elongated (Fig. 1e, f, g) whereas those of mycorrhizas with Hartig net were more or less radially elongated (Fig. 1h, Fig.2), sometimes forming a palisade layer (Fig. 2a, b, c, d). The radial penetration of the Hartig net never exceeded the epidermal cells and ranged from 10µm to 29µm. Thickening of the epidermal cell wall in direct contact

with the fungal sheath was observed in some Casuarina (Fig. 1g) as well as in some Allocasuarina mycorrhizas. Tannin deposits were present in the epidermal cells of mycorrhizas of both genera. Tannins were also observed in cortical cells of all Casuarina species and of Allocasuarina luehmannii and A. verticillata. The fungal sheath was prosenchymatous (Fig. 1 and 2) with radiating hyphae (Fig. 1a, e). In Casuarina equisetifolia mycorrhizas, the emerging hyphae of the sheath were incrustated by small crystals of calcium oxalate (Fig. 1a). The sheath thickness varied considerably on the same host-tree according to the fungal isolate (e.g., from 24 μ m to 57 μ m in Casuarina cristata; from 36 μ m to 90 μ m in Allocasuarina decaisneana). The diameter of the mycorrhizas varied but the mean was close to 300 μ m in both host genera. The mean percent of cross-sectional area of the sheath reached 48% for both Casuarina and Allocasuarina mycorrhizas. In Allocasuarina ectomycorrhizas, the mean depth of the Hartig net was 17.2 μ m which is approximatively the third of the mean thickness of the fungal sheath (46.9 μ m). The number of xylem poles varied from 2 to 3 in Casuarina and from 2 to 4 in Allocasuarina. It was rather constant within species and might be a specific characteristic.

Discussion

The results confirmed field observations by Reddel et al. (1986) showing that Allocasuarina species formed ectomycorrhizas more commonly than did Casuarina species.

Pisolithus sp. has a broad host range, since in addition to Casuarina and Allocasuarina, it is also associated in Senegal

with the genera Eucalyptus, Melaleuca and Racosperma (Thoen & Ducousso, 1990).

Tannin deposits were observed in the epidermal cells of all the synthesized mycorrhizas. Such deposits are common in natural ectomycorrhizas in the tropics (e.g. Alexander & Högberg, 1986; Thoen et al., 1990; Thoen & Ducousso, 1990). Tannins also occurred in cortical cells of some synthesized mycorrhizas. The role of tannins in mycorrhizal roots is not yet fully elucidated (Molina & Trappe, 1982). Tannin deposits are host reactions allowing, presumably, control of fungal aggressiveness. Thickening of the epidermal wall close to the fungal sheath was observed in some mycorrhizas. Host cell wall thickening may indicate incompatibility between host and fungus but occurs also in well-developed ectomycorrhizas (Molina & Trappe, 1982). Thickening of host cell wall might be another mechanism allowing to control penetration of the fungus.

The artificial conditions of our experimental design did not show beneficial influence of the fungal isolates on seedling growth, because the substrate was not deficient in P or other non-mobile nutrients. Beneficial influences of endomycorrhizas on nodulation and growth of Casuarina equisetifolia have been demonstrated (Diem & Gauthier, 1982; Gauthier et al., 1983). Further research is planned to study the efficiency of ectomycorrhizal Pisolithus isolates to promote growth, P-uptake and nodulation of Casuarinaceae. The effectiveness of mycorrhizas lacking a Hartig net also needs to be compared with that of fully-developed ectomycorrhizas.

Acknowledgements

Authors are grateful to Dr. P. Reddel which provided the australian isolate of Pisolithus sp. (PR86).

References

- Alexander, I.J. and Høggberg, P. 1986. Ectomycorrhizas of tropical angiospermous trees. New Phytol. 102, 541-549.
- Ba, A.M., Sougoufara, B. and Thoen, D. 1987. The triple symbiosis of Casuarina equisetifolia in Senegal. In : Mycorrhizas in the next decade (Ed. by D.M. Sylvia, L.L. Hung and J.H. Graham) p.121. University of Florida, Gainesville, Florida.
- Bamber, R.K., Mulette, K. and Mackowski, C. 1980. Mycorrhizal studies. In : Research report 1877-1978, pp.70-72. Forestry Comm. New South Wales. Sydney, Australia.
- Demoulin, V. and Dring, D.M. 1975. Gasteromycetes of Kivu (Zaire), Rwanda and Burundi. Bull.Jard.Bot.Nat.Belq. 45, 339-372.
- Diem, H.G. and Gauthier, D. 1982. Effet de l'infection endomycorhizienne(Glomus mosseae) sur la nodulation et la croissance de Casuarina equisetifolia. C.R.Acad.Sc.Paris 294, 215-217.
- Gauthier, D., Diem, G.H. and Dommergues, Y. 1983. Preliminary results of research on Frankia and endomycorrhizae associated with Casuarina equisetifolia. In : Casuarina. Ecology, Management and Utilisation (Ed. by S.J. Midgley, J.W. Turnbull, and R.D. Johnston) pp.211-217. CSIRO, Melbourne.

Academic Press, London.

- Marx, D.H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. I - Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic and soil bacteria. Phytopathol. 59, 153-163.
- Molina, R. and Trappe, J.M. 1982. Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential among Pacific Northwest conifers and fungi. Forest Sc. 28, 423-458.
- National Research Council. 1984. Casuarinas : Nitrogen-fixing trees for adverse sites. National Academy Press, Washington, D.C.
- Reddel, P. Bowen, G.D. and Robson, A.D. 1986. Nodulation of Casuarinaceae in relation to host species and soil properties. Austr.J.Bot. 34, 435-444.
- Tandy, P.A. 1975. Studies of sporocarpic Endogonaceae in Australia. Ph.D. Thesis, University of Adelaide
- Thoen, D. 1985. Is Pisolithus found under Eucalyptus in Senegal conspecific with the mycorrhizal Pisolithus tinctorius ? Abstract of the IXth European Mycological Congress. Oslo, Norway.
- Thoen, D. and Ducousso, M. 1990. Champignons et ectomycorhizes du Fouta-Djalon (Guinée). Bois et Forêts des Tropiques (in press).
- Thoen, D., Ba, A.M. and Ducousso, M. 1990. Statut mycorrhizien et mycorhizes de quelques plantes ligneuses indigènes et exotiques des secteurs guinéen, soudanien et sahélien du Sénégal. Bois et Forêts des Tropiques (in press).

Warcup, J.H. 1980. Ectomycorrhizal associations of Australian indigenous plants. New Phytol. 85, 531-535.

Table 1. Infectiveness of three isolates of Pisolithus sp. on five Casuarina and five Allocasuarina species after two months growth in vitro.

Host species	Pisolithus isolates		
	ORS.X004	ORS.7870	PR86
Casuarina cristata	(+)	(+)	(+)
Casuarina cunninghamiana	(+)	(+)	0
Casuarina equisetifolia	+	(+)	(+)
Casuarina glauca	(+)	NT	NT
Casuarina obesa	(+)	(+)	(+)
Allocasuarina campestris	+	+	+
Allocasuarina decaisneana	+	+	/+ /
Allocasuarina luehmannii	+	/+ /	+
Allocasuarina torulosa	+	+	+
Allocasuarina verticillata	+	+	+

+ , mycorrhiza with fungal sheath and Hartig net; (+) , mycorrhiza with fungal sheath only; /+ / , mycorrhiza with fungal sheath and endocellular invasion of cortical cells; 0, no mycorrhiza ; NT , isolate not tested.

Table 2. Main anatomical characteristics noted on cross sections of synthesized mycorrhizas of Casuarina and Allocasuarina species with three isolates of Pisolithus sp.

Host species	Isolate	(β) Anatomical characteristics							
		(α) A	B	C	D	E	F	G	H
<i>Casuarina cristata</i>	1	280	57	65	0	60	3	++	+
	2	300	41	47	0	72	3	++	+
	3	180	24	46	0	46	3	++	-
<i>C. cunninghamiana</i>	1	280	38	46	0	68	2	++	+
	2	280	44	53	0	48	2	++	-
<i>C. equisetifolia</i>	1	340	45	46	13	80	3	++	-
	2	440	42	34	0	100	3	++	-
	3	250	34	47	0	69	3	++	-
<i>C. glauca</i>	1	260	52	64	0	60	3	++	-
<i>C. obesa</i>	1	240	32	46	0	64	3	++	+
	2	230	32	48	0	70	3	++	-
	3	280	26	34	0	80	3	++	-
Mean value		280.0	38.9	48.2		68.1			
SEM		64.0	9.9	9.9		14.7			
<i>Allocasuarina campestris</i>	1	368	50	47	16	96	3	+	-
	2	370	60	54	19	90	3	+	-
	3	376	54	49	17	100	3	+	-
<i>A. decaisneana</i>	1	240	45	61	14	82	3	+	-
	2	270	36	46	18	76	3	+	-
	3	640	90	48	16	96	3	+	+
<i>A. luehmannii</i>	1	340	62	68	15	64	2	++	-
	2	290	22	28	0	64	3	++	+
	3	260	54	66	16	60	2	+	-
<i>A. torulosa</i>	1	210	24	40	16	60	3	+	+
	2	240	24	36	12	80	3	+	-
	3	280	28	36	18	50	2	+	-
<i>A. verticillata</i>	1	220	24	39	25	64	4	++	-
	2	334	55	55	10	90	4	++	+
	3	320	52	54	29	95	4	+	+
Mean value		317.2	46.9	48.5	17.2	77.8			
SEM		105.0	18.8	11.5	4.8	16.4			

General mean	300.7	42.5	48.3	16.9	73.5
SEM	89.6	15.8	10.5	(4.8)	16.1

(α)

Isolates : 1, ORS.X004; 2, ORS.7870; 3, PR86.

(β)

A, diameter of mycorrhiza (μm); B, fungal sheath thickness (μm); C, percent of cross-sectional area of the fungal sheath (%); D, radial depth of Hartig net (μm); E, stele diameter (μm); F, number of xylem poles; G, tannin deposit in epidermis (+), in epidermis and cortical cells (++); H, presence (+) or absence (-) of wall thickening of epidermic cells.

Figure 1. Synthesized mycorrhizas of Casuarina and Allocasuarina species with Pisolithus isolates.

- (a) T.S. Casuarina equisetifolia + ORS.X004. (b) T.S. Allocasuarina decaisneana + PR86. (c) and (d) Stereomicrographs of Allocasuarina verticillata + ORS.X004. (e) L.S. Casuarina glauca + ORS.X004. (f) T.S. Casuarina cristata + ORS.7870. (g) T.S. Casuarina obesa + ORS.X004. (h) L.S. Allocasuarina verticillata + ORS.X004.

Key : Sh, sheath; Ih, incrustated hyphae; Hn, Hartig net; Lc, labyrinthine cells of Hartig net; Hco, intracellular hyphae in cortical cells; Ep, epidermal cells; Co, cortical cells; Th, wall thickening; St, stele; bar = 20µm except for (c) and (d) where bar = 1mm.

Abbreviations : T.S., transverse sections; L.S., longitudinal sections.

Figure 2. Transverse sections of synthesized ectomycorrhizas of Allocasuarina species with Pisolithus isolates.

- (a) Allocasuarina campestris + PR86. (b) and (c) Allocasuarina verticillata + ORS.X004. (d) and (e) Allocasuarina campestris + ORS.7870. (f) Allocasuarina decaisneana + ORS.7870. (g) Allocasuarina luehmannii + ORS.X004. (h) Allocasuarina torulosa + ORS.X004. (i) and (j) Allocasuarina torulosa + PR86.

Key : as for figure 1. Bar = 20µm.

C. La réponse de *Casuarina equisetifolia* à l'inoculation au champ avec une souche de *Frankia* ORS 021001 (syn : Cj-1-82) incluse dans une matrice polymérique

Response of field-grown *Casuarina equisetifolia* to inoculation with *Frankia* strain ORS 021001 entrapped in alginate beads

B. SOUGOUFARA¹, H.G. DIEM² and Y.R. DOMMERGUES²

¹Ministère de la Protection de la Nature et ORSTOM, B.P. 1386, Dakar, Sénégal and ²BSSFT (ORSTOM/CTFT/CNRS), 45 bis, avenue de la Belle Gabrielle, F-94736 Nogent-sur-Marne Cédex, France

Key words: *Casuarina equisetifolia*, *Frankia*, alginate beads, N₂ fixation, Sénégal

Abstract

A large scale field experiment (ca 1 ha) was carried out in Senegal, to evaluate the response of *Casuarina equisetifolia* to inoculation with *Frankia* strain ORS 021001 entrapped in alginate beads. Biomasses (expressed as dry weight or total nitrogen) of assimilatory branchlets, wood and roots, and nodules were measured in uninoculated and inoculated trees, randomly sampled 1, 2 and 3 years after transplantation in the field. When biomasses were expressed as dry weight, increases due to inoculation were similar at the three sampling dates, 45, 36 and 40%, respectively. When biomasses were expressed as total nitrogen, the response to inoculation with time was much higher in the 2nd year than in the 1st and 3rd year. N₂ fixation, estimated using the difference method reached 2.48, 12.25 and 13.44 g N₂ fixed annually per tree. Correspondingly, nodule dry weights, expressed in g per tree, were 2.5, 12.18 and 22.75 at the end of the 1st, 2nd and 3rd year, respectively. In spite of the positive response of field-grown *Casuarina equisetifolia* to inoculation, the decrease of N₂ fixation observed in the third year was probably due to unfavorable climatic conditions coupled with insect attacks at the beginning of the third year.

Introduction

In the last few years, trials carried out under controlled conditions, in greenhouses and on microplots have demonstrated that various species of Casuarinaceae can become more productive if young plants are inoculated with a *Frankia* strain (Gauthier *et al.*, 1985; Reddell and Bowen, 1985).

Until recent years, no field trials were initiated to confirm the success of the trial practices if used under practical forestry conditions. For this reason, experiments were organized in Australia and Zimbabwe by P. Reddell and his group (Reddell *et al.*, 1988) and at the same time by the authors in Senegal.

This report presents the results of a trial, established in 1984, in the interdune zone north of Dakar, Senegal.

Material and methods

Preparation of plants in the greenhouse

Casuarina equisetifolia seeds collected at Mbao, near Dakar, were sown on 16 April 1984 at Bel Air where the soil (0.4% C, 0.026% N) was first sterilized with methyl bromide. On 15 May 1984 the young plants were planted in polyethylene bags filled with the sterilized soil. At the same time half the plants (300 plants) were inoculated with a suspension which was obtained as follows: 15 g of air-dried alginate beads, containing *Frankia*, were rehydrated in phosphate buffer for a few hours and then crushed in 1.5 liters of distilled water.

The air-dried alginate beads were prepared by entrapping hyphae and sporangia of *Frankia* strain ORS 021001 (Diem *et al.*, 1982) in an alginate

Table 1. Characteristics of the soil in the eight plots at Notto, Senegal

	F1	F2	F3	F4	T1	T2	T3	T4
Clay (%)	1.9	2.5	1.7	1.8	1.3	2.1	1.5	2.3
Fine silt (%)	0.5	0.5	1.2	1.3	0.8	1.3	1.0	1.3
Fine sand (%)	33.0	34.8	34.7	27.2	31.4	35.0	28.7	33.4
Nitrogen (‰)	0.047	0.071	0.065	0.055	0.057	0.121	0.065	0.057
Avail P ppm	25	13	13	13	13	61	21	36
Total P ppm	170	180	200	170	170	320	160	210
pH	5.7	5.1	5.7	5.2	6.0	5.9	6.0	5.3

F1, F2, F3, F4 = plots planted with inoculated *Casuarina equisetifolia*.

T1, T2, T3, T4 = plots planted with uninoculated *Casuarina equisetifolia*.

solution according to the method used for microbial immobilization (Diem *et al.*, 1988). The beads were then air-dried and stored for *ca* 2 years before being used. While in the greenhouse, the plantlets received 100 ml of Hoagland solution (1/4 th dilution) once a week.

Transplanting to the field

On 23 July 1984, when the greenhouse plants were about 30 cm high, they were transplanted to the permanent plantation site at Notto, 80 km north of Dakar and 5 km from the coast. Soil characteristics are shown in Table 1. The plantation was established after rain had wetted the soil to a depth of 30–40 cm. Throughout the first year of the experiment each plant was given 200 liters of water. The plants were divided over 8 plots, 416 m² each (4 controls and 4 inoculated plots), 84 plants per plot, which amounts to 2,500 trees ha⁻¹. The plots were surrounded by a row of *Eucalyptus camaldulensis* to reduce contamination and later to make an estimate of nitrogen fixation using the natural abundance technique.

To avoid contamination, plots with each of the two treatments were laid out on both sides of an axis that followed the fertility gradient line. The result was that comparisons between plots needed to be calculated in pairs, the F plots were inoculated, the T plots were the controls: couple F1-T1, couple F2-T2, couple F3-T3 and couple F4-T4.

Fertilization and rainfall

In the first year 5 g K₂HPO₄ were applied to each

tree. In the second and the third years, the amounts were increased to 10 g and 15 g respectively.

Annual rainfall: 215 mm in 1985, 375 mm in 1986 and 463 mm in 1987. Except at the first year of planting out, the trees were not given supplemental irrigation.

Sampling

For three consecutive years (July 1985–July 1986 and July 1987), five randomly selected trees were pulled out from specially planted rows in each of the 8 plots. After being measured and weighted, the trees were divided into four parts: assimilatory branchlets, branches, roots and nodules. These parts were dried and then ground to a powder. Total nitrogen was determined on subsamples of the ground powders.

Results and discussion

Emphasis could be placed on the fact that, except for a few trees in control plots T4 and T2, no control plot trees were nodulated, which shows that the soil had no, or at least very few, *Frankia* strains infective for *Casuarina*. During sampling, all nodulated trees found in the control plots were discarded. There were very few: one in 1985, two in 1986 and two in 1987.

Table 2 shows that, except for height, the response of *Casuarina equisetifolia* to inoculation was significant ($P \leq 0.05$) to very significant ($P \leq 0.01$). The beneficial effect of inoculation related to the biomass of the different fractions of the trees, whether it was expressed in terms of dry weight or total N. The shoot/root ratio calculated

Response of *Casuarina* to inoculation with *Frankia* 135

Table 2. Effects of inoculation with *Frankia* strain ORS 021001 on the height and the biomass, expressed as dry weight or total nitrogen, of the assimilatory branchlets, branches (including trunks, and roots) and the nodules of *Casuarina equisetifolia* 1, 2 and 3 years after being transplanted in the field (Notto, Senegal)

Inoculation	Height (cm)	Dry weight (g tree ⁻¹)				Total N (g tree ⁻¹)				Shoot root expressed on	
		bran.	a.b.	roots	nod.	bran.	a.b.	roots	nod.	Weight basis	Total N basis
July 1985 (1yr. after transplantation)											
0	151	163	89	266	0	0.63	1.46	1.24	0	0.95	1.69
+	182	324	119	309	2.55	1.99	2.17	1.60	0.04	1.42	2.54
	*	**	**	*		**	**	*		*	**
July 1986 (2yrs after transplantation)											
0	291	890	628	507	0	5.64	9.03	2.52	0	2.99	5.82
+	313	1349	871	626	12.18	9.39	16.24	3.21	0.20	3.48	7.52
	NS	**	**	**		**	**	**		*	*
July 1987 (3yrs after transplantation)											
0	500	1451	1000	840	0	7.32	15.57	4.74	0	2.91	4.85
+	575	2220	1356	1031	22.75	12.20	23.35	5.12	0.40	3.39	6.47
	NS	**	**	**		**	**	NS		**	*

Significance level: * ($P \leq 0.05$); ** ($P \leq 0.01$); NS = not significant.

a.b. = assimilatory branchlets.

bran. = branches and trunks.

nod. = nodules.

0 = uninoculated plants. + = inoculated plants.

on dry weight or total N basis was favorably affected at the three sampling times.

Assuming that N_2 fixation can be measured by the difference between the total N content of inoculated trees (that fix N_2) and the total N content of uninoculated trees (that do not), N_2 fixed by the end of the first year (July 1985) can be estimated at an average $5.80 - 3.32 = 2.48$ g N_2 per tree. By the end of the second year (July 1986) the average N_2 fixed per tree was $29.44 - 17.19 = 12.25$ g N_2 . By the end of the third year (July 1987) the average N_2 fixed was $41.07 - 27.63 = 13.44$ g N_2 .

Annual N_2 fixed rose from a low 2.48 g per tree in the first year, by 9.38 g in the second year and decreased sharply to 1.19 g in the third year. Corre-

lation matrices obtained at each sampling time showed high coefficients of correlation (*ca* 0.90) between nodules and tree biomass and also between percentage of N in assimilatory branchlets and tree biomass. By contrast, the coefficient of correlation between percentage of N in branches and biomass was much lower (Table 3).

Conclusion

The present paper reports for the first time the successful use of entrapped *Frankia* in alginate beads as an inoculant for field grown *Casuarina* and that *Frankia* beads seem to be still effective

Table 3. Correlations between nodule biomass expressed in terms of dry weight (NODW) or total N (NODN), and percentage of N in the assimilatory branchlets (E) or branches (F) expressed in terms of arc sin on the one hand and biomass of aerial parts of the trees (assimilatory branchlets + branches) expressed in terms of dry weight (DW) or total N (TOTN) on the other hand

Year	Coefficient of correlation							
	NODW DW	NODW TOTN	NODN DW	NODN TOTN	E DW	E TOTN	F DW	F TOTN
1	0.94	0.95	0.93	0.95	0.85	0.85	0.03	0.97
2	0.93	0.90	0.92	0.89	0.86	0.92	0.67	0.72
3	0.92	0.91	0.92	0.91	0.92	0.93	0.27	0.37

after a two year storage at room temperature. Instead of using an inoculant made of a *Frankia* culture merely entrapped in alginate beads, a procedure followed in the experiment reported here, Diem *et al.* (1985) (quoted by Diem *et al.*, 1988) and Burleigh *et al.* (1988) proposed to improve this type of inoculant by allowing *Frankia* to grow within the alginate beads, a procedure which also appeared to be most successful.

Inoculating *Casuarina equisetifolia* with *Frankia* significantly improved tree biomass, expressed as dry weight for total N, and the shoot/root ratio, expressed as dry weight or total N.

The positive response of *Casuarina equisetifolia* to inoculation at Notto can be explained by the fact that the soil, like most soils in Western Africa, is devoid of *Frankia* or contains a very low number of native *Frankia*. The nodulated trees found in the control (uninoculated) were probably infected through contamination in the nursery. However, the hypothesis that *Frankia* preexisted in the soil cannot be entirely rejected. Further studies are planned to verify whether the nodulated trees in the control plot were infected by unknown native strains or by ORS 021001.

Height was not significantly increased by inoculation, a result showing that, when dealing with trees, the use of height as the sole criterion for assessing the effect of inoculation may not be sufficient.

The response to inoculation in the Notto trial was less spectacular than that reported in the experiment carried out recently in Zimbabwe by Reddell *et al.* (1988) which is the only other field trial reported, to date, using liquid cultures of *Frankia* as inoculant for Casuarinaceae.

The reason for this dissimilarity is probably because at Notto drought limited N₂ fixation and plant growth, whereas in Zimbabwe the environmental conditions were much more favorable.

N₂ fixation assessed by the difference method, a method which we found to probably overestimate the actual N₂ fixation in soils similar to that of Notto (Sougoufara *et al.*, 1989b) was much higher in the second year than in the first and third years. These differences can be attributed either to soil chemical status (the presence of combined N possibly inhibiting N₂ fixation during the first year and nutrient deficiencies being possibly involved in the third year) and/or insect attacks from borers (co-

leopters of bostrychidae). In absolute value, the amount of N₂ fixed was in the range of that observed in field-simulating conditions, that is 3 g per tree in 6.6 months (Gauthier *et al.*, 1985) with *Casuarina equisetifolia* of the same origin. However it was much lower than that obtained with a selected clone of *Casuarina equisetifolia* which fixed as much as 40–70 g of N₂ in 2 years (Sougoufara *et al.*, 1989b).

As was observed in other experiments, carried out in containers (Sougoufara *et al.*, 1989a), inoculation with *Frankia* significantly increased the shoot/root ratio, the relative increases for ratios calculated from total N being 50, 29 and 33% at the end of 1st, 2nd and 3rd year respectively.

Correlations between the different parameters were examined in order to find out whether some of them could be used to predict the effect of inoculation on the relative increase of tree biomass expressed as dry weight or total N. From Table 3 it is clear that there was a significant positive correlation between tree biomass and nodule biomass, a correlation that we have already observed in all other trials, with *Casuarina equisetifolia* (Sougoufara *et al.*, 1989a). As suggested by recent trials, nodulation is not necessarily correlated with N₂ fixation per se. This absence of correlation is illustrated here by the fact that N₂ fixation sharply decrease during the 3rd year in spite of the doubling of the nodule weight during the same year.

The fact that tree biomass was correlated with the N% in the assimilatory branchlets—and not that of the branches—is of interest because a non destructive N analysis of the assimilatory branchlets might be used as an indicator of the response of trees to inoculation.

From this experiment, which concerned ca 0.5 ha (surface of inoculated plots), and Reddell's experiment in Zimbabwe, it can be inferred that the technology of inoculation with cultures of *Frankia* or *Frankia* entrapped in alginate beads is realistic and feasible on a large scale in the tropics.

Acknowledgements

Financial support for the study has been provided by ORSTOM, International Foundation for Science and Ministère de la Protection de la Nature du Sénégal. We are grateful to Marc Du-

cousso for performing statistical analyses on the data and Jean Bakhoun for technical assistance.

References

- Burleigh S, Baker D and Torrey J G 1988 Mass inoculum production protocol for *Casuarina*. In Abstracts 7th International Meeting on *Frankia* and actinorhizal plants. Storrs, Conn. August 7-10.
- Diem H G, Gauthier D and Dommergues Y R 1982 Isolement et culture *in vitro* d'une souche infective de *Frankia* isolée de nodules de *Casuarina*. C R. Acad. Sci. Paris Série C 295, 759-763.
- Diem H G, Duhoux E, Simonet P and Dommergues Y R 1988 Actinorhizal symbiosis biotechnology : the present and the future. In 8th International Biotechnology Symposium. Proc. Vol. II. Eds G Durand, L Bobichon and J Florent. pp 987-995 Société Française de Microbiologie. Paris.
- Gauthier D, Diem H G, Dommergues Y R and Ganry F 1985 Assessment of N_2 fixation by *Casuarina equisetifolia* inoculated with *Frankia* ORS 021001 using ^{15}N methods. Soil Biol. Biochem. 17, 375-379.
- Reddell P and Bowen G D 1985 *Frankia* source affects growth, nodulation and nitrogen fixation in *Casuarina* species. New Phytol. 100, 115-122.
- Reddell P, Rosbrook P A, Bowen G D and Gwaze D 1988 Growth response in *Casuarina cunninghamiana* plantings to inoculation with *Frankia*. Plant and Soil 108, 79-86.
- Sougoufara B, Duhoux E and Dommergues Y R 1989a Choix des critères de sélection chez un arbre fixateur de N_2 : *Casuarina equisetifolia*. Oecol. Plant. 10, 215-224.
- Sougoufara B, Danso S K A, Diem H G and Dommergues Y R 1989b Estimating N_2 fixation and N derived from soil by *Casuarina equisetifolia* using labelled ^{15}N fertilizer : Some problems and solutions. Soil. Biol. Biochem. (submitted).

D. La sélection clonale de *Casuarina equisetifolia*

D1. Mise au point de techniques originales de bouturage et de micropropagation

**MULTIPLICATION VEGETATIVE DE
CASUARINA EQUISETIFOLIA (FORST.)
PAR LES TECHNIQUES DE BOUTURAGE FLOTTANT
ET DE MICROPROPAGATION**

RESUME

Nous avons mis au point deux méthodes de multiplication végétative de l'espèce *Casuarina equisetifolia* : une méthode fondée sur une technique de bouturage flottant et une méthode fondée sur une technique de micropropagation. Dans les deux cas, l'explant originel est constitué par des fragments de rameaux photosynthétiques peu lignifiés, prélevés sur des individus d'arbres sélectionnés.

Dans le cas du bouturage flottant, les explants sont placés sur une plaque de polystyrène que l'on fait flotter sur un milieu nutritif (Hoagland et Arnon) liquide contenu dans un bac en plastique, l'enracinement est obtenu après 4 semaines de culture.

Dans le cas du microbouturage, la mise en culture des explants sur un milieu minéral de base (Murashige et Skoog) gélosé contenant une cytokinine (2,5 mg/l de BAP) et une auxine (0,01 mg/l d' ANA) permet le débourrement des bourgeons axillaires. Après un transfert sur le même milieu minéral de base enrichi en charbon actif, à raison de 20 g/l, les bourgeons axillaires évoluent en rameaux végétatifs qu'il est possible d'enraciner dans un milieu de rhizogénèse contenant seulement une auxine (0,03 mg/l d' ANA).

Les boutures et les microboutures enracinées sont repiquées en pots puis élevées en serre afin de vérifier leur aptitude au développement orthotrope.

Mots-clés : Bouturage, *Casuarina equisetifolia*, Micropropagation, Multiplication végétative.

INTRODUCTION

Comme nombre d'espèces ligneuses, les Casuarinacées n'ont jamais fait l'objet d'une sélection. Chaque espèce de cette famille est caractérisée par une grande variabilité génétique et physiologique dans son aptitude à croître et à fixer N_2 (Gauthier et al., 1985 ; Sougoufara et al., 1987). Etant donné que les programmes d'amélioration des ligneux fondés sur des expériences d'hybridation sexuée sont nécessairement des programmes de longue durée, il apparaît judicieux de faire appel à des méthodes à court terme simples pour exploiter la variabilité naturelle de ces arbres.

La méthode de sélection clonale fondée sur les techniques de bouturage classique (bouturage flottant) et de micropropagation des phénotypes d'arbres sélectionnés peut répondre à cet objectif et donc constituer une méthode susceptible de donner des résultats dans des délais relativement courts. Il y a quelques années, on a eu recours au bouturage pour multiplier certaines espèces de *Casuarina* (Somadundaran et Jagadees, 1987 ; Lundquist et Torrey, 1984 ; El Lakany et Shepherd, 1984 ; Husain et Ponnuswamy, 1980). Récemment quelques groupes de chercheurs ont tenté d'exploiter la variabilité génétique naturelle chez d'autres espèces actinorhiziennes telles que les Aulnes (Simon et al., 1987 ; Tremblay et Lalonde, 1984 ; Huss-Danell, 1980) ou les *Elaeagnus* (Bertrand et Lalonde, 1985) ou chez les légumineuses telles que *Acacia albida* (Gassama et Duhoux, 1986) ou *Acacia mangium* (A. Galiana, communication personnelle) pour améliorer le potentiel fixateur de N_2 de ces arbres.

Afin de pouvoir expérimenter sur du matériel homogène permettant une étude plus rigoureuse des interactions symbiotiques, nous avons mis au point parallèlement deux méthodes de multiplication végétative de l'espèce *Casuarina equisetifolia*, une méthode conventionnelle de bouturage classique conçu en milieu liquide (bouturage flottant) et une méthode de micropropagation.

Dans chaque cas nous avons utilisé comme explant, des fragments de rameaux photosynthétiques peu lignifiés, prélevés sur les branches d'ordre 1 et 2 au 1/3 supérieur des individus retenus.

2 - MATERIELS ET METHODES

2.1.- Technique de bouturage en milieu liquide (bouturage flottant)

Les explants (environ une cinquantaine) d'une longueur de 5-6 cm chacun sont d'abord trempés pendant 30 min dans une solution aqueuse de SDS ⁽¹⁾ 0,01%, puis rincés abondamment à l'eau distillée stérile avant d'être traités à la "Rootone F" ⁽²⁾, complexe d'hormones végétales de synthèse. Ce traitement s'est effectué en enfonçant la base humide de chaque explant dans la "Rootone F" sur une longueur de 3 mm. Ensuite les explants sont insérés à égale distance les uns des autres dans une plaque de polystyrène expansé de 90 mm d'épaisseur, en prenant soin de faire dépasser leur base de 1 cm. La plaque de polystyrène au préalable est percée de trous au moyen d'une aiguille chauffée, puis stérilisée par trempage pendant 3 h dans de l'eau de javel (1 l d'hypochlorite de soude 12,5% de chlore actif, dilué dans 3 l d'eau).

Puis la plaque de polystyrène est posée sur une solution nutritive stérile de Hoagland et Arnon (1938) (Tableau 1), diluée au 1/4 sans azote, contenu dans une cuvette en plastique stérile. L'ensemble est recouvert d'une feuille de polyéthylène et placé dans une chambre de culture (Fig. 1). La solution nutritive est renouvelée chaque semaine.

2.2.- Technique de micropropagation

L'explant utilisé mesure 10-12 mm de long. Il est constitué de trois verticilles squamiformes. La désinfection du matériel végétal est obtenue par le trempage des explants pendant 1 min dans une solution de HgCl₂ 0,1%, suivi de 5 rin-

(1) Dodecyl Sodium Sulfate réf. Sigma L 5750.

(2) Compagnie Française de produits industriels, 28, bd Gamelinat - BP 125 - 92233 Gennevilliers.

çages successifs à l'eau distillée stérile. Les explants sont ensuite introduits dans les tubes de culture (24 x 150 mm) contenant 20 ml d'une solution nutritive gélosée à raison d'un explant par tube (planche 1, fig. 1). En ce qui concerne les conditions de culture, nous avons utilisé trois milieux de culture.

2.2.1.- Milieu (A) d'induction de la caulogénèse

La solution minérale de Murashige et Skoog (1962) additionnée de vitamines (Nitsch et Nitsch, 1965), 30 g/l de saccharose, 0,01 mg/l d'acide α -naphtalène acétique (ANA), 6-benzylaminopurine (BAP) de 0 à 3 mg/l (Tableau 2).

2.2.2.- Milieu (B) d'élongation

C'est le milieu (A) additionné de charbon actif à raison de 20 g/l (Merck 2186).

2.2.3.- Milieu (C) d'enracinement

C'est le milieu (A) dépourvu de BAP et de charbon actif. Nous avons tenté des essais de rhizogénèse avec l'ANA, en utilisant les concentrations suivantes : 0,01 ; 0,02 ; 0,03 et 0,05 mg/l.

Tous les milieux sont ajustés à pH 5,5. L'agar (Bitek Agar Difco) est introduit à raison de 8 g/l. Les milieux sont ensuite stérilisés à l'autoclave pendant 30 min à 110° C. L'ensemble des cultures est placé dans une chambre de culture de 28°C sous une lumière incidente d'environ $50 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$ assurée par des tubes fluorescents au néon (Philips-TL. 40W 55) avec une photopériode de 17 h par jour.

3 - RESULTATS ET DISCUSSION

3.1.- Technique de bouturage en milieu liquide (bouturage flottant)

Après 4 semaines de culture, toutes les boutures sont enracinées. La longueur des racines formées est comprise entre 0,5-1 cm, le nombre de racines par

bouture variant entre 2 et 4 (planche 2, fig. 1). Ce mode de propagation simple, peu coûteux, classé parmi les techniques conventionnelles de multiplication végétative, présente trois avantages :

- 1) la base de l'explant reste toujours immergée,
- 2) il n'est pas nécessaire d'utiliser une chambre humide, le récipient jouant ce rôle à condition de le recouvrir d'une feuille de polyéthylène,
- 3) il est possible de produire un nombre élevé de boutures sur une petite surface (environ 100 boutures par dm^2).

3.2.- Technique de micropropagation

3.2.1.- Expression morphogénétique des explants

Après 2 semaines de culture sur le milieu d'induction à la caulogénèse (milieu A), on observe à l'aisselle des verticilles de chaque explant un débourrement des bourgeons axillaires. A la 4ème semaine, on constate que le nombre de bourgeons axillaires développés par explant a augmenté, atteignant en moyenne 3 ; le maximum étant obtenu avec la combinaison ANA/BAP ($0,01/2,5 \text{ mg litre}^{-1}$) (planche 1, fig. 2). En outre, le plus fort pourcentage d'explants ayant réagi est également obtenu avec cette combinaison hormonale (Tableau 3). Il semble donc que la reprise d'activité de l'explant mis en culture conduisant à la production de nouvelles unités végétales ne soit pas simplement liée à une suppression de la dominance apicale par ablation de l'apex, mais nécessite aussi une balance hormonale précise.

3.2.2.- Elongation des bourgeons axillaires

A ce stade, l'explant portant les bourgeons axillaires de taille relativement petite, environ 2-3 mm, est transféré sur le milieu d'élongation (milieu B). Après 5 semaines de culture sur ce milieu, on a observé un développement des bourgeons en des rameaux verts et vigoureux de 1-2 cm de long qui peuvent constituer autant de microboutures (planche 1, fig. 3). Ce résultat suggère que l'apport du

charbon actif au milieu de culture initial non modifié s'est révélé bénéfique à la phase d'élongation. Selon Anagnostakis (1974), l'adjonction de charbon au milieu de culture immobiliserait et/ou rendrait inassimilables les substances toxiques provenant du matériel frais ou apportées dans le milieu de culture. Par son action adsorbante, le charbon actif participerait au maintien du pH des milieux nutritifs et régulerait les balances entre régulateurs de croissance (Ernst, 1974). Il pourrait même entretenir et relâcher des substances favorables à la croissance et au développement, telles des monophénylamine (Boulay, 1979).

3.2.3.- Enracinement des rameaux néoformés

Les rameaux néoformés sont excisés puis transplantés dans le milieu de rhizogénèse (milieu C). Deux semaines après le transfert, 60% des rameaux sont enracinés (planche 1, fig. 4). Etant donné que l'enracinement des rameaux néoformés n'a pas posé de difficultés majeures, on n'a pas cherché à distinguer la phase d'induction de celle d'initiation et de croissance des racines ; ces dernières peu abondantes et très fines se sont développées à partir d'un petit cal cicatriciel blanchâtre. La longueur des racines est comprise entre 5-6 cm (Tableau 4).

3.3.- **Sevrage et acclimatation**

Au moment du passage en condition de culture autotrophe les vitroplants et les boutures classiques âgés respectivement de 3 mois et 1 mois sont cultivés séparément pendant 3 semaines dans une mini-serre contenant un support drainant constitué d'un mélange stérile perlite-vermiculite (1/2 perlite - 1/2 vermiculite, en volume). Lorsque les plantes ont bien développé leur système racinaire, elles sont repiquées dans des pots en plastique ou dans des gaines en polyéthylène contenant un sol stérile additionné de billes de polystyrène de 2 mm de diamètre (1/4 billes, 3/4 sol, en volume). En outre, on a apporté lorsque nécessaire, à chaque plant enraciné, 50 ml d'une solution nutritive Hoagland et Arnon (1938) diluée au 1/4 avec N. Au bout de 4 mois de séjour en pépinière, on a décelé sur une partie relativement importante environ 40% des nouvelles plantes

obtenues par la technique de bouturage flottant une tendance à la plagiotropie. Par contre, chez les nouvelles plantes obtenues par la technique de micropropagation, on a constaté une aptitude au développement orthotrope (planche 2, fig. 2).

CONCLUSIONS

Ces résultats ont permis de montrer qu'à partir d'explants sous forme de fragments de rameaux photosynthétiques :

- la multiplication végétative par la technique conventionnelle de bouturage flottant est possible chez *Casuarina equisetifolia* et s'avère être une méthode rapide de propagation d'individus d'arbres sélectionnés, mais les nouvelles plantes obtenues présentent souvent des degrés variables de plagiotropisme, d'aspect mature et de faible croissance.
- la multiplication végétative par la technique de micropropagation est également possible chez *Casuarina equisetifolia* et n'engendre aucune perte progressive de l'aptitude au développement orthotrope des nouvelles plantes obtenues. La caulogénèse induite sur le milieu de multiplication ne nous a pas permis d'obtenir un coefficient de multiplication élevé (en moyenne 3 par explant).

Cependant Aboe-Nil (1987) a montré qu'on pouvait stimuler la formation d'un grand nombre de bourgeons axillaires en utilisant une combinaison 2ip⁽¹⁾/ANA (5,0/0,005 IM) adaptée à l'espèce *Casuarina equisetifolia*. Cet auteur serait parvenu à propager des phénotypes d'arbres adultes sélectionnés sans utiliser une technique de rajeunissement, mais il n'a pas indiqué si les clones obtenus présentaient le défaut de plagiotropisme que nous avons constaté de notre côté.

Nous n'avons pas adopté cette approche pour obtenir un coefficient de multiplication plus élevé, mais nous nous sommes intéressé à une autre fondée sur l'utilisation d'explants constitués d'inflorescences femelles immatures qui sera présentée au sous-chapitre suivant.

(1) 2ip : N⁶ - [2-Isopentenyl] adenine - c'est une cytokinine.

REFERENCES

- ABOE-NIL M.M. (1987).- Micropropagation of *Casuarina*, Forestry Sciences. In : Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol. 3, Case Histories : Gymnosperms, Angiosperms and Palms. (Bonga J.M., Durzan Don J. ed), Martinus Nijhoff Dordrecht, 400-410.
- ANAGNOSTAKIS S.L., (1974).- Haploid plants from anthers of tobacco enhancement with charcoal. *Planta*, vol. 115, 281-283.
- BERTRAN L.J. & LALONDE M. (1985).- *In vitro* propagation and nodulation by *Frankia* of actinorhizal Russian Olive (*Elaeagnus angustifolia* L.). *Plant and Soil*, 87, 143-152.
- BOULAY M. (1979).- Multiplication et clonage rapide du *Sequoia sempervirens* par culture *in vitro*. In : Micropropagation d'arbres forestiers. Etudes et Recherches n° 12, AFOCEL, 49-55.
- EL-LAKANY M.H. & SHEPHERD K.R. (1984).- Preliminary observations on stump propagation in *Casuarina cunninghamiana*, *Australian Forest Research*, 14, 243-247.
- ERNST R. (1974).- The use of activate charcoal in a symbiotic seedling culture of *Paphiopedium* sp. *Am. Orchid. Soc. Bull.*, vol. 43, 35-38.
- GASSAMA Y.K. & DUHOUX E. (1986).- Micropropagation d'arbres adultes d'*Acacia albida* (Leguminosae). In : Les arbres fixateurs d'azote. L'amélioration biologique de la fertilité du sol. Actes des séminaires 17-25 mars 1986, Dakar, ORSTOM Paris, 216-221.
- GAUTHIER D.L., DIEM H.G. & DOMMERGUES Y.R. (1985).- Assessment of N₂ fixation by *Casuarina equisetifolia* inoculated with *Frankia* ORS021001 using ¹⁵N methods. *Soil Biol. and Biochem.*, 17, 375-379.

- HOAGLAND D.R. & ARNON D.I. (1938).- The water culture method for growing plants without soil. Calif. Agric. Exp. Stn. Circ. 347.
- HUSAIN A.M.M. & PONNUSWAMY P.K. (1980).- Propagation of *Casuarina junghuhniana* by planting shoots and root suckers. Indian Forest, 106, 298-299.
- HUSS-DANELLE (1980).- Nitrogen fixation and biomass production in clones of *Alnus incana*. New Phytologist, 85, 503-511.
- LIN M. & STABA E.J. (1961).- Peppermint and spearmint tissue culture callus formation and submerged culture. Lioydia, 24, 139-145.
- LUNDQUIST R. & TORREY J.G. (1984).- The propagation of *Casuarina* species from rooted stem cuttings. Botanical Gazette, 145 (3), 378-384.
- MURASHIGE R. & SKOOG F. (1962).- A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15, 473-497.
- NITSCH J.P. & NITSCH C. (1965).- Néof ormation de fleurs *in vitro* chez une espèce de jours courts : *Plumbago indica* L. Ann. Physiol. Veg., 7, 251-256.
- SIMON L., STEIN A., COTE S. & LALONDE M. (1985).- Performance of *in vitro* propagated *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. clones inoculated with *Frankia*. Plant and Soil, 87, 125-133.
- SOMASUNDARAN T.R. & JAGADEES S.S. (1977).- Propagation of *Casuarina equisetifolia* Forst. by planting shoots. Indian Forester 103, 734-738.
- SOUGOUFARA B., DUHOUX E., CORBASSON M. & DOMMERGUES Y.R. (1987).- Improvement of nitrogen fixation by *Casuarina equisetifolia* through clonal selection : a research note. Arid Soil Research Rehabilitation, 1, 129-132.
- TREMBLAY F.M. & LALONDE M. (1984).- Requirements for *in vitro* propagation of seven nitrogen-fixing *Alnus* species. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 3, 189-199.

Tableau 1 - Le milieu de Hoagland et Arnon (1938) dilué au 1/4 sans azote

	Concentration en g dans un litre d'eau (H.A.)
K_2SO_4	0,109
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,123
$Ca(H_2PO_4)_2$	0,029
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0,086
FeNa EDTA 0,2%	2 ml
Solution oligo éléments	0,25 ml
Ajuster le pH à 6,8	
NB : Pour avoir le milieu nutritif azoté, ajouter 17 mg de $(NH_4)_2SO_4$.	

Tableau 2 - Le milieu de Murashige et Skoog (1962) utilisé comme milieu de culture *in vitro*

A - Solution de base	
Macro-éléments de Murashige et Skoog Solution 1	Concentration en g dans 1,5 litre d'eau distillée
NH_4NO_3	20,62
KNO_3	23,75
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	5,5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4,62
KH_2PO_4	2,12
Micro-éléments de Murashige et Skoog Solution 2	Concentration en mg dans 1 litre d'eau
H_3BO_3	620
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2230
$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	860
KI	83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	2,5
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	2,5
Fe.EDTA d'après Lin et Staba (1961) Solution 3	Concentration en mg dans 100 ml d'eau distillée
Na_2EDTA	74
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	55,7

Solution de vitamines d'après Nitsch et Nitsch (1965) (X 10) Solution 4	Concentration en mg dans 50 ml d'eau distillée
Mésoinositol	1000
Glycine	20
Acide nicotinique	50
Pyridoxine HCl	5
Thiamine HCl	5
Acide folique	5
Biotine	0,5
Pantothénate de Ca	10

NB : Pour dissoudre, ajouter quelques gouttes de NaOH 1N

B - Milieu de culture	
Solution 1 macro-éléments	200 ml/l
Solution 2 micro-éléments	10 ml/l
Solution 3 FeEDTA	5 ml/l
Solution 4 solution de vitamines	5 ml/l
Saccharose	30 g/l
Charbon actif référence Merck 2186	20 g/l
- ANA, BAP	q.s.p.
- Agar	8 g/l
- Eau distillée	1 litre

Ajuster le pH à 5,6

Tableau 3 - Influence de la concentration de BAP et d'ANA sur le débourrement des bourgeons axillaires de fragments de rameaux photosynthétiques de *Casuarina equisetifolia*

Concentration en mg/l de BAP avec ANA = 0,01 mg/l	Nombre d'explants utilisés	(%) explants ayant réagi	Nombre moyen de bourgeons axillaires néoformés par explant
0	40	0,15	0,18
2	41	73	2,23±0,35a (1)
2,5	45	97	2,75±0,40a
3	39	53	1,56±0,35b

(1) Dans la colonne de droite les données suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement ($P < 0,01$).

Tableau 4 - Influence de la concentration d'ANA sur l'enracinement des rameaux néoformés de *Casuarina equisetifolia*

Concentration en mg/l d'ANA	Nombre d'explants utilisés	(%) rameaux néoformés enracinés	Nombre moyen de racines par rameau néoformé
0	39	0	0
0,01	38	0	0
0,02	42	11	1
0,03	40	60	2
0,05	45	33	1,5

PLANCHE 1

Fig. 1 Explant de *Casuarina equisetifolia* mis en culture dans le milieu de multiplication de Murashige et Skoog (milieu A). Chaque explant est composé d'un rameau photosynthétique de 10-12 mm de long (Barre = 0,5 cm).

Fig. 2 Débourrement des bourgeons axillaires d'un explant âgé de 3 semaines dans le milieu (A). Les bourgeons axillaires sont situés à l'aisselle des écailles (E) disposées en verticilles (Barre = 1 mm).

Fig. 3 Elongation comparée de deux explants, 5 semaines après la mise en culture dans le milieu de Murashige et Skoog. Celui de droite sans charbon actif dans le milieu (A) et celui de gauche dans le milieu (B) avec charbon actif (Barre = 1 cm).

Fig. 4 Rameau néoformé enraciné, 2 semaines après le transfert sur le milieu de rhizogénèse (Barre = 0,5 cm).

PLANCHE 1

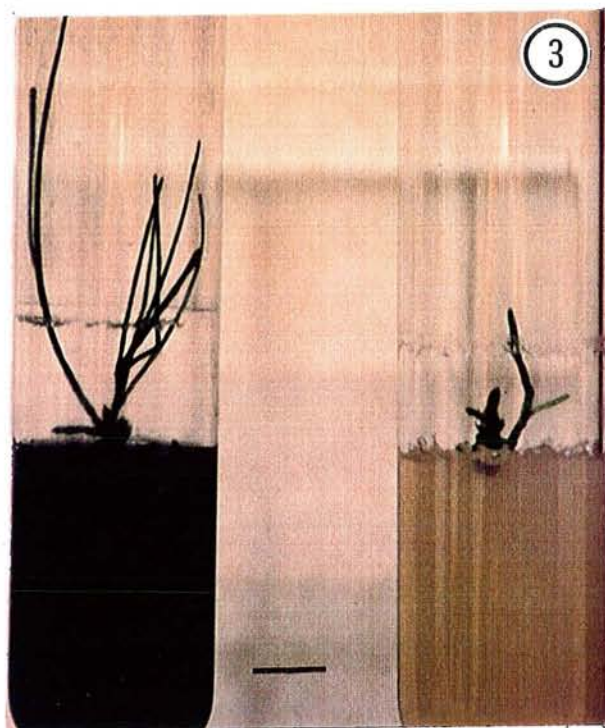
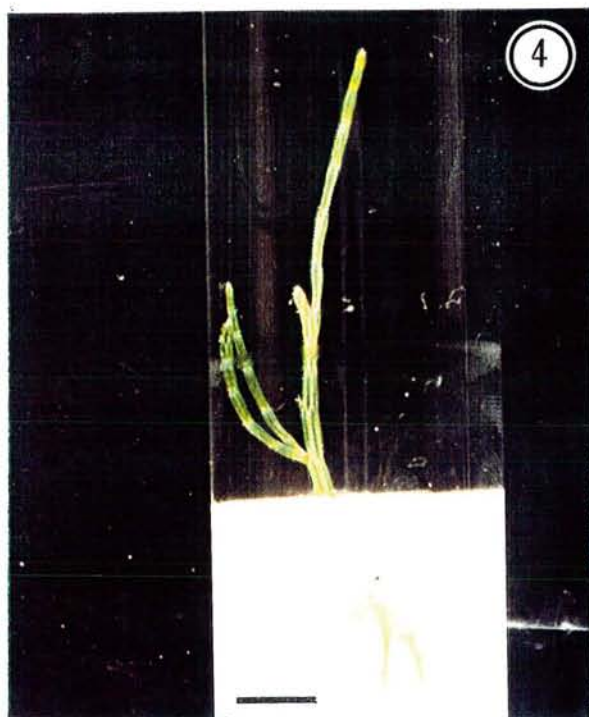
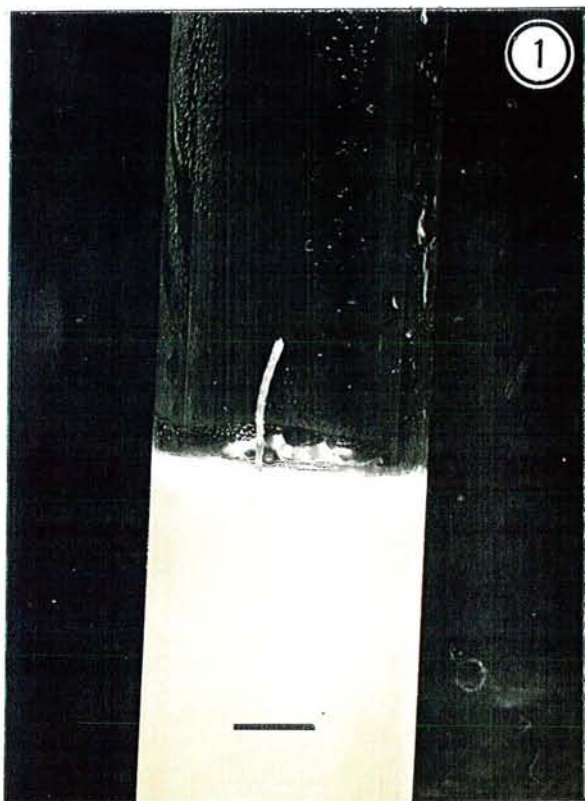
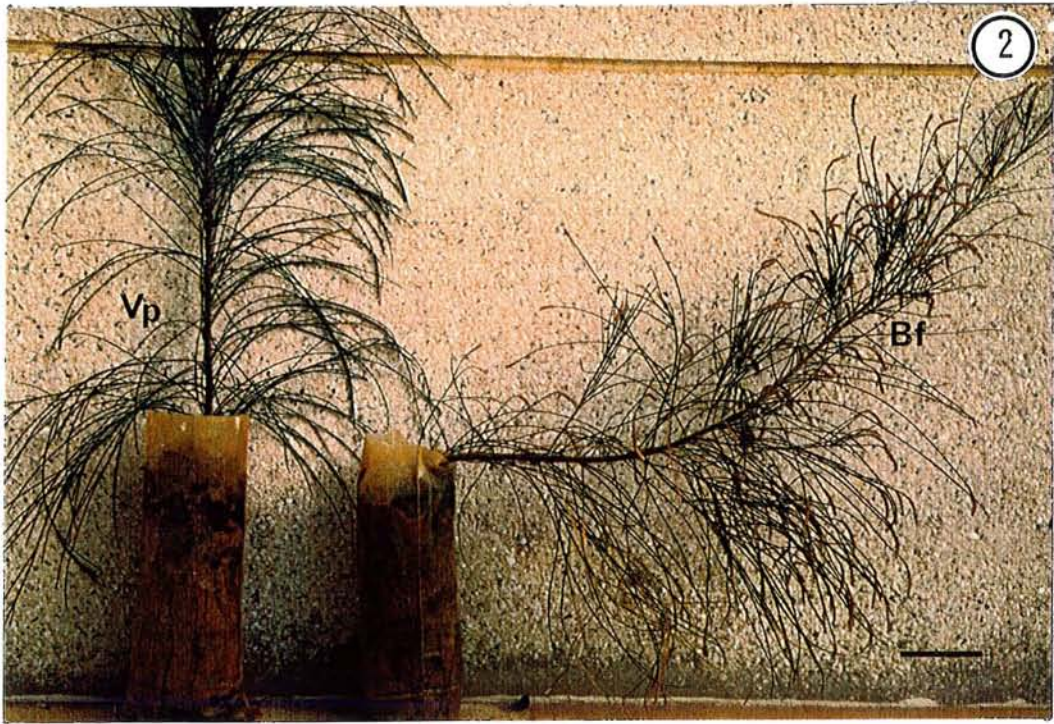


PLANCHE 2

Fig. 1 Explants matures de *Casuarina equisetifolia* sous forme de fragments de rameaux photosynthétiques insérés dans une plaque de culture expansé et enracinés 4 semaines après la mise en culture suivant le dispositif du bouturage flottant (Barre = 1 cm).

Fig. 2 Au bout de quatre mois en pépinière, on constate l'aptitude au développement orthotrope du vitroplants (Vp) et la tendance à la plagiotropie et d'aspect mature des boutures matures enracinées suivant le dispositif du bouturage flottant (Bf) (Barre = 10 cm).

PLANCHE 2



Propagation of *Casuarina equisetifolia* through axillary buds of immature female inflorescences cultured in vitro

E. Duhoux¹, B. Sougoufara², and Y. Dommergues³

¹ Département de Biologie Végétale, Faculté des Sciences, Dakar, Sénégal

² Laboratoire de Microbiologie des sols, ORSTOM, Dakar, Sénégal

³ BSSFT (CTFT/ORSTOM/CNRS), 45bis Avenue de la Belle Gabrielle, F-94736 Nogent-sur-Marne Cedex, France

Received January 3, 1986 / Revised version received March 17, 1986 – Communicated by A. M. Boudet

Abstract

The study of the actinorhizal symbiosis in *Casuarina equisetifolia* requires an homogenous plant material. Consequently, we devised a method of micropropagation based on the use of immature female inflorescences (IFI) as explants. IFI excised from an adult tree formed multiple buds after 4-week incubation on Murashige and Skoog medium with 0.05 $\mu\text{mol l}^{-1}$ NAA and 11.1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ BAP. The axillary buds evolved into 5–6 cm long shoots 5 weeks after the transfer of IFI on a similar medium except for the addition of activated charcoal. Rooting of the shoots was obtained on a third medium, without BAP or charcoal, but with 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ NAA. The plantlets were transferred into soil. Their growth was satisfactory and no plagiotropic tendency was observed.

Abbreviations

BAP : 6-benzylaminopurine ; 2,4-D : 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; IAA : 3-indoleacetic acid ; IFI : immature female inflorescences ; NAA : α -naphthaleneacetic acid.

Introduction

Casuarina equisetifolia is widely used in tropical and subtropical countries for dune stabilization, establishment of shelterbelts and production of fuel wood (National Academy of Sciences 1984; Midgley et al 1983). The ability of *C. equisetifolia* to grow on nitrogen-poor soils is due to its association with *Frankia*, the symbiotic N_2 -fixing actinomycete forming nodules on its roots. We have already shown that the N_2 -fixing potential of *C. equisetifolia* exhibited large variations (Gauthier et al 1985). Such a variability is undesirable when one needs an homogenous plant material for experimental purposes, such as comparing the effectivity of *Frankia* strains; the solution is then to obtain copies of a given individual, using proper methods of vegetative propagation. On the other hand, one can attempt to exploit the large variability of *C. equisetifolia* populations by selecting fast-growing and actively N_2 -fixing specimens and multiplying them using also proper methods of vegetative propagation. Conventional vegetative propagation using cuttings has been used for several years (Somasundaran and Jagadees, 1977; Hussain and Ponnuswamy, 1980). Recently El-Lakany and Shepherd (1984) successfully used stump propagation; Lundquist and Torrey (1984) obtained satisfactory results with mature softwood stem cut-

tings. Our experiments (not reported here) also indicated that cuttings of *C. equisetifolia* were able to form roots, but we found that cuttings from mature trees often showed varying degrees of plagiotropic growth. Taking into account the concept that "most trees have zones that retain a degree of juvenility longer than other areas of the tree" (Bonga and Duran 1982), we used immature female inflorescences as explants, hypothesizing that these organs had retained, at least partially, this juvenility character. To date, no other type of explant has been tested.

Material and Methods

Explants were collected on the same tree, 10–15 year-old *Casuarina equisetifolia*, growing at ORSTOM research station Bel Air, Dakar, Senegal. The explants consisted of immature female inflorescences (IFI) at the stage preceding flowering by at least 3 weeks (Fig. 1). An IFI comprises two parts : an ovoid head 1 mm of diameter bearing whorls of bracts with a cymule in the axil of each bract (Flores and Moseley 1982) and a basal cylindrical peduncle bearing whorls of bracts with a vegetative meristem on the axil of each bract.

In the climatic conditions prevailing in the neighborhood of Dakar, flowering of *C. equisetifolia* occurs in February, which should restrict the period when IFI can be sampled to a few weeks in February. However, we found that the flowering stage of *C. equisetifolia* could be extended up to 6–8 months by watering the trees, thus permitting the collection of IFI throughout a long period of the year. However, the development of axillary buds was delayed when IFI were sampled later than February.

To facilitate the transportation of IFI to the lab, segments of branchlets bearing IFI were severed from the trees and the IFI were excised in the lab just before being washed in running tap water and immersed in 0.01 % (V/V) SDS (dodecyl sodium sulfate, SIGMA L 5750) for 30 min. Following surface sterilization in 0.1 % HgCl₂ for 1 min, IFI were rinsed thoroughly in sterile distilled water.

To eliminate the tissues that could have been injured during the sterilization procedure, the lower extremity (1–2 mm for each IFI) was cut off. IFI were then placed vertically onto the nutrient medium, their base being driven into it 2–3 mm deep.

Three culture media were sequentially used.

A medium for caulogenesis : Murashige and Skoog (1962) basal medium with vitamins (Nitsch and Nitsch

1965) 30 g l⁻¹ sucrose, 0.05 $\mu\text{mol l}^{-1}$ NAA, different amounts of BAP ranging from 0 to 13.2 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (Table 1) and 8 mg l⁻¹ Difco Bacto agar.

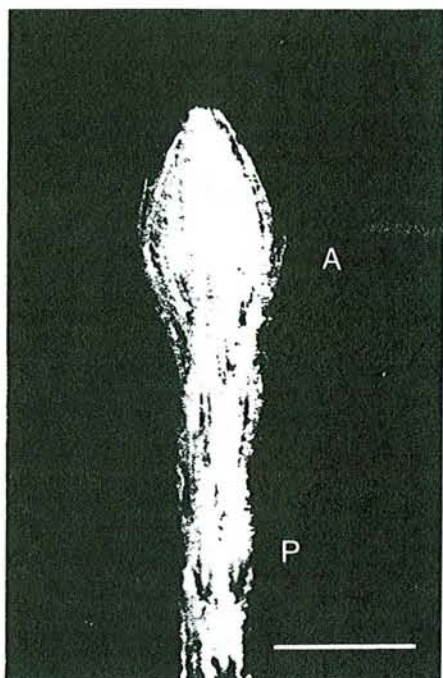


Fig. 1 Immature female inflorescence (IFI) of *Casuarina equisetifolia* used as explant. A, ovoid apex with floret meristems; P, penduncle (Bar = 1 mm).

B medium for shoot elongation : same as A medium but with 20 g l⁻¹ activated charcoal (Merck 2186).

C medium for rhizogenesis : same as A medium but without BAP or activated charcoal; we compared the following concentrations of NAA : 0.05, 0.15, 0.25, 0.5, 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (Table 2).

All three media were adjusted to pH 5.5 before autoclaving at 110°C for 30 min.

Following sterilization IFI were aseptically placed in 10 cm petri dishes (10 IFI per dish) containing 20 ml of A medium. After 4 weeks IFI were transferred into 23 x 15 mm tubes (one IFI per tube) containing 25 ml of B medium.

Nine weeks later the elongated shoots originating from the axillary buds formed in A medium and developed in B medium were excised thus giving microcuttings. The microcuttings were placed vertically in 23 x 15 mm tubes (one per tube) containing 15 ml of C medium.

All types of cultures were incubated in a growth chamber at 28±1°C with a 17 h photoperiod (4,000 lux).

Results

When placed in A medium, IFI exhibited the following transformations. After 2 weeks the ovoid head formed a vegetative axis while the basal cylindrical peduncle swelled. Later, i.e. after 4 weeks, 5-6 vegetative buds appeared at the base of the IFI (Fig. 2).



Fig 2. Numerous axillary buds formed at the base of the IFI after 4 weeks on A medium (Bar = 1 mm).

Table 1 shows that addition of a cytokinin (BAP) to the medium containing an auxin (NAA, 0.05 $\mu\text{mol l}^{-1}$) markedly affected bud initiation. The most favorable medium contained 11.1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ BAP and 0.05 $\mu\text{mol l}^{-1}$ NAA. In the experiment reported in Table 1 we found that all the IFI reacted, that is, gave buds, the mean number of buds being always in the range of 5-6 per IFI, in the medium with 11.1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ BAP.

B - Shoot elongation

Five weeks after being transferred onto B medium axillary buds evolved into green, vigorous-looking 5-6 cm long shoots (Fig. 3). However in the absence of activated charcoal no bud development nor shoot elongation were observed.

C - Root formation

After being excised, shoots obtained in B medium with 11.1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ BAP, were used as microcuttings and placed onto C medium (Table 2).

With 0.5 to 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ NAA, a few thick, pink, adventitious roots were formed (Fig. 4). We never observed any callus proliferation at the base of the microcuttings.

D - Transplanting and acclimating

Rooted microcuttings grown in C medium were removed from the test tubes after 4 weeks and transplanted from the agar medium into soil in pots placed in a greenhouse under warm and highly humid conditions. The autotrophic development of the plantlets was satisfactory, and no plagiotropic tendency was observed.

Table 1 Effect of BAP concentration on the mean number of buds originating from each IFI of *Casuarina equisetifolia* cultivated on A medium (0.05 $\mu\text{mol l}^{-1}$ NAA in all media)

Concentration of BAP ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Number of replicates	Number of reacting IFI	Mean no of buds per IFI
0	47	47	2.59 ± 0.29
4.4	49	49	1.53 ± 0.17
8.8	47	47	3.76 ± 0.35
11.1	47	47	5.78 ± 0.68
13.2	46	46	4.22 ± 0.34

Mean values $\pm$ SE in last column differ significantly, $P = 0.05$ (test of Newman and Keuls in Snedecor and Cochran, 1971).



Fig. 3 Elongated shoots originating from axillary buds 5 weeks after transfer to B medium (Bar = 1 mm).

Table 2 Effect of NAA concentration on rooting of microcuttings 3-4 weeks after placement onto C medium (no BAP added).

Concentration of NAA ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Number of replicates	Number of rooted microcuttings	Mean no of roots per microcuttings
0.05	40	0	0
0.15	50	0	0
0.25	47	0	0
0.5	43	14	2
1.0	83	21	2



Fig. 4 Root formation on a microcutting 2 weeks after placement onto C medium (Bar = 1 mm)

Discussion and Conclusion

The ability to vegetatively propagate trees is associated with juvenility (Franclet 1979 ; Franclet et al 1980). Since it is recognized that some parts of the trees may be mature or senescent while other portions still display juvenile characteristics (Bonga and Durzan 1982), it can be hypothesized that explants with this desirable characteristic should be more easily propagated. Assuming that IFI of *C. equisetifolia* exhibit this property, we initiated the investigations whose results are reported here. The success of our experiments indicate that IFI of *C. equisetifolia* (and probably also of other Casuarinaceae) constitute satisfactory explants when dealing with mature trees. Interestingly enough it has been shown that the period of time during which mature trees bear IFI could be dramatically extended, just by irrigating the plants.

In the case of herbaceous plants, it is known that floral meristems grown *in vitro* can revert back to vegetative meristems; such a reversion has been reported in *Nicotiana tabacum* and *N. glutinosa* (Martin et al 1967), *Beta vulgaris* and *Brassica oleracea* (Margara 1982), *Allium porum* (Doré and Schweisguth 1980). The vegetative shoots originating from IFI of *C. equisetifolia* are not a result of such a process, since vegetative buds already exist at a latent stage at the sterile base of the IFI, the development of these buds into shoots being induced by the nutrient medium where IFI are placed. With *C. equisetifolia*, only low amounts of auxins are required to initiate the development of vegetative meristems, whereas much larger additions of IAA (45 $\mu\text{mol l}^{-1}$) or the use of a strong auxin (2,4-D) are required to get the reversion of floral meristems of herbaceous plants.

Elongation of newly formed shoots occurred only when activated charcoal was added to the nutrient

medium. The beneficial effect of such an addition is not yet clear and several hypotheses to explain it have been proposed (Mission *et al* 1983; Bonga and Durzan 1982).

The method of micropropagation of *C. equisetifolia* based on the use of explants consisting of IFI that is presented here is easy to handle and could probably be adopted on a large scale when the rooting of the shoots is improved. Investigations are under way to improve the shoot branching and the development of the root system of the microcuttings, to find out the most appropriate stage for excising IFI from the trees and to check the nodulating ability of the plantlets when transplanted to pots.

So far, the type of explant used here for micropropagation of *Casuarina equisetifolia* has never been experimented except by Bonga (1984). However, if this author obtained the formation of adventitious shoots in cultures of sections of immature cones of *Larix decidua*, he did not observe rooting in any of the shoots.

Acknowledgement

The work reported here was supported in part by the International Development Research Center (IDRC) and in part by CEE research grant 1 SD-081 F.

References

- Bonga JM (1984) *Physiol Plant* 62 : 416-421
- Bonga JM, Durzan DJ (eds) (1982) *Tissue culture in forestry*, Nijhoff/Junk, The Hague, 420 p
- Doré C, Schweisguth B (1980) Réunion Eucarpia, Versailles : 54-57
- El-Lakany MH, Shepherd KR (1984) *Aust Res* 14 : 243-247
- Flores EM, Moseley MFRD (1982) *Amer J Bot* 69, 10 : 1673-1684
- Franclet A (1979) Afocel (Domaine de l'Etançon, Nangis) 12 : 3-18
- Franclet A, David A, David H, Boulay M (1980) *CR Acad Sci Paris* 290 : 927-930
- Gauthier D, Diem HG, Dommergues YR and Ganry F (1985) *Soil Biol Biochem* 17 : 375-379
- Hussain AMM, Ponnuswamy PK (1980) *Indian Forest* 106 : 298-299
- Lundquist R, Torrey JG (1984) *Bot Gaz* 145 : 378-384
- Margara J (1982) Bases de la multiplication végétative : les méristèmes et l'organogenèse, INRA Paris, 262 p
- Martin C, Dulieu H, Carré M (1967) *CR Acad Sci Paris* 264 : 1994-1996
- Midgley SJ, Turnbull JW and Johnston RD eds (1983) *Casuarina Ecology, Management and Utilization* CSIRO, Melbourne, 286 p
- Mission JP, Boxus PH, Coumans M, Giot-Wirgot P, Gaspar TH (1983) *Med Fac Landbouwn Rijksuniv Gent* 48/4 : 1151-1157
- Murashige T, Skoog F (1962) *Physiol Plantarum* 15 : 473-497
- National Academy of Sciences (1984) *Casuarina : Nitrogen-fixing trees for adverse sites*, National Acad Sci, Washington, 118 p
- Nitsch JP, Nitsch C (1965) *Ann Physiol Veg* 7 : 251-256
- Somasundaran TR, Jagadees SS (1977) *Indian Forest* 103 : 737-738
- Snedecor GW, Cochran WG (1971) *Méthodes statistiques* (6^e ed) Acta Paris, 651 p

SECOND INTERNATIONAL CASUARINA WORKSHOP

Jan. 15-20, 1990

Cairo, Egypt

IMPROVING CASUARINACEAE SPECIES USING *IN VITRO* METHODS

E. DUHOUX *, C. LEROUX **, M. PHELEP ** and B. SOUGOUFARA***.

(*) University of Paris VII & BSSFT (ORSTOM/ CTFT - CIRAD)

45 bis, avenue de la Belle Gabrielle, 94 736 Nogent-sur-Marne, France

(**) BSSFT (ORSTOM/ CTFT - CIRAD) 45 bis, avenue de la Belle Gabrielle,
94 736 Nogent-sur-Marne, France

(***) Ministère de la Protection de la Nature/ORSTOM BP 1386, Dakar,
Sénégal.

SUMMARY

Two main approaches were investigated to improve some species of Casuarinaceae : *Casuarina equisetifolia*, *Casuarina glauca*, *Casuarina obesa* and *Allocasuarina verticillata* . The objective being not only to increase the amount of N₂ fixed by the host plant in association with its symbiotic microorganism, but also to improve the tolerance of the whole N₂-fixing system to environmental stresses.

The first approach is based on the exploitation of the natural genetic variability. The selected phenotypes are vegetatively propagated. Explants as diverse as young shoots, young roots, and immature female inflorescences were successfully used for **micropropagation**. Appropriate nutritional conditions were developed to give efficient shoots and to obtain true-to-type copies. A high clonal multiplication coefficient was obtained with *A. verticillata* when cultivated in Murashige and Skoog medium supplemented with maltose.

The second approach is based on the artificial increase of genetic variability. Three techniques were investigated

- 1) **somaclonal variation** : regeneration of *A. verticillata*, *C. glauca* and *C. obesa* were obtained through callogenesis. Genetic characteristics of the new plants are currently under studied.
- 2) **protoplast technology** : protoplasts of *A. verticillata* were obtained which could be used for somatic hybridizations.
- 3) **genetic transformation** : transgenic plants of *A. verticillata* were produced using wild strains (A 4 and 2659) of *Agrobacterium rhizogenes*.

All vitroplants were transferred with success from aseptic to autotrophic conditions in greenhouse.

These preliminary results show that *in vitro* methods are promising tools to improve not only Casuarinaceae but also other N₂-fixing trees.

Casuarinaceae are important tree species because of their good potential for afforestation in subtropical and tropical areas (Turnbull, this book) as evidenced by several recent research programs on their introduction (El-Lakany 1983a, 1983b). Up to now Casuarinaceae have been mainly propagated by seed. Tree improvement work started with provenance trials using seed from wild or improved populations and developed into cycles of selection and breeding. Vegetative propagation through cuttings was tested in the 1970s (Somasundaran and Jagadees, 1977 ; Hussain and Ponnuswamy 1980, Torrey, 1983). Recently El-Lakany and Shepherd (1984) successfully used stump propagation; Lundquist and Torrey (1984) obtained satisfactory results with mature softwood stem cuttings.

Because of difficulties in vegetatively propagating in forest tree species and because of the long time required by the breeding cycles, considerable attention has been given to *in vitro* techniques such as micropropagation, somaclonal variation, protoplast technology and genetic transformation (Bonga and Durzan, 1987 ; Ahuja, 1988a). Recently some uncoordinated brief accounts of *in vitro* culture of Casuarinaceae species have been published (Aboel-Nil, 1987 ; Duhoux et al. 1986, Cao et al. 1989).

This paper discusses the use of *in vitro* methods for genetic improvement of Casuarinaceae sp.

1 - Plant selection and micropropagation.

The first approach to plant improvement was based on optimal use of natural genetic variability. Desirable phenotypes were identified and subsequently micropropagated.

1.1 Selection

Selection followed by micropropagation can lead to impressive yield increases of up to 60 m³ per ha per year in the most recent stands on the best sites. However, yield is not the only criterion that deserves attention in forest trees improvement programs (Morandini, 1989). Since soil fertility conservation and regeneration are essential in agroforestry systems, due account must be given to both the atmospheric N₂-fixing potential of trees and also N assimilation from the soil. Sougoufara et al. (1989) tested

isotope methods to compare three clones (α , β et S) of *Casuarina equisetifolia*, uninoculated or inoculated with *Frankia* strain ORS O21001 by measuring the N₂-fixing potential and the ability to utilize soil N. Inoculated clones were the most productive; inoculating clone S did twice as well as uninoculated clone S, fixed more atmospheric N₂ and assimilated more soil N. The most productive clone clone β) was the one which exhibited than the uninoculated clones both the highest N₂-fixing potential and the highest ability to absorb soil N. The potential of N₂-fixing was not correlated with the ability to utilize soil N. In conclusion, to exploit spontaneous variation requires sound data not only on the N₂-fixing potential but also on the trees ability to absorb soil N.

1 2 Micropropagation

Selection requires the use of reliable true-to-type propagation methods. Some *in vitro* methods can maintain the sources of germplasm and rapidly proliferate the material selected to sufficient levels for adequate exploitation in the various traditional forestry improvement work. The following two methods can be used to micropropagate certain *Casuarina* sp.: micropropagation by inducing the proliferation of axillary buds from shoots, and adventitious buds in roots segments of juvenile seedlings, and micropropagation based on immature female inflorescence (IFI). The first method can be used on hybrid seed and the second on mature *Casuarina equisetifolia* trees.

1 2 1 Explants

Seedling explants. Seeds of *C. equisetifolia*, *Allocasuarina verticillata* were surface disinfected with 5% calcium hypochlorite (200-220°) for 20 min. and then rinsed three times with sterile water. Seeds were germinated in aseptic conditions on gelified agar. One month after germination, epicotyls and roots from plantlets were used as explants.

IFI from mature trees. The explants consisted of IFI (Fig. 1). When collected it was at 3 weeks from flowering. An IFI comprises two parts: an ovoid head 1 mm in diameter bearing whorls of bracts with a cymule in the axil of each bract (Flores and Moseley 1982) and a basal cylindrical peduncle bearing whorls of bracts with a vegetative meristem on the axil of each bract.

1 2 2 Establishment of cultures

The basal Murashige and Skoog (1962) mineral solution (MS) was used . Three culture media supplemented with various organic compounds were sequentially tested.

A medium for caulogenesis : Caulogenesis in IFIs was obtained with MS supplemented with vitamins (Nitsch and Nitsch 1965), an auxin $0.05 \mu\text{mol l}^{-1}$ NAA (α -naphthaleneacetic acid) different amounts of a cytokinin BAP (6-benzylaminopurine) ranging from 0 to $13.2 \mu\text{mol l}^{-1}$. For explants from seedlings, caulogenesis was obtained by adding IAA ($0.57 \mu\text{mol l}^{-1}$) instead of NAA.

With IFI used as explants, sucrose 30 g l^{-1} and four types of gelifiant agar were used : 8 g l^{-1} of Agarose 1 (Indubiose, A 37 HAA, IBF Biotechnics) Agarose 2 (N° A- 6877, Type II, Sigma), Difco Bitek Agar and Difco Agar Noble.

With roots and shoots explants, maltose 3 or 6% was introduced instead of sucrose . The medium was solidified by 8 g l^{-1} Difco Bacto Agar for shoots as explants and with Gelrite (3.5 g l^{-1}) for excised roots.

B medium for shoot elongation : for elongation of shoots from IFIs medium A was supplemented with 20 g l^{-1} activated charcoal (Merck 2186).

C medium for rhizogenesis : this medium was the same as A medium without BAP or activated charcoal and supplemented with NAA or IBA (indolbutyric acid) at 0.5 and $1.0 \mu\text{mol l}^{-1}$.

All these media were adjusted to pH 5.5 before autoclaving at 110°C for 30 min. All the culture types were incubated in a growth chamber at $28 \pm 1^\circ\text{C}$ with a 16 h photoperiod ($50 \mu\text{E. m}^{-2} \text{ s}^{-2}$).

1 2 3 Results

1 2 3 1 Shoot regeneration and multiplication

i - Immature female inflorescences (IFI)

Neoformed buds appeared on IFI cultured *in vitro* after 5 weeks of culture on a nutrient medium (Fig. 2). The number of neoformed buds from the IFI depended upon the nature of the gelifiant agent (agaroses, Bitek agar, Agar Noble) . Agaroses 1 and 2 were substrates that increased the number of buds by 12 after 5 weeks, and by up to 31 after 11 weeks of culture. Furthermore the origin of the neoformed buds differed and depended on

the nature of gelifiant agent (Table 1).Whereas vegetative meristems of the basal IFI peduncle always evolved into new shoots (IFI type1) other meristems, namely florets (IFI type 2) and apical meristems (IFI type3) gave vegetative buds only when a gelifiant agent, such as agaroses, was added to the medium.

ii - seedlings explants .

After 5 weeks of culture, shoot clusters (up to 30 neoformed shoots) were induced (Fig. 3) from a young shoot explant composed of a 2-3 cm long green branch. An explant of *A. verticillata* was introduced in A medium supplemented with BAP ($0.22 \mu\text{mol l}^{-1}$) and indole-3-acetic acid (IAA, $0.57 \mu\text{mol l}^{-1}$). The unusual high multiplication coefficient could be traced to the original structure of Casuarinaceae. The nodes of the green branch were made of several scale-like leaves found in whorls at one node. In culture, when the explants were placed in the culture medium, the axillary buds under the leaves at one node grew first and then developed in numerous branchlets. Each new branchlet developed other buds at the level of other whorls. Adding of maltose instead of sucrose to the medium resulted in a higher rate of shoot multiplication, improved biomass and chlorophyll content and reduced caulogenesis (Cao et al., 1989).

Roots from seedlings of *A. verticillata* were excised and cultivated on A medium supplemented with NAA ($1 \mu\text{mol l}^{-1}$) and BAP ($0.4 \mu\text{mol l}^{-1}$). After 6 weeks of culture 85 % of the explants had developed adventitious buds. After two or three subcultures the clusters of shoots had grown up to 30 neoformed shoots.

1 2 3 2 Rhizogenesis

After being excised, shoots obtained either from juvenile or mature explants were used as microcuttings and placed on C medium. Roots were formed without callus on media containing NAA or IBA. In *C. equisetifolia* and *A. verticillata* 100% rooting was obtained within 2 weeks of culture. Established plantlets were transferred to the greenhouse.

2 - Genetic transformation

A second method to improve plants is through genetic engineering.

A genetic transformation and regeneration system has been developed for *Allocasuarina verticillata* (Phelep et al.,). The use of *Agrobacterium tumefaciens* or *rhizogenes*, as vectors for plant transformation has been well described and is increasingly successful (Gheysen et al., 1985, Klee et al., 1987, Weising et al., 1988). *Agrobacterium rhizogenes* is a plant pathogenic bacterium responsible of the "hairy root" disease. Plant infection by the wild type of *A. rhizogenes* results in the production of rapidly growing roots at the inoculation site. The roots produced are genetically transformed. A portion of DNA, the T-DNA, localized on a large bacterial plasmid called Ri (for root inducing) is transferred to the plant genome (Chilton et al., 1982, White et al., 1982). Integration and expression of the T-DNA results in root production and opine synthesis in the transformed cells (Tepfer and Tempé, 1981 ; Petit et al., 1983).

2 1 Obtention of transformed roots

One month after germination, removed aseptically plantlets were inoculated with *A. rhizogenes* by wounding different organs: epicotyl, hypocotyl and cotyledons, with instruments dipped in an *A. rhizogenes* culture. Hairy roots production was obtained by inoculating *A. verticillata* with two strains of *A. rhizogenes*. 2659 and A4. (Phelep et al.,). The transgenic nature of the roots was confirmed by the presence of specific opine or by Southern blot analysis.

2 2 Regeneration of transgenic plants

Roots initiated at the inoculation site were excised and then cultivated on a half strength Murashige and Skoog mineral solution (1962) supplemented with Nitsch and Nitsch vitamins (1965) and sucrose (20 g l^{-1}) and solidified with Gelrite (3.5 g l^{-1}). Carbenicillin, an antibiotic against *A. rhizogenes*, was added to the medium all throughout the first two or three subcultures.

Shoot regeneration from A4 transformed roots was obtained by adding NAA (0.25 mg l^{-1}) and BAP (0.1 mg l^{-1}) to the medium. Buds developed in 2 months on some of the transformed roots. Shoot regeneration from *A. rhizogenes* strain 2659 transformed roots was spontaneous on hormone free medium. Multiplication and rooting of neoformed shoots were obtained using the procedure described for micropropagation.

The transgenic regenerants (transformed with A4 or 2659) had root systems that were more developed, plagiotropic and branched than the

normal (non transformed) regenerants (Fig 4). Furthermore the growth rate of regenerant T1 A4 transformed with strain A4 after 2 months of culture in rooting medium was higher than that of the normal regenerant. The root dry weight of the transgenic regenerant was 5 times higher than that of the normal regenerant. The aerial dry weight of the transgenic regenerant was two times higher than that the normal regenerant and T1 A4 aerial system showed reduced apical dominance with highly branched shoots (Phelep et al.,).

3 - Strategies for applications of *in vitro* propagation

The development of the *in vitro* propagation provides new tools for the potential improvement of *Casuarinaceae* species.

Cloning

Plants produced through axillary buds culture *in vitro* are uniform in quality and can be produced more rapidly than by conventional methods. Micropropagation of *C. equisetifolia* can produce clones differing in their ability to fix N₂ and to absorb soil N (Sougoufara et al., 1989). The main advantage of micropropagation over conventional propagation techniques is the reduction in the time required for mass propagation. A micropropagation technique could be effectively used on hybrids, especially sterile hybrids such as *C. equisetifolia* x *C. junghuhniana* (Kondas, 1983). Propagation in aseptic conditions ensures optimal healthy condition for the plant material. Rooted material of *in vitro* plants may be shipped with naked roots, i.e. without a gelifiant agent . It is estimated that 40, 000 plants packed in small boxes weigh about 15 kg, and usually survive several days of transportation (Boxus, 1987).

Another advantage of micropropagation techniques is the production of rejuvenated in plant material. Rejuvenation is straightforward when using IFI which is by nature a juvenile explant. The multiplication coefficient can reach 30 after 11 weeks of culture. The efficiency of the method is thanks to fact that floret meristems grown *in vitro* in some cases revert back to being vegetative meristems, which facilitates successful use of IFI in propagating adult trees.

genetic transformation

Foreign genes of agronomic interest have been introduced and expressed in a number of plant species e.g. *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana plumbaginifolia* ,

Lycopersicum esculentum, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* (Ahuja, 1988b). As far as trees as concerned, only one species was improved by gene transfer : herbicide tolerance has been transferred and expressed in transgenic *Populus* plants (Riemenschneider et al., 1988).

Do *Casuarinaceae* have important genes available that could be transferred to the plants? Most of the economically important traits, such as growth, vigor, yield, height are quantitative traits controlled by polygenes. At the present time, N_2 fixation can be improve by clonal selection of both host plant and microsymbiont better than by attempting to introduce foreign gene. Nevertheless there are some traits that might be considered for gene transfer in *Casuarinaceae* sp., e.g. herbicide resistance in *A. verticillata*. The insect toxic gene from *Bacillus thuringiensis* is already being transferred in tobacco and could possibly be introduced in some *Casuarinaceae* to develop resistance to *Lymantria xyliana* . The gene transfer technology could also be apply to develop resistance of *Casuarina* to *Pseudomonas solanacearum* (Dénarié, personal communication).

Conclusions

Since *Casuarinaceae* appear to be an easy plant material to handle *in vitro* two new approaches are worth developing .

The first approach is based on exploiting natural genetic variability. *Casuarinaceae* species was found to be easy to micropropagate and an original method was developed for mature trees. Application of rapid *in vitro* propagation of elite *Casuarina* trees with saline or drought tolerance and a high ability to fix atmospheric N_2 , would have a tremendous impact on the afforestation of arid and semi-arid zones and would significantly improve forest productivity.

The second approach is based on the artificial increase of genetic variability: somaclonal variation, protoplast technology, and genetic transformation. This paper only discussed the latter. Among the tree species, transgenic plants have been produced in *Populus* (Fillati et al., 1987), in *Juglans* (Mc Granahan et al., 1988) and in apple trees (James et al., 1988). Thus, with *Casuarina* there are now four successfully regenerated transgenic trees, but *Casuarina* is the only one that also fixes N. However up to now foreign gene transfer has only been applied to the populus tree.

With regard to gene transfer, much remains to be done to identify and isolate genes that can be used to improve plant quality. This exciting area will surely lead to application work in the near future, and *Casuarinaceae* seem to be the best candidate.

REFERENCES

- Aboel-Nil M.M. 1987. - Micropropagation of *Casuarina*. In : Bonga J.M. and Durzan D.J. (eds.) *Cell and Tissue Culture in Forestry*. vol. 3. *Case Histories : Gymnosperms, Angiosperms and Palms*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, p. 400 - 410.
- Ahuja M.R. eds.1988a. - Somatic cell genetic of woody plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Ahuja M.R. 1988b.- Gene transfer in woody plants : perspectives and limitations. In: Ahuja M.R. (ed.) - *Somatic cell genetis of woody plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 83 - 101.
- Bonga J.M. and Durzan D.J. eds. - 1987. - Cell and tissue culture in forestry. vol. 3. *Case Histories : Gymnosperms, Angiosperms and Palms*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- Boxus P. 1987.- *In vitro* vegetative propagation of plants. Nestlé Research News, 73-79.
- Cao Y.H., Phelep M., and Duhoux E. 1989.- Effects of some organic compounds (maltose, sucrose, vitamins) on the shoot biomass of *Allocasuarina stricta* (Casuarinaceae) grown *in vitro*. Bull. Soc. Bot. Fr., (In press).
- Chilton M. D., Tepfer D. A., Petit A., David C., Casse-Delbart F., and Tempé J. 1982. -*Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. Nature 295,432-434.
- Duhoux E., Sougoufara B., and Dommergues Y. 1986. - Propagation of *Casuarina equisetifolia* through axillary buds of immature female inflorescences cultured *in vitro*. Plant Cell Reports 3 , 161 - 164.
- El-Lakany M.H. 1983a.- A review of breeding drought resistant *Casuarina* for shelterbelt establishment in arid regions with special reference to Egypt. For Ecol Manage 6, 129-137.
- El-Lakany M.H. 1983b.- Breeding and improving *Casuarina* ; a promising multipurpose tree for arid regions of Egypt. In Midgley S.J., Turnbull

J.W. , and Johnson R.D. (eds.) *Casuarina Ecology, Management and Utilization*. CSIRO, Melbourne, p. 58-65.

El-Lakany M.H. and Shepherd K.R.1984. - Preliminary observations on stump propagation in *Casuarina cunninghamiana* and *C. glauca* . Aust. For. Rehabilitation., 14, 243 - 247.

Fillatti J. J., Sellmer J., McCown B., Haissig B., and Comai L. 1987.- *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of populus. Mol. Gen. Genet. 206, 192- 199.

Flores E. M. and Moseley M.F. Jc. 1982.- The anatomy of the pistillate inflorescence and flower of *Casuarina verticillata* Lamarck (Casuarinaceae). Amer. J. Bot. , 1673 -1684.

Gheysen, G., Dhaese, P., Van Montagu, M., and Schell, J. 1985. DNA flux across genetic barriers : the crown gall phenomenon. *In* : Genetic Flux in Plants. Hohn, B., Dennis, E. S. (eds.). Springer Verlag, Vienna New York. p.11-47.

Hussain A.M.M., and Ponnuswamy P.K. 1980. - Propagation of *Casuarina junghuhniana* by planting shoots and root sucker. Indian Forest, 106 ; 298 - 299.

James D.J., Passey A.J., Predieri S. and Rugini E. 1988.- Regeneration and transformation of apple plants using wild-type and engineered plasmids in *Agrobacterium* spp. *In* : Ahuja M.R. eds1988a. - Somatic cell genetic of woody plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 65-69.

Klee, H., Horsch, R., and Rogers, S. 1987. - *Agrobacterium* mediated plant transformation and its further applications to plant biology. Ann. Rev. Plant. Physiol. 38,486-497.

Kondas S. 1983.- Mist tent vegetative propagation of *Casuarina junghuniana*. *In* : Midgley S.J., Turnbull J.W. , and Johnston R.D. (eds.) *Casuarina Ecology, Management and Utilization*. CSIRO, Melbourne, p. 135 - 138.

Lundquist R., and Torrey J.G. 1984.- The propagation of *Casuarina* species from rooted stem cuttings. Bot Gaz 145, 378 - 384.

McGranahan G.H., Leslie C.A., Uratsu S.L., Martin L.A. and Dandekar A.M. 1988.- *Agrobacterium*-mediated transformation of walnut somatic

embryos and regeneration of transgenic plants. *Biotechnology*, 6, 800-804.

- Morandini R. 1989.- The importance of forest tree breeding and improvement in agroforestry. *In* Proceedings of an IFS-ICRAF-IUFRO seminar on Trees for development in sub-Saharan Africa, February 20-25, Nairobi, Kenya, IFS (International Foundation for Science), Stockholm, p. 278-280.
- Murashige T. , and Skoog F.1962.- A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiol Plant* 15, 473-499.
- Nitsch J. P. and Nitsch C. 1965.- Néof ormation de fleurs *in vitro* chez une espèce de jours courts : *Plumbago indica* L. *Ann. Physiol. vég.* 7, 251-256.
- Petit, A., David, C., Dahl, G. A., Ellis, J. G., Guyon, P., Casse-Delbart, F., and Tempé, J. 1983. Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol. Gen. Genet.* 190,204-214.
- Phelep M., Petit A., Martin L., Duhoux E., and TempéJ. -Transformation and regeneration of a nitrogen-fixing tree, *Allocasuarina verticillata* Lam. *Biotechnology* (submitted).
- Riemenschneider D. E., Haissig B. E. , Sellmer J. and Fillatti J.J. 1988.- Expression of an herbicide tolerance gene in young plants of a transgenic hybrid poplar clone. *In* : Ahuja MR (eds) *Somatic cell genetis of woody plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 73 - 81.
- Somasundaran T.R., Jagadees S.S. 1977.- Propagation of *Casuarina equisetifolia*. *Indian Forest*, 103 , 737-738.
- Sougoufara B., Duhoux E. and Dommergues Y.R. 1989. Choix des critères de sélection chez un arbre fixateur de N₂ : *Casuarina equisetifolia* . *Oecologia Plantarum*, 10, 215-224.
- Tepfer A. et Tempé J. 1981.- Production d'agropine par des racines formées sous l'action d'*Agrobacterium rhizogenes*, souche A4. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 292, 153-156.

- Torrey J.G. 1983.- Root development and root nodulation in Casuarina. In : Midgley S.J., Turnbull J.W. , and Johnston R.D. (eds.) *Casuarina Ecology, Management and Utilization*. CSIRO, Melbourne, p. 180 - 193.
- Turnbull J. W. 1990.-Taxomy and genetic variation in Casuarinas. Second International Casuarina Workshop, Cairo, Egypt. (this book).
- Weising, K., Schell, J., and Kahl, G. 1988. -Foreign genes in plants : transfer, structure, expression, and applications. *Annu. Rev. Genet.* 22,424-477.
- White, F. F., Ghidossi, G., Gordon, M. P., and Nester, E. W. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79,3193-3197.

Table 1. Effect of the gelifiant agent on the type of IFI obtained.

Gelifiant agent	% of each type of IFI		
	Type 1	Type 2	Type 3
Agarose 1	17.3 c	9.1 cd	73.5 b
Agarose 2	13.8 cd	14.8 cd	70.6 b
Bitek Agar	11.7 cd	3.0 e	84.1 a
Noble Agar	13.1 cd	7.3 cd	79.5 ab

IFI type 1 = development of basal vegetative axillary buds

IFI type 2 = development of basal vegetative axillary buds + floret meristems

IFI type 2 = development of basal vegetative axillary buds + apical meristem

For each treatment 84 IFI were used. All of them reacted positively to the treatment

Percentages of each IFI followed by the same letter are not significantly different according to the Newman & Keuls' test ($P < 0.05$).

Fig.1. Immature female inflorescence (IFI) of *C. equisetifolia* used as explant.

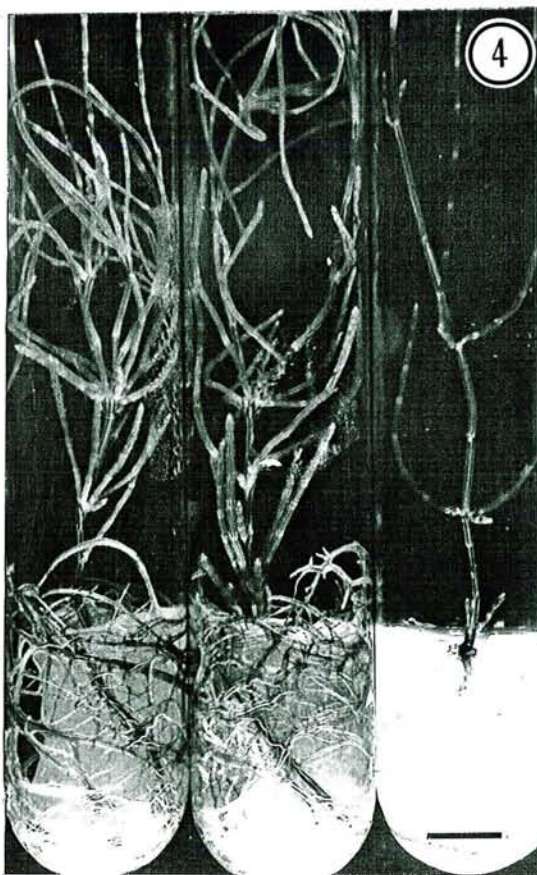
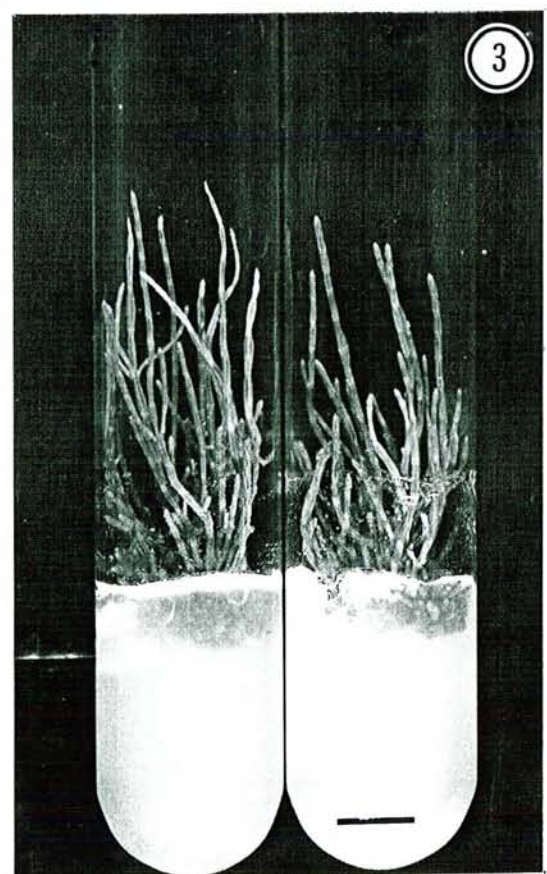
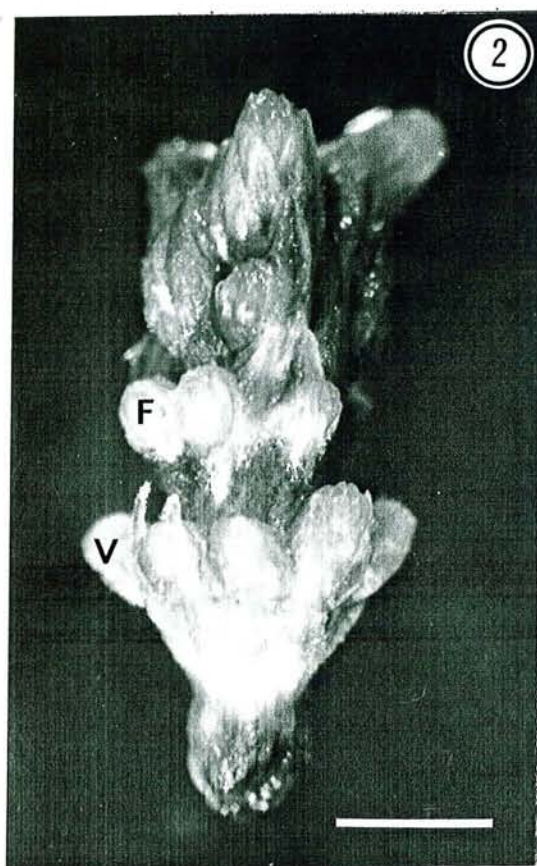
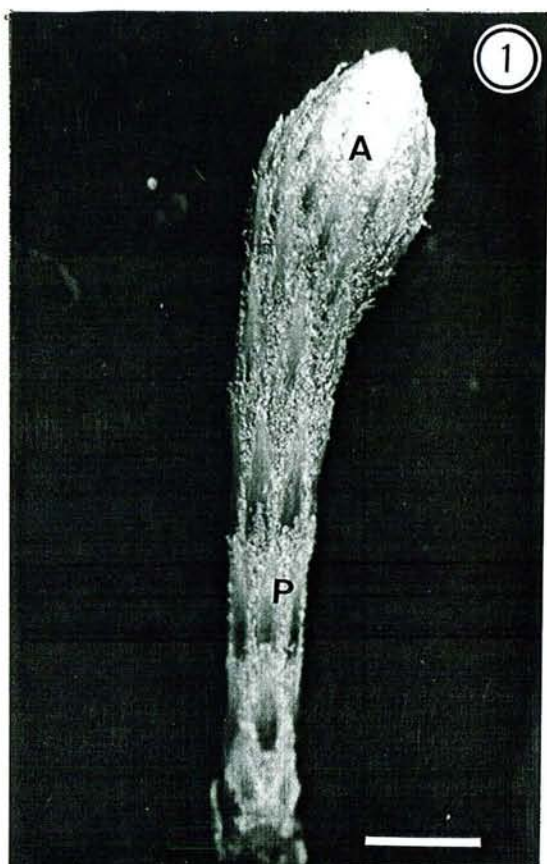
A ; ovoid apex with floret meristem.

P ; peduncle (Bar =1 mm).

Fig. 2. Numerous axillary buds of *C. equisetifolia* formed on the axil of bracts of the IFI. Neoformed buds came from either vegetative meristems (V) or from floret meristems (F). Bar = 1 mm.

Fig. 3. Clusters of neoformed shoots of *A. verticillata* after 6 weeks of culture. The explant was an epicotyl of a seedling. Bar = 1 cm.

Fig.4. Transgenic *A. verticillata* clone T1A4 (right and middle) compared with a normal regenerant (left). Plants had been cultured for 6 weeks. Bar = 1 cm.



D2. Amélioration de la fixation de N_2 par sélection clonale de la plante hôte

Improvement of Nitrogen Fixation by *Casuarina equisetifolia* Through Clonal Selection: A Research Note

B. SOUGOUFARA

Direction des Eaux et Forêts et ORSTOM

E. DUHOUX

Université de Paris 7
 Laboratoire des membranes biologiques

M. CORBASSON
 Y. DOMMERGUES

BSSFT (CTFT/ORSTOM/CNRS).
 45 bis Av. de la Belle Gabrielle
 Nogent-sur-Marne 94736, France

Abstract Two individual seedlings of *Casuarina equisetifolia* exhibiting conspicuous differences in their nodule numbers were identified in a preliminary screening experiment. Then, these individuals were vegetatively propagated as cuttings. One of the clones thus obtained was shown to fix 1.6 times more nitrogen and produce a biomass 2.6 times higher than the other clone, the inoculation having been achieved with the same strain of *Frankia*. To avoid plagiotropism and other defects observed in cuttings, we devised an original method of micropropagation based on the use of immature female inflorescences as explants.

Résumé Au cours d'une expérience préliminaire de criblage de semis de *Casuarina equisetifolia*, on a identifié deux individus présentant des différences évidentes dans leur nodulation. On a ensuite bouturé ces deux individus. On a montré que l'un des clones ainsi obtenus fixait 1.6 fois plus d'azote que l'autre et produisait une biomasse 2.6 fois plus élevée, l'inoculation ayant été effectuée avec la même souche de *Frankia*. Pour éviter une croissance plagiotrope et d'autres déficiences se manifestant chez les boutures, on a mis au point une méthode originale de micropropagation fondée sur l'utilisation d'explants constitués par des inflorescences femelles immatures.

Keywords nitrogen fixation; *Casuarina equisetifolia*; vegetative propagation; clonal selection; soil rehabilitation.

Many *Casuarina* species are known to be adaptable to adverse environments including infertile arid and semiarid sites. Their ability to grow vigorously in N-deficient soils is due to their symbioses with an actinomycete, *Frankia*, that enables them to fix atmospheric N₂. Casuarinas are therefore ideal candidates for rehabilitating marginal lands, especially in the semiarid tropics, provided that their N₂-fixing capacity is ade-

Received September 24, 1986; accepted October 14, 1986

quate. Attempting to enhance this capacity appears to be most desirable. One promising strategy to achieve this goal is to improve the host plant ability to fix N_2 in association with its symbiont. The host's role in the N_2 -fixing symbiosis of crop legumes was recognized many years ago (Caldwell and Vest 1977). However, only a few research groups have recently attempted to exploit this characteristic to improve the N_2 -fixing potential (e.g., Attewell and Bliss 1985; Phillips and Teuber 1985; Gresshoff et al. 1985). In the case of N_2 -fixing woody plants (legumes or actinorhizal plants), this possibility has not yet been explored.

In the course of recent investigations on N_2 fixation by *Casuarina equisetifolia* carried out at the ORSTOM Research Station in Dakar, Senegal (Gauthier et al. 1985), we noted that the seedlings of this species exhibited large variations in their growth rate and nodulation. Consequently, we initiated a screening experiment to identify individuals with various N_2 -fixing potentials. Concomitantly, we devised a method of micropropagation specifically adapted to *Casuarina equisetifolia* in order to ensure successful large-scale multiplication of the clones selected for their high N_2 -fixing potential. In this communication, a comparative study of the N_2 -fixing potential of two clones of *Casuarina equisetifolia* that have been selected and separated, and of our method of micropropagation for *Casuarina equisetifolia* are presented.

From a preliminary screening, we selected two individual seedlings that apparently differed by their nodulating ability. These individuals were vegetatively propagated using 4–5 cm cuttings that exhibited a satisfactory rooting ability. Resulting clones, named α and β , were tested for their nodulation and N_2 fixation ability by growing them in a sterile N-deficient soil. One set of cuttings was inoculated with *Frankia* strain ORS021001 (Diem et al. 1983), and the other set remained uninoculated. From measurements made of 7-month-old cuttings (Table 1), it appeared that clones α and β grew very poorly when they had not been inoculated. By contrast, the growth of inoculated cuttings was satisfactory, but differed markedly with the clone. Clone β produced 2.6 times more biomass (expressed in terms of dry weight and total N) than clone α . Concomitantly, the

Table 1
Comparison of two clones of *Casuarina equisetifolia*¹

Treatment	Shoot			Nodule d.wt. (mg per plant)	ARA ²	
	d.wt. (mg per plant)	N (%)	N total (mg per plant)		per plant	per g nodule
Uninoculated						
Clone α	130 a	0.73 a	0.95 a	0 a	0 a	NA ⁴
Clone β	90 a	1.02 a	0.92 a	0 a	0 a	NA
Inoculated with <i>Frankia</i> ³						
Clone α	660 b	1.71 b	11.29 b	54 b	2.88 b	54 b
Clone β	1730 c	2.02 c	34.93 c	88 c	4.58 c	56 b

¹ 7 month-old cuttings, nine replicates.

² Acetylene reducing activity, expressed as $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ per plant or per g nodule, dry weight (d.wt.).

³ Each cutting was inoculated with 2 mL (20 μg of proteins) of a 4-week-old culture of *Frankia* strain ORS021001. Values in columns followed by the same letter are not significantly different, $P = 0.05$ (nodule dry weight; ARA), $P = 0.01$ (shoot dry weight, total N and N%).

⁴ NA—not applicable.

nodule weight and the N_2 -fixing activity [expressed as acetylene reducing activity (ARA) per plant] of clone β were 1.6 times significantly higher than the same characteristics of clone α . Interestingly, the specific N_2 -fixing activity (that is the activity expressed on the nodule weight basis) of both clones did not differ significantly, which could be expected, since this latter characteristic was probably conditioned by the genotype of the *Frankia* strain used.

This experiment clearly showed that the difference in the N_2 -fixing potential of clones α and β was related to the nodulation ability of the clones. Field trials presently underway seem to confirm the superior N-fixing potential of clone α .

Some species of *Casuarina* have been successfully propagated using cuttings for several years Sumasundaran and Jagadees 1977; Husain and Ponnuswamy 1980; El-Lakany and Shepherd 1984; Lundquist and Torrey 1984). Our experiments confirmed these results, but we found that cuttings from mature *Casuarina equisetifolia* often showed varying degrees of plagiotropic growth. Consequently, we attempted to devise a method giving plantlets without such a defect. Taking into account the concept that "most trees have zones that retain a degree of juvenility longer than other areas of the tree" (Bonga and Durzan 1982), we used immature female inflorescences (IFI) as explants, hoping that these organs had retained, at least partially, this juvenility character.

IFI excised from an adult tree formed multiple buds after 4-week incubation on Murashige and Skoog (1962) medium with $0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$ α -naphthaleneacetic acid and $11.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ 6-benzylaminopurine. The axillary buds evolved into 5 to 6-cm long shoots 5 weeks after the transfer of IFI on a similar medium except for the addition of activated charcoal. Rooting of the shoots was obtained on a third medium, without 6-benzylaminopurine or charcoal, but with $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ α -naphthaleneacetic acid. The plantlets were then transferred into soil. Their growth was satisfactory and no plagiotropic tendency was observed (Duhoux et al. 1986). These results indicate that IFI of *Casuarina equisetifolia* (and probably also of other Casuarinaceae) constitute good explants when dealing with mature trees.

Investigations are under way to improve the shoot branching and the development of the root system of the microcuttings, to find out the most appropriate stage for excising IFI from the trees and to check the nodulating ability of the plantlets when transplanted to pots.

Increased N_2 fixation is usually achieved by selecting the associated strains of *Rhizobium* or *Frankia* with the highest effectivity, but the approach consisting in selecting the host plant for its symbiotic performances is still largely overlooked. Preliminary results presented here clearly indicate that the second approach is most promising in the case of species characterized by an extensive genetic variability such as *Casuarina equisetifolia*. We found that this variability concerned not only the growth rate, but also the N_2 -fixing potential of this tree species. Exploiting this variability by identifying superior genotypes should substantially increase the yield of plantations established in N-deficient soils.

The selection of superior genotypes should obviously be coupled with the improvement of the methods of vegetative propagation, allowing the production of a large and continuous supply of planting stock. Recent advances made in the micropropagation of *Casuarina equisetifolia* will facilitate the worldwide dissemination of the clones with a high N_2 -fixing potential.

Acknowledgements

This research was supported in part by United Nations University (UNU) contract 85-56 and by Institut Français de Recherches Scientifiques pour le Développement en Coopération (ORSTOM).

132 B. Sougoufara, E. Duhoux, M. Corbasson, and Y. Dommergues

References

- Attewell, J., and F.A. Bliss. 1985. Host plant characteristics of common bean lines selected using indirect measures of N_2 fixation. pp. 3–9, in H.J. Evans, P.J. Bottomley, and W.E. Newton, eds., *Nitrogen Fixation Research Progress*. Nijhoff/Junk, The Hague.
- Bonga, J.M., and D.J. Durzan, eds. 1982. *Tissue Culture in Forestry*. Nijhoff/Junk, The Hague.
- Caldwell, B.E., and H.G. Vest. 1977. Genetic aspects of nodulation and dinitrogen fixation by legumes: the macrosymbiont. pp. 557–573, in R.W.F. Hardy and W.S. Silver, eds., *A Treatise on Dinitrogen Fixation*. Wiley, New York.
- Diem, H.G., D. Gauthier, and Y. Dommergues. 1983. An effective strain of *Frankia* from *Casuarina*. *Canadian Journal of Botany* 61:2815–2821.
- Duhoux, E., B. Sougoufara, and Y. Dommergues. 1986. Propagation of *Casuarina equisetifolia* through axillary buds of immature female inflorescences cultured *in vitro*. *Plant Cell Reports* 3:161–164.
- El-Lakany M.H., and K.R. Shepherd. 1984. Preliminary observations on stump propagation in *Casuarina cunninghamiana*. *Australian Forest Research* 14:243–247.
- Gauthier, D., H.G. Diem, and Y.R. Dommergues. 1985. Assessment of N_2 fixation by *Casuarina equisetifolia* inoculated with *Frankia* ORS021001 using ^{15}N methods. *Soil Biology and Biochemistry* 17:375–379.
- Gresshoff, P.M., D.A. Day, A.C. Delves, A.P. Mathews, J.E. Olsson, G.D. Price, K.A. Schuller, and B.J. Carroll. 1985. Plant host genetics of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in pea and soybean. pp. 19–25, in H.J. Evans, P.J. Bottomley, and W.E. Newton, eds., *Nitrogen Fixation Research Progress*. Nijhoff/Junk, The Hague.
- Husain, A.M.M., and P.K. Ponnuswamy. 1980. Propagation of *Casuarina junghuhniana* by planting shoots and root suckers. *Indian Forester* 106:298–299.
- Lundquist, R., and J.G. Torrey. 1984. The propagation of *Casuarina* species from rooted stem cuttings. *Botanical Gazette* 145:378–384.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473–497.
- Phillips, D.A. and L.R. Teuber. 1985. Genetic improvement of symbiotic nitrogen fixation in legumes. pp. 11–18, in H.J. Evans, P.J. Bottomley, and W.E. Newton, eds., *Nitrogen Fixation Research Progress*. Nijhoff/Junk, The Hague.
- Somasundaran, T.R., and S.S. Jagadees. 1977. Propagation of *Casuarina equisetifolia* Fors. by planting shoots. *Indian Forester* 103:734–738.

E. Les meilleures combinaisons "souches de *Frankia* x clones de *Casuarina*"

NODULATION ET FIXATION DE N₂

CHEZ NEUF COMBINAISONS CLONES DE

CASUARINA X SOUCHES DE FRANKIA

RESUME

Trois clones de *Casuarina equisetifolia* (α , β et L) inoculés avec trois souches de *Frankia* ORS 021001 (syn : Cj.1.82), ORS 020608 (syn : Br) et ORS 020607 (syn : Cef) ont été cultivés pendant 10 mois sur du sable lavé à l'acide et arrosés régulièrement avec une solution nutritive Hoagland et Arnon diluée au 1/4 sans N. Différents paramètres ont été analysés : la biomasse totale exprimée en masse de matière sèche et en N total, le poids sec des nodules et le N total des nodules. L'analyse factorielle de la réponse des différents clones aux différentes souches de *Frankia* a mis en évidence :

- Un effet significatif majeur des clones dans la symbiose, ceux-ci se classant dans l'ordre décroissant : $\beta > \alpha > L$.
- Un effet significatif des souches : tous clones confondus, la souche (Cj.1.82) apparaissant comme beaucoup plus effective que les souches (Cef) et (Br) qui se différencient très peu.
- Une absence d'interaction forte "clones de *Casuarina* x souches de *Frankia*".

Mots-clés : *Casuarina equisetifolia*, Fixation de N₂, *Frankia*, Nodulation.

INTRODUCTION

L'objectif d'améliorer la potentialité de fixer N_2 dans l'association symbiotique *Casuarina equisetifolia*-*Frankia* à travers la sélection des deux partenaires est complexe, puisqu'il s'agit de considérer les deux composantes du système : (i) la plante-hôte, (ii) le microorganisme fixateur de N_2 , *Frankia*. Nous avons montré précédemment (Sougoufara et al., 1987) que la quantité de N_2 fixé dépendait dans une large mesure du clone de *Casuarina equisetifolia* avec lequel *Frankia* était associé, l'expérimentation ayant été conduite avec une seule souche de *Frankia*.

Cependant nombre de travaux menés sur la fixation symbiotique de N_2 chez les Casuarinacées montrent que la souche de *Frankia* régit dans une certaine mesure l'aptitude du système à noduler et à fixer N_2 . Il s'agit soit d'expériences utilisant des suspensions de nodules broyés (Coynes, 1983 ; Gauthier, 1984 ; Reddell et Bowen, 1986) ; soit d'expériences utilisant des cultures pures (Diem et al., 1982 ; 1983 ; Zhang et Torrey, 1985 ; Torrey et Racette, 1989 ; Rosbrook et Bowen, 1987 ; Steele et al., 1989 ; Sougoufara et al., 1989), soit des expériences utilisant à la fois des cultures pures et des suspensions de nodules broyés (Reddell et al., 1988 ; Selstedt, 1988).

La question qui se posait à nous était de savoir quelle était la souche de *Frankia* à associer au clone de *Casuarina equisetifolia* choisi ? En d'autres termes, quelle était la meilleure combinaison "clone de *Casuarina* x souche de *Frankia*" ? Etant donné qu'aucune investigation n'avait été faite antérieurement sur le choix des meilleures combinaisons "clones de *Casuarina* x souches de *Frankia*", nous avons conçu une expérience factorielle ayant porté sur l'étude de l'influence de deux facteurs à trois niveaux

- un facteur clone : clone α , clone β , clone L
- un facteur souche : ORS021001 (syn : Cj.1.82), ORS020608 (syn : Br), ORS020607 (syn : Cef),

sur la nodulation et la fixation de N_2 . Il s'agissait donc de la comparaison de neuf combinaisons "clones de *Casuarina* x souches de *Frankia*".

METHODOLOGIE

On a utilisé un sol dunaire dit sol de Cambérène lavé au préalable à l'acide chlorhydrique (1/4 HCl ; 3/4 sol en volume). Le sol a été stérilisé à l'autoclave pendant 1 h à 120°C, puis additionné de billes de polystyrène de 2 mm de diamètre (1/4 billes; 3/4 sol en volume). Avec ce sol, on a rempli 81 récipients de 10 l chacun en plastique. Quand les boutures de chacun des trois clones α , β et L ont été âgées de 3 mois, on les a plantées dans les récipients à raison d'une bouture par récipient. Etant donné que le sol utilisé était totalement dépourvu en éléments nutritifs, toutes les deux semaines on a apporté à chaque plante 50 ml de la solution nutritive de Hewitt (1966) contenant par litre : $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 2,230 g ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,250 g ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,290 g ; H_3BO_3 : 3,100 g ; NaCl : 5,850 g ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,121 g ; H_2O : 1 litre.

L'expérience a comporté neuf traitements, avec neuf répétitions.

- traitement 1, clones α inoculés avec ORS021001
- traitement 2, clones α inoculés avec ORS020607
- traitement 3, clones α inoculés avec ORS020608
- traitement 4, clones β inoculés avec ORS021001
- traitement 5, clones β inoculés avec ORS020607
- traitement 6, clones β inoculés avec ORS020608
- traitement 7, clones L inoculés avec ORS021001
- traitement 8, clones L inoculés avec ORS020607
- traitement 9, clones L inoculés avec ORS020608

Compte tenu du fait que le sol et la solution nutritive ne contenaient absolument pas d'azote, on n'a pas introduit dans le dispositif un traitement de la plante non inoculée, l'expérience ayant montré que, sans azote, les plantes dépérissaient très rapidement. L'inoculation des boutures a eu lieu au moment de leur mise en place dans les récipients en apportant à chaque plante pour chaque traitement une quantité de culture de *Frankia* âgée de 3 semaines équivalente à 20 μg de protéines (Lowry et al., 1951).

Tous les récipients ont été placés en plein air sur une table ($h = 1$ m). Durant toute la durée de l'expérience les plantes ont été arrosées régulièrement à l'eau du robinet.

Sept mois après leur transplantation dans les récipients, les plantes ont été sacrifiées et on a récolté séparément les rameaux photosynthétiques, les tiges, les racines et les nodules. Pour chaque plante, on a déterminé la biomasse entière de la plante exprimée en masse de matière sèche et en N total, la biomasse des nodules exprimée en masse de matière sèche et le N total des nodules.

Etant donné que les plantes avaient poussé en l'absence de N combiné et que leur seule source de N avait été N_2 de l'air, la teneur en N des plantes mesurée à la fin de l'expérience a représenté la quantité de N_2 fixé.

3 - RESULTATS

L'analyse statistique portant sur les données transformées en log ont montré que les effets principaux "clones de *Casuarina*" et "souches de *Frankia*" ont été hautement significatifs ($P = 0,000$) et que l'interaction "Clones de *Casuarina* x souches de *Frankia*" calculée à partir des données transformées en log a été peu significative ($P = 0,05$).

3.1.- Effet des souches

La souche Cj.1.82, comparée aux souches Cef et Br, accroît significativement la fixation de N_2 de 17%, ce qui correspond à un accroissement de 11% et de 17% pour la biomasse des nodules exprimée en poids sec, ou 42% pour la biomasse des nodules exprimée en N total (Tableau 1).

3.2.- Effet des clones

La biomasse du clone β exprimée en azote total est 1,5 fois plus importante que celle du clone α , qui elle-même, est 1,6 fois plus élevée que celle du clone L. Ces résultats démontrent clairement que l'effet "clone" est plus important que l'effet "souche".

L'accroissement de la biomasse des nodules exprimée en poids sec est de 43% (β versus α) et 175% (β versus L) ; et pour la biomasse des nodules exprimée en N total, cet accroissement est de 50% (β versus α) et 300% (β versus L) (tableau 1).

3.3.- Comparaison des combinaisons

Lorsqu'on ne tient pas compte du clone L, qui est un clone défectueux, et si l'on prend comme référence le clone α qui est assez représentatif de la moyenne des génotypes de *Casuarina equisetifolia* que nous avons étudiés, on constate qu'en choisissant la meilleure combinaison (Cj.1.82 x β), on augmente la fixation de N_2 de 83% par rapport au moins bon couple (Br x α), ce qui est spectaculaire (Fig. 1).

Lorsque cette comparaison est maintenant fondée sur la biomasse des nodules, on a respectivement un accroissement de 70% si la biomasse des nodules est exprimée en poids sec et de 112% si la biomasse des nodules est exprimée en N total (Tableau 1).

3.4.- Absence d'interaction forte "clones de *Casuarina* x souches de *Frankia*"

Le classement des clones n'est pas modifié quelle que soit la souche de *Frankia* impliquée dans la combinaison "clone de *Casuarina* x souche de *Frankia*" (Tableau 1). Une telle situation d'après Gomez et Gomez (1976) s'interprète comme résultant d'une absence d'interaction forte entre les deux facteurs "clone" et "souche".

Cette conclusion est en conformité avec les résultats obtenus par Simon et al. (1985), Galiana (communication personnelle).

L'absence d'interaction forte peut être mise à profit dans les programmes de sélection ayant pour objet l'identification de clones performants en ce qui concerne l'aptitude à fixer N_2 .

3.5.- Remarque concernant le choix des critères ayant pour objet la sélection des combinaisons "clones de *Casuarina* x souches de *Frankia*" les plus performantes

Lorsqu'on fait appel, toutes combinaisons "clones *Casuarina* x souches de *Frankia*" confondues, aux critères simples "biomasse des plantes inoculées, exprimée en poids sec (DW) ou en N total (TOTN)" et "biomasse des nodules, exprimée en poids sec (NODW) et en N total (NODN)", on observe une corrélation positive hautement significative correspondant à ($P = 0,000$)), entre la biomasse des nodules et la quantité de N_2 fixé (0.936, $P < 0,001$), ce qui permet d'envisager l'utilisation du critère simple biomasse des nodules pour sélectionner les couples les plus performants.

4 - DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans les conditions expérimentales adoptées, il apparaît clairement que l'effet "clone" est plus important que l'effet "souche" qu'il ne faut cependant pas négliger. En effet, certains auteurs, en étudiant la spécificité d'hôte relative au potentiel fixateur de N_2 au sein d'un nombre élevé de combinaisons "espèces de *Casuarina* x souches de *Frankia*" n'ont pas trouvé de différence dans l'effectivité des souches de *Frankia* utilisées (Rosbrook et Bowen, 1987). D'autres par contre ont décelé des différences avec des expériences utilisant des cultures pures de *Frankia* ou des suspensions de nodules broyés conduites aussi bien au champ (Reddell et al., 1988) qu'en serre (Steele et al., 1989 ; Sellstedt, 1988). Malheureusement leur étude diffère de la notre par le fait que ces auteurs ont utilisé différentes espèces de *Casuarina* issues de semis, ce qui augmente

l'erreur expérimentale par suite d'une variabilité interspécifique et intraspécifique.

À la lumière des résultats présentés ici et ceux obtenus par ailleurs chez de nombreuses associations légumineuses - *Rhizobium*, *Pisum* (Cousin et al., 1985), *Trifolium* (Nutman, 1971), *Medicago* (Viands et al., 1981), *Cicer et Vigna* (Phillips et Teuber, 1985), il apparaît qu'en plus du microorganisme la nature génotypique de la plante hôte est déterminante dans l'aptitude à fixer N_2 .

Ces résultats suggèrent donc que pour améliorer la fixation de N_2 , il ne s'agit pas seulement de sélectionner le matériel végétal mais également de faire appel à une approche consistant à identifier les couples plantes-symbiotes les plus performants.

REFERENCES

- COUSIN R., MESSENGER A., PICARD J., de LAREMBERGUE H. & MARGUET P. (1985).- Variabilité génétique pour la fixation de l'azote chez le pois. In : Nutrition azotée des légumineuses, Versailles, 19-21 novembre 1985, INRA, Paris, 333-342.
- DIEM H.G., GAUTHIER D. & DOMMERGUES Y.R. (1982).- Isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina equisetifolia*, Can. J. Microbiol., 28, 526-530.
- DIEM H.G., GAUTHIER D. & DOMMERGUES Y.R. (1983).- An effective strain of *Frankia* from *Casuarina* sp., Can. J. Bot. 61, 2815-2821.
- GAUTHIER D. (1984).- La symbiose *Frankia* - *Casuarina equisetifolia*, Thèse de doctorat d'Etat, Université Paris VII.
- GOMEZ K.A. & GOMEZ A.A. (1976).- Statistical procedures for agricultural research, with emphasis on rice. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines, 55-74.
- HEWITT E.J. (1966).- Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical communication no 22 (2nd ed.), Commonwealth Agricultural Bureaux, London, 431-432.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. & RANDALL R.J. (1951).- Protein measurements with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-295.
- NUTMAN P.S. (1969).- Genetic of symbiosis and nitrogen fixation in legumes. Proc. Roy. Soc. B. 172, 417-437.
- PHILLIPS D.A. & TEUBER L.R. (1985).- Genetic improvement of symbiotic nitrogen fixation in legumes. In : Nitrogen fixation research progress, (Evans H.J., Bottomley P.J. et Newton W.E. eds), Martinus Nijhoff Dordrecht, 11-17.

REDDELL P., ROSBROOK P.A., BOWEN G.D. & GWAZE D. (1988).-Growth responses in *Casuarina cunninghamiana* plantings to inoculation with *Frankia*, Plant and Soil, 108, 79-86.

REDDELL P. & BOWEN G.D. (1986).- Host-*Frankia* specificity within Casuarinaceae, Plant and Soil, 93, 293-298.

ROSBROOK P.A. & BOWEN G.D. (1987).- The abilities of three *Frankia* isolates to nodulate and fix nitrogen with four species of *Casuarina*, Physiol. Plant., 70, 373-377.

SELLSTEDT A. (1988).- Nitrogenase activity, hydrogen evolution and biomass production in different *Casuarina* symbioses. Plant and Soil, 105, 33-40/

SIMON L., STEIN A., COTE S. & LALONDE M. (1985).- Performance of in vitro propagated *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn : clones inoculated with *Frankia*. Plant and Soil, 87, 125-133.

SOUGOUFARA B., DIEM H.G. & DOMMERGUES Y.R. (1989).- Response of field grown *Casuarina equisetifolia* to incubation with *Frankia* strain ORS021001 entrapped in alginate beads, Plant and Soil, 118, 133-137.

SOUGOUFARA B., DUHOUX E., CORBASSON M. & DOMMERGUES Y.R. (1987). Improvement of nitrogen fixation by *Casuarina equisetifolia* through clonal selection : a research note. Arid Soil Research and Rehabilitation, 1, 129-132.

STEELE D.B., RAMIREZ M.D. & STOWERS (1989).- Host plant growth response to Inoculation with *Frankia*, Plant and Soil, 118, 139-143.

TORREY J.G. & RACETTE S. (1989).- Specificity among the *Casuarinaceae* in root nodulation by *Frankia*, Plant and Soil, 118, 157-164.

VIANDS D.R., BARNES D.K. and HELHEIC G.H. (1981).- Nitrogen fixation in alfalfa. Responses to bidirectional selection or associated characteristics. USDA Tech. Bull. 1643, US Gov. Print. Off. Washington D.C., 1-17.

ZHANG Z. & TORREY J.G. (1985).- Studies of an effective strain of *Frankia* from *Allocasuarina lehmanniana* of the *Casuarinaceae*, Plant and Soil 87, 1-16.

Tableau 1 - Poids sec des plantes entières âgées de 7 mois et des nodules, N total des nodules et N₂ fixé dans le cas de neuf combinaisons "clones de *Casuarina equisetifolia* x souches de *Frankia*" cultivés sur un milieu dépourvu de N combiné

	Poids sec (g.plante ⁻¹)	N ₂ fixé (g.plante ⁻¹)	Poids sec nodules (g.plante ⁻¹)	N total (g.plante ⁻¹)
<u>Effet principal "souches"</u>				
ORS021001 (syn : Cj.1.82)	195,08 a	1,70 a	6,62 a	0,10 a
ORS 020608 (syn : Br)	182,48 b	1,45 b	5,98 b	0,07 b
ORS 020607 (syn : Cef)	178,21 c	1,44 b	5,63 b	0,07 b
<u>Effet principal "clones"</u>				
Clone β	239,56 a	2,23 a	8,84 a	0,12 a
Clone α	199,97 b	1,49 b	6,17 b	0,08 b
Clone L	116,25 c	0,87 c	3,21 c	0,03 c
L'analyse statistique a été effectuée sur des données transformées en log. Niveau de signification : *** P = 0,000 ; * P = 0,05 ; NS = non significatif				
- Facteur souches	***	***	***	***
- Facteur clones	***	***	***	***
- Interaction "clones x souches"	*	*	NS	*

Les chiffres dans une même colonne suivis d'une même lettre ne diffèrent pas significativement (P < 0,01).

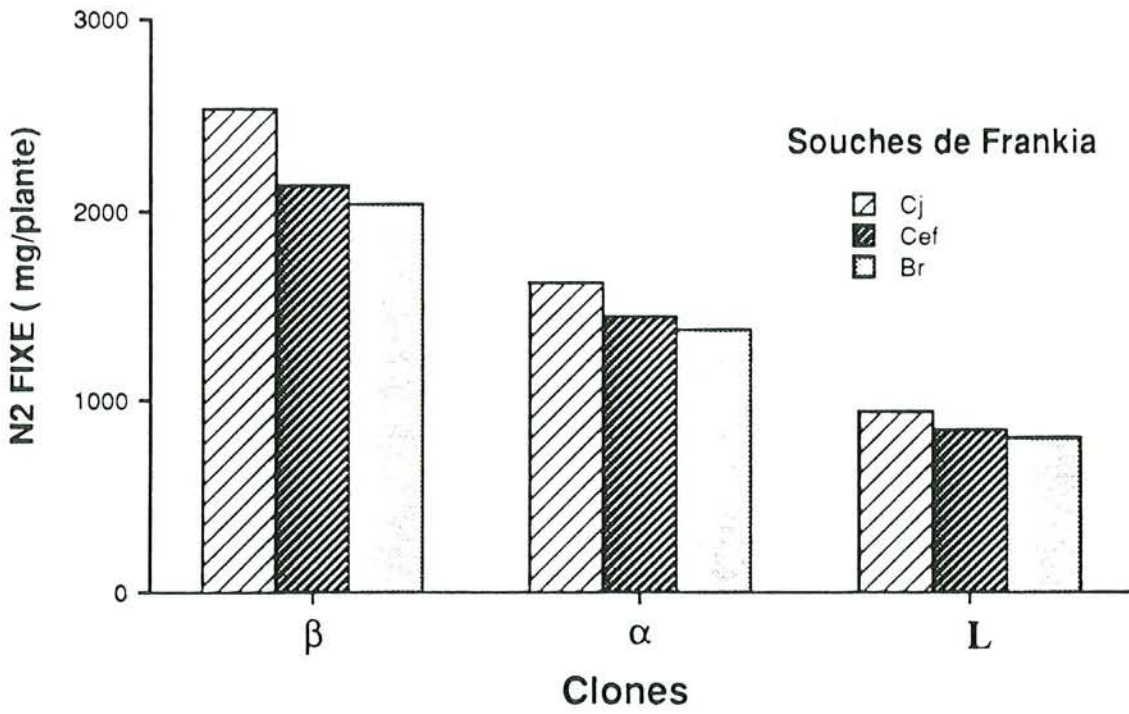


Figure 1 - N₂ fixé par trois clones α, β et L de *Casuarina equisetifolia* inoculés avec trois souches de *Frankia* (Cj.1.82, Cef, Br)

F. Estimation de la fixation de N_2

ESTIMATING N_2 FIXATION AND N DERIVED FROM SOIL BY *CASUARINA EQUISETIFOLIA* USING LABELLED ^{15}N FERTILIZER: SOME PROBLEMS AND SOLUTIONS

B. SOUGOUFARA

Ministère de la protection de la Nature, B.P. 1386, Dakar, Sénégal

S. K. A. DANSO

FAO/IAEA Division, P.O. Box 100, 1-1400 Vienna, Austria

H. G. DIEM and Y. R. DOMMERGUES*

BSSFT (ORSTOM/CTFT/CNRS), 45 bis Avenue de la Belle Gabrielle, 94736 Nogent-sur-Marne, Cedex, France

(Accepted 15 January 1990)

Summary—Three experiments were carried out in Senegal to assess the effect of four factors, clone, soil type, volume of containers and plant age, on N_2 fixation by *Casuarina equisetifolia* using isotope dilution (ID), A value (AV) and total N difference (TND) methods. Three clones grown in 15 l. containers differed significantly in their ability to fix N_2 and also to absorb soil N, the best clone (β) fixing 3.27 (ID) and 3.85 (AV) and the less active 2.51 (ID) and 2.73 (AV) g N_2 per tree during 1 yr. N_2 fixation by clone β was markedly affected by soil N: it decreased from 7.60 (AV) in Camberene soil (0.010% N) down to 4.64 (AV) g N_2 fixed per tree in Bel Air soil (0.025–0.030% N) during 1 yr. The amount of N_2 fixed was much higher in larger containers. In the case of 1 m³ containers with Camberene soil, the amount of N_2 fixed (AV) per tree (clone β) was 40.44 g during the first year and 84.43 g during the 2 first years of growth. In experiments 1 and 2, ID and AV estimations were significantly less than ID or AV estimations, but, in experiment 3, AV and TND estimations were similar. Problems raised by the estimation of N_2 fixation are discussed. Inoculation with *Frankia* strain ORS 021001 always markedly increased plant biomass expressed as dry weight and total N.

INTRODUCTION

Attention is focused worldwide on the exploitation of N_2 -fixing trees—woody legumes or actinorhizal plants—as producers of wood, fuel-wood and biomass or as soil improvers. Suspected N_2 -fixing trees have however often been introduced into different ecosystems, without first verifying that they fix significant amounts of N_2 (Dommergues, 1987). It is essential to quantify N_2 fixation in different species and provenances before promoting their extensive use. This knowledge would assist in designing better management practices for improving the N_2 fixed in various systems.

Some practical problems are bound to arise in the initial attempts to evaluate the N_2 -fixing potentials of trees, for which solutions will have to be sought. Our aim was to identify some of these potential problems and to propose possible solutions.

Three methods, isotope dilution (ID) and A value (AV) (both isotopic methods), and the total N difference method (TND) were used to evaluate N_2 fixation in *Casuarina equisetifolia* and to compare the effect of the following factors on the plant biomass and N_2 fixation: tree clone, soil type, size of containers for growing trees and plant age. The last part of the paper is devoted to discussions on ways to improve N_2 fixation measurements and also to enhance the

N_2 -fixing potential of *C. equisetifolia*, chosen as a model of fast-growing N_2 -fixing trees.

MATERIALS AND METHODS

Soil and plant material

The experiments were made in 1985 and 1986 at the ORSTOM Bel Air station in Dakar Senegal, using two types of soil: Camberene soil, a dune soil (97% sand), poor in nutrients, slightly acidic (pH 6.0), with 0.10 and 0.010% C and N respectively; and Bel Air soil, a sandy (93% sand), neutral (pH 7.0) soil, with C and N contents of 0.30 and 0.025–0.030% respectively. Each soil type was carefully homogenized, and fumigated with methylbromide. Three types of containers were used: 15 and 50 l. plastic containers which were fitted into holes dug out in the soil of the experimental field at 1.5 × 1.5 m intervals, and concrete 1 m³ containers (vol: 1000 l.) that were also fitted into the soil.

Cuttings of three clones of *C. equisetifolia* which had been shown (Sougoufara *et al.*, 1989) to have different N_2 -fixing potentials were used. These were: clone S (a relatively-poor nodulator); clone α (an intermediate nodulator); and clone β (a very good nodulator). The explants were placed in sterile Camberene soil in a growth chamber. After 1 month the rooted plantlets were transferred in polyethylene bags into the nursery. Two months later, the 3-month-old cuttings were placed in the

*To whom all correspondence should be addressed.

containers (two plants per container), and inoculated at the base with a 3-week-old liquid culture of *Frankia* strain ORS021001 (equivalent to 20 µg protein plant⁻¹). Later they were thinned to 1 plant per container.

Treatments

In experiment 1 the three treatments indicated in Table 1 were applied to clones S, α, β, with 6 replications. In this experiment the two isotope methods were used to estimate N₂ fixation: the isotope dilution method (ID) with treatment 1 (uninoculated plants) as the reference crop (Fried and Middelboe, 1977), and the AV method with a higher ¹⁵N rate applied (treatment 2) to the uninoculated reference crop (Fried and Broeshart, 1975; Danso, 1986). Trees were grown in 15 l. containers containing Camberene soil. Other experimental details are given in Table 1.

In experiment 2 only clone β was used to study the effects of inoculation (no inoculation and inoculation), soil type (Camberene and Bel Air), and volume of container (15 vs 50 l.) on N₂ fixation (using only the AV and TND methods). Each treatment was replicated three times. Other experimental details are given in Table 1.

In experiment 3, as in experiment 2, clone β of *C. equisetifolia* was used as plant material. Two factors at two levels each were studied: inoculation (no inoculation and inoculation), and plant age (12 and 24 months). Treatments were replicated five or six times. Trees were grown in 1000 l. containers containing Camberene soil. Other experimental details are given in Table 1. As in experiment 2, only the AV and TND methods were used to evaluate N₂ fixation.

In experiments 1 and 2, P and K were added to the soil as 5 g K₂HPO₄ before planting. In experiment 3, P and K were added to the soil as 20 g K₂HPO₄ before planting.

In the three experiments, plants were carefully irrigated throughout growth and, in addition, received 50 ml (15 and 50 l. containers) or 200 ml

(1000 l. containers) of N-free Hewitt (1966) solution every week. Plants were harvested at 9 months after transplanting [experiments 1, 2 and 3 (treatments 1 and 2)] or 21 months after transplanting [experiment 3 (treatments 3 and 4)], when they were 12- or 24-months-old, respectively.

Estimation of N₂ fixation

In experiments 1 and 2, the following plant parts were sampled separately:

- (i) photosynthetic branchlets [terminology recommended by Flores (1978); Johnson (1982); Torrey and Berg (1988), the term cladode previously used being inappropriate];
- (ii) branchlets, branches and trunk;
- (iii) roots; and
- (iv) nodules.

In experiment 3, because the trees were much larger than in experiments 1 and 2, the branchlets (dia <4 mm) were further separated from branches and trunk (dia >4 mm) so that there were five parts.

Each plant part was dried to constant weight at 70°C and ground into 100 µm powder. Subsamples of each powdered plant part were analysed for total N and ¹⁵N. Isotopic ¹⁵N analyses were carried out at Seibersdorf Laboratory (IAEA) using Dumas' method and a VG 602 mass spectrometer (Fiedler and Proksch, 1975). For each individual tree, N and ¹⁵N values for the whole plant were calculated by first weighting the atom % ¹⁵N excess of the different plant parts (including nodules in inoculated plants) (Fried *et al.*, 1983).

In experiment 1, because the amount of urea applied in treatments 1 and 3 was the same, each estimate of N₂ fixation by the TND was simply based on the difference between the average total N content of each inoculated plant and that of the uninoculated control (Bergersen, 1980). In experiment 1 (treatment 2 vs treatment 3) and in experiments 2 and 3, the principle of TND calculation was similar, but a

Table 1. Treatments in experiments 1, 2 and 3

Treatment No.	Application of ¹⁵ N urea (g N plant ⁻¹) ¹	Atom % ¹⁵ N excess in urea	Factors studied			
			Inoc. ²	Soil type ³	Volume of containers (l)	Age at harvest (months)
<i>Experiment 1 (clones S, α, β)</i>						
1	0.232	9.19	0			
2	1.400	1.89	0			
3	0.232	9.19	+			
<i>Experiment 2 (clone β)</i>						
1	1.400	1.89	0	C	15	
2	0.232	9.19	+	C	15	
3	1.400	1.89	0	C	50	
4	0.232	9.19	+	C	50	
5	1.400	1.89	0	B	15	
6	0.232	9.19	+	B	15	
7	1.400	1.89	0	B	50	
8	0.232	9.19	+	B	50	
<i>Experiment 3 (clone β)</i>						
1	5.590	1.89	0			12
2	0.930	9.19	+			12
3	5.590	1.89	0			24
4	0.930	9.19	+			24

¹In all cases, ¹⁵N urea applied at planting. In addition, in experiment 3, treatment 3, 5.590 g of non-labelled urea was applied 12 months after planting.

²0: no inoculation; +: inoculation with *Frankia* strain ORS 021001 (Diem *et al.*, 1983).

³C: Camberene soil; B: Bel Air soil.

Table 2. Experiment 1, comparison of the following parameters in three 12-month-old uninoculated (treatment 1) and inoculated (treatment 3) clones (S, α , β) of *C. equisetifolia*

Clones	Plant biomass (g plant ⁻¹)		Atom % ¹⁵ N excess	NDFS (g plant ⁻¹)	Nodule dry weight (g plant ⁻¹)	Estimates of N ₂ fixation (g plant ⁻¹)		
	Dry weight	Total N				ID	AV	TND
<i>Treatment 1 (uninoculated plants, low rate of urea)</i>								
S	204c	1.51c	0.211a	1.48c				
α	295b	2.18b	0.139a	2.14b				
β	417a	3.31a	0.167a	3.25a				
<i>Treatment 2 (uninoculated plants, high rate of urea)</i>								
S	379c	2.25c	0.285a	1.91c				
α	421b	2.75b	0.156b	2.52b				
β	534a	3.35a	0.222ab	2.95a				
<i>Treatment 3 (inoculated plants, same rate of urea as in treatment 1)</i>								
S	417c	4.54c	0.095a	1.99c	11.5c	2.51ab	2.73b	3.03b
α	534b	5.62b	0.092a	3.69b	17.3b	1.87c	1.54c	3.45b
β	943a	8.51a	0.103a	5.14a	27.5a	3.27a	3.85a	5.20a

Soil used: Camberene; volume of containers in which plants were grown: 15 l.

Within each treatment, data in each column followed by the same letter are not significantly different according to Newman-Keuls' test ($P < 0.05$).

Plant biomass expressed as dry weight or total N, atom % ¹⁵N excess, NDFS, nodule dry weight and N₂ fixed measured by the ID, the AV and the TND methods.

correction factor was applied taking into account the amount of N derived from fertilizer in N₂-fixing, i.e. inoculated (NDFFinoc.) and non-N₂-fixing i.e. uninoculated (NDFFuninoc.) plants, this correction factor being: + (NDFFuninoc. - NDFFinoc.).

Estimation of N derived from soil

For the non-N₂-fixing plant, N derived from soil (NDFS) was estimated as the difference in total N uptake in each plant and N derived from fertilizer. For the N₂-fixing plant, NDFS was the difference between total N uptake and N derived from fertilizer plus N₂ fixed.

RESULTS

No control was contaminated by *Frankia*.

Experiment 1

Plant biomass. The biomass of uninoculated and inoculated clones differed significantly in terms of dry weight or total N (Table 2). For dry weight and total N they ranked $S < \alpha < \beta$. The biomass increases resulting from inoculation were significant ($P < 0.05$); the mean dry weight of uninoculated plants (treatment 1) was 305 compared to 762 g plant⁻¹ in the inoculated ones (treatment 3) with corresponding values for total N being 2.33 and 6.23 g plant⁻¹, respectively.

Nodule weight and N₂ fixation. The ranking of the clones based on nodule biomass expressed in dry weight or total N was similar to that based on plant

dry weight or total N. Clone β was superior in N₂ fixation and, except for the TND estimate, clone S derived more N from N₂ fixation than clone α .

For clones α and β amounts of N₂ fixed were significantly higher by the TND than the isotopic methods (ID and AV) (Table 2).

The mean estimates of N₂ fixed for the three methods were: ID = 2.55, AV = 2.70 and TND = 3.90 g N₂ fixed plant⁻¹. The statistical analysis (not presented here) showed that the ID and AV methods assessed statistically similar N₂ fixed, but that the TND gave significantly higher estimations ($P < 0.05$).

Table 3 shows that the A values of the soil did not differ significantly ($P < 0.05$) with the rate of fertilizer applied. In contrast, the AVs of soil differed significantly with the clones.

N derived from soil (g plant⁻¹). The amount of NDFS differed significantly ($P < 0.05$) between the clones, their ranking based on this trait being similar to that based on the biomass.

Experiment 2

Plant biomass. For each treatment, means are given in Table 4. Interpretation of the data organized factorially is as follows.

—Soil type significantly ($P < 0.01$) affected plant biomass expressed as total N (g plant⁻¹), the means being 8.93 and 8.36 for the Camberene and Bel Air soils, respectively.

—Volume of container affected significantly ($P < 0.01$) plant dry weight and total N. The

Table 3. Experiment 1, A values of soil in treatments 1 (low rate of urea) and 2 (high rate of urea), uninoculated plants

Treatment	Application of ¹⁵ N urea (g N plant ⁻¹)	Clones			Mean (treatment 1 vs 2)
		S	α	β	
1	0.232	11.7	21.3	14.3	15.8a
2	1.400	8.8	16.4	11.1	12.1a
Mean (clones)		10.2B	18.9A	12.7B	

Treatments 1 and 2, whose means are followed by the same small letter, do not differ significantly ($P < 0.05$).

Clones whose means are followed by the same capital letter, do not differ significantly ($P < 0.05$).

Table 4. Experiment 2, effect of inoculation (Inoc.), soil type and volume of containers on the following parameters of 12-month-old uninoculated and inoculated *C. equisetifolia*, clone β

Treat. No.	Factors studied			Plant biomass (g plant ⁻¹)		Atom % ¹⁵ N excess	NDFS (g plant ⁻¹)	Nodule dry weight (g plant ⁻¹)	Estimates of N ₂ fixation ³ (g plant ⁻¹)	
	Inoc. ¹	Soil type ²	Volume ¹	Dry weight	Total N				AV	TND
1	0	C	15	453	3.14	0.214	2.78			
2	+	C	15	953	8.51†	0.097	4.57	18.3	3.85	5.64
3	0	C	50	958	4.86	0.203	4.34			
4	+	C	50	2386	19.20†	0.070	7.66	32.0	11.36	14.67
5	0	B	15	522	3.45	0.191	3.11			
6	+	B	15	882	6.95†	0.105	4.49	15.0	2.38	3.80
7	0	B	50	1020	5.12	0.121	4.79			
8	+	B	50	2250	17.92†	0.062	10.90	25.3	6.90	13.02
—Factor inoculation				**	**	**	**			
—Factor soil type				NS	**	NS	*	NS	*	**
—Factor volume				**	**	*	**	**	**	**
—Interactions										
Inoc. × soil				**	NS					
Inoc. × volume				**	**	NS	*			
Soil × volume				NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Inoc. × soil × volume				NS	NS	NS	NS			

Plant biomass expressed as dry weight or total N, atom % ¹⁵N excess, NDFS, nodule dry weight, N₂ fixed measured by the AV and the TND methods.

Significance level: ***P* < 0.01; **P* < 0.05; NS = not significant.

†Including nodules.

¹0: no inoculation; +: inoculation with *Frankia* strain ORS 021001.

²C: Camberene soil; B: Bel Air Soil.

³Estimates of N₂ fixation using AV and TND methods.

mean dry weights were 702 and 1653 g plant⁻¹ for 15 and 50 l. containers, respectively, with corresponding total N values of 5.51 and 11.77.

- Inoculation significantly (*P* < 0.01) affected plant dry weight and total N, the mean dry weights of uninoculated and inoculated plants being 738 and 1617 g respectively. The mean total N contents were 4.14 and 13.14 for uninoculated and inoculated plants, respectively (Table 4).

Nodulation and N₂ fixation. Treatment means are given in Table 4. Interpretation of the data organized factorially is as follows.

- Nodule dry weight (g plant⁻¹) was not affected by soil type, but was significantly (*P* < 0.01) higher in larger than in smaller containers, the mean nodule dry weights being 16.7 and 28.7 g plant⁻¹ in the 15 and 50 l. containers, respectively.
- Atom % ¹⁵N excess was not significantly affected by soil type, but it was significantly affected by volume of containers, the mean atom % ¹⁵N excess values being 0.152 and 0.114 in the 15 and 50 l. containers, respectively.
- Nitrogen fixed using the AV method was significantly (*P* < 0.05) affected by soil type, with means of 7.60 and 4.64 g plant⁻¹ for the Camberene and Bel Air soils respectively. Nitrogen fixed using the AV method was significantly (*P* < 0.01) higher in the larger than in the smaller containers, with means of 3.15 and 9.13 g plant⁻¹ for 15 and 50 l. containers, respectively.
- Soil type significantly (*P* < 0.01) affected N₂ fixed as measured with TND method, TND means being 10.24 and 8.54 g plant⁻¹ for the Camberene and Bel Air soils, respectively. TND was also significantly (*P* < 0.01) higher in the

larger containers than in the smaller ones, with means of 4.82 and 13.96 g plant⁻¹ in 15 and 50 l. containers, respectively.

- Similar to the observation in experiment 1, AV values were significantly (*P* < 0.01) smaller than TND values, the mean values for N₂ fixed (calculated in a factorial design including data from both methods) being 6.12 when using AV and 9.28 g plant⁻¹ when using TND.

N derived from soil. Treatment means are given in Table 4. Interpretation of the data organized factorially is as follows.

- The effect of soil type on N derived from soil (NDFS) was significant (*P* < 0.05), with means of 4.83 and 5.82 g plant⁻¹ for the Camberene and Bel Air soils, respectively.
- The effect of the volume of containers was significant (*P* < 0.01), NDFS means being 3.73 and 6.92 g plant⁻¹ for the 15 and 50 l. containers, respectively.
- The effect of inoculation was significant (*P* < 0.01), the means NDFS being 3.67 and 6.66 g plant⁻¹ for uninoculated and inoculated plants, respectively (Table 4).

Distribution of ¹⁵N in the different plant parts. The atom % ¹⁵N excess differed within the different plant parts with the following ranking, observed both in experiments 1 and 2: photosynthetic branchlets < branches < roots. The ranking based on total N was the opposite: photosynthetic branchlets > branches > roots. The atom % ¹⁵N excess in the nodules was similar (*P* < 0.05) to that of the photosynthetic branchlets (Table 5).

Experiment 3

In treatments 1 and 2 there were 6 replications. In treatments 3 and 4 there were 5 replications because

Table 5. Mean atom % ¹⁵N excess and mean total N content (g plant⁻¹) in the different plant parts of *C. equisetifolia*, experiments 1 (means of clones S, α and β) and 2 (means of treatments 2, 4, 6 and 8)

Plant part	Experiment 1		Experiment 2	
	Atom % ¹⁵ N excess	Total N	Atom % ¹⁵ N excess	Total N
Photosynthetic branchlets	0.046c	2.50a	0.033c	5.83a
Branches	0.089b	1.95b	0.084b	3.54b
Roots	0.197a	1.51c	0.174a	3.51b
Nodules	0.059c	0.26d	0.040c	0.34c

Data in each column followed by the same letter are not significantly different according to Newman-Keuls' test ($P < 0.05$).

one tree in treatment 4 gave a negative value of N₂ fixed and one tree in treatment 3 was eliminated to get a balanced design for treatments 3 and 4. Means of data for the four treatments are given in Table 6.

Biomass of plants. The biomass of 24-month-old plants, as dry weight and total N, was significantly higher ($P < 0.01$) than that of 12-month-old ones, and the effect of inoculation was highly appreciable. Except in treatment 1, the coefficient of variation was low (2–7%) (Table 6).

Nodulation and N₂ fixation. Nodule dry weight and N₂ fixed measured by the TND method increased significantly ($P < 0.01$) during the second year.

Estimates of N₂ fixed based on the either AV or TND method were similar, with a doubling of the amount of N₂ fixed in the second year (Table 6).

DISCUSSION

Methodology

Comparison of the methods of estimation of N₂ fixation. As already indicated, estimations based on ID and AV methods did not differ significantly in any clone.

In experiments 1 and 2 (Tables 2 and 4) estimations of N₂ fixed based on the total N difference method were always significantly higher than those obtained from the isotopic methods. Ruschel *et al.* (1979) reported that soil N uptake was higher in N₂-fixing than in non-nodulated soybeans. Such a phenomenon in our study could have resulted in the higher TND estimates of N₂-fixed than by the isotopic methods,

assuming that the inoculated plants absorbed more N from soil (NDFS) than uninoculated ones. In addition, there were large variations in the ability of the different clones to utilize soil N (NDFS), even in the absence of inoculation (Table 2, treatments 1 and 2), so that the discrepancies between isotopic and TND methods varied with the clones tested.

In experiment 3, in which the plants were grown in large concrete containers (1 m³) (Table 6), there was good agreement between evaluations based on AV and TND methods, probably because the relative contribution of soil N to the plant total N was similar in uninoculated and inoculated treatments, a hypothesis validated by the fact that NDFS of uninoculated and inoculated plants did not differ significantly.

The AV of the soil in experiment 1, treatments 1 and 2, (Table 3) did not differ significantly, which indicates that increasing the amount of fertilizer did not affect the AV, a conclusion in conformity with the AV concept (Fried and Dean, 1982). The fact that AV varied with the three uninoculated clones indicates that this value reflects the variability in the N nutrition pattern of the plants.

Sampling of the different plant fractions. Table 5 (experiments 1 and 2) shows that the atom % ¹⁵N excess, which, by definition, is inversely related to the % of N derived from N₂ fixation, was always much higher in roots than in aerial parts. The atom % ¹⁵N excess of nodules ranged from 0.050 to 0.064 or from 0.031 to 0.057 in experiments 1 or 2, respectively, and close to those of the aerial parts. The mechanisms responsible for the distribution of ¹⁵N in the different plant parts are probably complex. The

Table 6. Experiment 3, effect of inoculation (Inoc.) and plant age on the following characteristics of uninoculated and inoculated *C. equisetifolia*, clone β

Treat. No.	Factors studied		Plant biomass (g plant ⁻¹)		Atom % ¹⁵ N excess	NDFS (g plant ⁻¹)	Nodule dry weight (g plant ⁻¹)	Estimates of N ₂ fixation ² (g plant ⁻¹)	
	Inoc. ¹	Age (months)	Dry weight	Total N				AV	TND
1	0	12	3256 (37)	18.8 (35)	0.201 (70)	17.2 (39)			
2	+	12	5548 (7)	62.3 (7)	0.046 (68)	21.5 (63)	78 (10)	40.4 (43)	45.0 (9)
3	0	24	12070 (7)	76.6 (6)	0.013 (54)	75.3 (4)			
4	+	24	23851 (2)	161.1 (4)	0.005 (114)	76.7 (47)	220 (1)	84.4 (47)	84.8 (7)
—Factor Inoc.		**	**	*	NS				
—Factor age			**	**	**	**	**	*	**
—Interaction Inoc. × age		**	**	*	*				

Plant biomass expressed as dry weight and total N, atom % ¹⁵N excess, NDFS, nodule dry weight and N₂ fixed measured by the (AV) and the TND methods. Coefficients of variation (%) between brackets.

Significance level: ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

Soil used: Camberene soil; volume of containers where plants were grown: 1 m³.

¹0: no inoculation; +: inoculation with *Frankia* strain ORS 021001.

²See Table 1: in treatments 3 and 4 calculations were based on 5 out of 6 replications (see text).

following hypotheses can be proposed to explain this distribution:

- (1) the root may not have direct access to the N as it is fixed, as suggested by Pate *et al.* (1979) with a large amount of N derived from N_2 -fixation translocated to the aerial parts of the plant where it may be needed for the rapid growth of the assimilatory organs;
- (2) because the ^{15}N labelling of the soil declines with time (Witty, 1983), and with the roots formed before most other organs, their tissue should have a higher ^{15}N content than the rest of the plant.

Similar differences in the atom % ^{15}N excess in the different parts of plants have been reported by several authors [e.g. Montange *et al.* (1981); Fried *et al.* (1983); Rennie and Rennie (1983)]. Consequently to obtain an accurate estimation of the amount of N_2 fixed it is mandatory to sample and analyse separately the different parts of the plant before deriving a weighted ^{15}N average for the whole plant.

In addition, the distribution of ^{15}N in the uninoculated plant declined with age (Table 6), as a result of the decrease of ^{15}N in the soil (Fried *et al.*, 1983).

Variability of the data. In our experiments, greatest care was taken not only to obtain a well homogenized soil, but also to ensure the use of homogenous plant material, cuttings were used instead of seedlings. The consequence was that, in experiment 3 (Table 6), with the exception of treatment 1, coefficients of variation (CV) related to dry weight, total N and nodule weight were much lower than those observed in a previous experiment on *C. equisetifolia* (Gauthier *et al.*, 1985).

CV of atom % ^{15}N excess, were high probably because of the variability of this characteristic in the different plant parts. Because of the high variability of atom % ^{15}N excess, the estimations of N_2 fixation based on AV were less precise (i.e. had a higher CV) than the estimations obtained from the TND method, a result in contradiction with a number of reports quoted by Boddey (1987). To reduce the CV of atom % ^{15}N excess, one should increase the amount of ^{15}N added to the soil in the case of fast-growing trees, like *C. equisetifolia*, which absorb large amounts of N. In addition, one should attempt to improve the subsampling technique (which does not seem to be involved in the case of nodules, since the biomass is low) and also to increase the number of replications.

Labelling of the soil for fast-growing trees. For ease of application the labelling of the soil was achieved by incorporating the labelled fertilizer into the soil at planting time, which unavoidably leads to a decline of ^{15}N enrichment in soil (Witty, 1983). Consequently the decrease in the atom % ^{15}N excess of plant tissues, such as the one observed in Table 6 (e.g. treatment 1 vs treatment 3) cannot be attributed only to the incorporation of N derived from N_2 fixation. The solution to this problem has already been given by different authors who recommend the incorporation of ^{15}N labelled organic matter, the addition of various carbon sources to immobilize the N before planting, or the use of slow-release ^{15}N fertilizer formulations (Witty and Ritz, 1984; Boddey, 1987).

Because of the fast tree growth and high rate of N_2 fixation, labelled ^{15}N was markedly diluted in the

inoculated plants, resulting in low atom % ^{15}N excess values, likely to be drastically affected by otherwise small absolute errors. To avoid such problems, it may be necessary to use higher ^{15}N enrichments or higher amounts of labelled ^{15}N added to the soil (ca 1/20 of the expected total N in tree at harvest) than normally used in annual grain legumes.

Effect of the volume of containers in which trees were grown. Table 4 (experiment 2) shows that the larger the container, the higher was the plant biomass (dry weight and total N), the amount of N_2 fixed (AV, TND) and the amount of NDFS. This was also true for the % of N_2 fixed (results not presented). It is unlikely that the low biomass and N_2 fixation values in the small containers were largely attributable to differences in nutrient status since the amount of fertilizer that was applied to 15 and 50 l. containers was the same, or to water limitation since the plants were profusely irrigated. Furthermore, within containers of the same volume, inoculation increased not only N_2 fixed, but also NDFS, indicating that there was more N in the soil than taken up in the soil planted with uninoculated trees as an example. It seems that root confinement in small containers, in some unclear fashion, might tend to underestimate the N_2 -fixing potential of a tree, i.e. its N_2 fixation in the absence of any limiting factor, and this would have to be considered when experiments have to be carried out in closed systems, and in pots, in the field or greenhouse.

Effect of soil type. Although the total N content of Camberene and Bel Air soils was low, compared to that of most arable soils, the N content of Bel Air soil was still high enough to significantly reduce N_2 fixed by *C. equisetifolia*. This result suggests that *C. equisetifolia*, like most N_2 -fixing plants, probably prefer utilizing combined N than fixing their own N_2 from the atmosphere (Allos and Bartholomew, 1955; McAuliffe *et al.*, 1958; Harper, 1974; Hinson, 1975).

*Increasing the N_2 -fixing potential of *C. equisetifolia**

The data presented here strengthen the concept that an increase in N_2 fixation can be achieved through two approaches:

- (i) screening for host plants with potential for high N_2 fixation; and
- (ii) inoculating the host with a highly effective N_2 -fixing *Frankia* strain.

Clone selection. By comparing the characteristics of the three clones that were tested, differences in ranking were obtained, based on the characteristics examined.

Based on plant biomass, nodule or N derived from soil, the ranking for clones was: $S < \alpha < \beta$. For the amount of N_2 fixed, the ranking was: $\alpha < S < \beta$. This suggests that, at least for clones S and α , plant biomass, or the ability to use soil N are not overriding factors in the ability of these *C. equisetifolia* clones to fix N_2 in association with *Frankia*.

Variations in the ability of legumes to fix N_2 is well known [e.g. Hardarson *et al.* (1984)]. However, with the exception of the recent publication of Phillips *et al.* (1986) on *Cicer arietinum* and *Vigna unguiculata*, few papers have reported variations in their capacities to assimilate N from soil.

Exploiting this double variability is a most promising approach to improve N₂ fixation and growth, especially in the case of trees. The problem of the choice of the criterion to use for plant selection has been addressed in another paper, which concluded that evaluation of nodule biomass of trees grown in the absence of limiting factors is probably a simple and reasonably reliable one (Sougoufara *et al.*, 1989).

Considering only clones α and β , previous studies (Sougoufara *et al.*, 1987) using younger plants (7-month), have already shown the superiority of clone β over clone α . This similarity in the ranking of the clones in the 1987 study and in the present one where plants were 12- and 24-month-old suggests that it is probably possible to screen the host plants for N₂ fixation capabilities in their early stages.

Inoculation with effective strains of Frankia. If clone selection appears to be a promising approach to improve N₂ fixation, one should keep in mind that inoculation with *Frankia* is an absolute requirement in soils devoid of the compatible *Frankia* strains, a situation most often encountered in West Africa. In all three experiments, inoculation with the effective *Frankia* strain ORS 021001 dramatically increased the yield of *C. equisetifolia*, expressed as dry weight and total N.

Acknowledgements—Financial support for the study has been provided by FAO/IAEA division Vienna, the French Ministry of Research through a CIRAD grant, ORSTOM, the International Foundation for Science and Ministère de la Protection de la Nature du Sénégal. We are grateful to Marc Ducouso for performing statistical analyses on the data and Jean Bakhom for technical assistance.

REFERENCES

- Allos H. F. and Bartholomew W. V. (1955) Effect of available nitrogen on symbiotic fixation. *Soil Science Society of America Proceedings* **19**, 182–184.
- Bergersen F. (Ed.) (1980) *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. Wiley, New York.
- Boddey R. M. (1987) Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. *CRC Critical Review Plant Science* **6**, 209–266.
- Danso S. K. A. (1986) Review: estimation of N₂ fixation by isotope dilution: an appraisal of techniques involving ¹⁵N enrichment and their applications—comments. *Soil Biology & Biochemistry* **18**, 243–244.
- Diem H. G., Gauthier D. and Dommergues Y. R. (1983) An effective strain of *Frankia* from *Casuarina*. *Canadian Journal of Botany* **61**, 2815–2821.
- Dommergues Y. R. (1987) The role of biological nitrogen fixation in agroforestry. In *Agroforestry, a Decade of Development* (H. A. Stepler and P. K. R. Nair, Eds), pp. 245–271. International Council for Research in Agroforestry, Nairobi.
- Fiedler R. and Prosche G. (1975) The determination of nitrogen-15 by emission and mass spectrometry in biochemical analysis: a review. *Analytica Chimica Acta* **78**, 1–62.
- Flores E. M. (1978) The shoot apex of *Casuarina* (Casuarinaceae). *Revista de Biología Tropical* **26**, 247–260.
- Fried M. and Broeshart H. (1975) An independent measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop. *Plant & Soil* **43**, 707–711.
- Fried M. and Dean L. A. (1982) A concept concerning the measurement of available soil nutrients. *Soil Science* **73**, 263–271.
- Fried M. and Middelboe V. (1977) Measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop. *Plant & Soil* **47**, 713–715.
- Fried M., Danso S. K. A. and Zapata F. (1983) The methodology of measurement of N₂ fixation by non-legumes as inferred from field experiments with legumes. *Canadian Journal of Microbiology* **29**, 1053–1062.
- Gauthier D., Diem H. G., Dommergues Y. R. and Ganry F. (1985) Assessment of N₂ fixation by *Casuarina equisetifolia* inoculated with *Frankia* strain ORS021001 using ¹⁵N methods. *Soil Biology & Biochemistry* **17**, 375–379.
- Hardarson G., Zapata F. and Danso S. K. A. (1984) Effect of plant genotype and nitrogen fertilizer on symbiotic nitrogen fixation by soybean cultivars. *Plant & Soil* **82**, 397–405.
- Harper J. E. (1974) Soil and symbiotic requirements for optimum soybean production. *Crop Science* **14**, 255–260.
- Hewitt E. J. (1966) *Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition*. Technical communication No. 22. Commonwealth Agricultural Bureaux, London.
- Hinson K. (1975) Nodulation responses from nitrogen applied to soybean half root systems. *Agronomy Journal* **67**, 799–804.
- Johnson L. A. S. (1982) Notes on Casuarinaceae. *Journal of Adelaide Botanical Garden* **6**, 73–87.
- McAuliffe C., Chamblee D. S., Uribe-Arango H. and Woodhouse W. W. (1958) Influence of inorganic nitrogen on nitrogen fixation by legumes as revealed by ¹⁵N. *Agronomy Journal* **50**, 334–337.
- Montange D., Warembourg F. R. and Bardin R. (1981) Utilisation du ¹⁵N₂ pour estimer la fixation d'azote et sa répartition chez les légumineuses. *Plant & Soil* **63**, 131–139.
- Pate J. S., Layzell D. B. and Atkins C. A. (1979) Economy of carbon and nitrogen in a nodulated and a non-nodulated (NO₃-grown) legume. *Plant Physiology* **64**, 1083–1088.
- Phillips D. A., Jones M. B. and Foster K. W. (1986) Advantages of the nitrogen-15 dilution technique for field measurements of symbiotic dinitrogen fixation in legumes. In *Field Measurement of Dinitrogen Fixation and Denitrification* (R. D. Hauck and R. W. Weaver, Eds), pp. 11–21. Soil Science Society of America, Madison.
- Rennie R. J. and Rennie D. A. (1983) Techniques for quantifying N₂ fixation association with nonlegumes under field and greenhouse conditions. *Canadian Journal of Microbiology* **29**, 1022–1035.
- Ruschel A. P., Vose P. B., Victoria R. L. and Salati E. (1979) Comparison of isotope techniques and non-nodulating isolines to study the effect of ammonium fertilization on dinitrogen fixation in soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Plant & Soil* **53**, 513–525.
- Sougoufara B., Duhoux E., Corbasson M. and Dommergues Y. R. (1987) Improvement of nitrogen fixation by *Casuarina equisetifolia* through clonal selection: a research note. *Arid Soil Research & Rehabilitation* **1**, 129–132.
- Sougoufara B., Duhoux E. and Dommergues Y. R. (1989) Choix des critères de sélection chez un arbre fixateur d'azote: *Casuarina equisetifolia*. *Oecologia Plantarum* **10**, 215–224.
- Torrey J. G. and Berg R. H. (1988) Some morphological features for generic characterization among the Casuarinaceae. *American Journal of Botany* **75**, 864–874.
- Witty F. J. (1983) Estimating N₂ fixation in the field using ¹⁵N labelled fertilizer: some problems and solutions. *Soil Biology & Biochemistry* **15**, 631–639.
- Witty F. J. and Ritz K. (1984) Slow release ¹⁵N fertilizer formulations to measure N₂ fixation by isotope dilution. *Soil Biology & Biochemistry* **16**, 657–661.

G. Choix des critères de sélection chez *Casuarina equisetifolia*

Acta Oecologica
Oecol. Plant., 1989, Vol. 10, n° 2, p. 215-224.

Choix des critères de sélection chez un arbre fixateur de N_2 : *Casuarina equisetifolia*

B. Sougoufara (*), E. Duhoux (**) et Y. R. Dommergues (***)

(*) Direction de la conservation des sols et du reboisement et O.R.S.T.O.M.,
 B.P. n° 1386, Dakar, Sénégal.

(**) Université de Paris-VII et B.S.S.F.T.

(***) B.S.S.F.T., Laboratoire commun O.R.S.T.O.M./C.T.F.T. (C.I.R.A.D.)/C.N.R.S.,
 45 bis, avenue de la Belle-Gabrielle,
 94736 Nogent-sur-Marne Cedex, France

RÉSUMÉ

Des boutures âgées de 3 mois de trois clones de *Casuarina equisetifolia* (S, α , β) différant par leur aptitude à noduler, ont été plantées dans un sol stérilisé déficient en N, marqué avec de l'urée ^{15}N afin de comparer les quantités d'azote de la plante provenant de la fixation de N_2 (N_{dfa}) et du sol (N_{dfs}). Une moitié des plantes a été inoculée avec la souche de *Frankia* ORS021001, l'autre n'a pas été inoculée. Douze mois plus tard, on a procédé à la récolte des plantes. Les clones inoculés différaient les uns des autres non seulement par le poids de leurs nodules mais aussi par leur aptitude à fixer N_2 (N_{dfa}) et à absorber N du sol (N_{dfs}). Les clones non inoculés différaient entre eux par leur N_{dfs} . Contrairement à ce que l'on pouvait attendre, les valeurs N_{dfa} n'étaient nullement reliées aux valeurs N_{dfs} . Les valeurs N_{dfs} des plantes inoculées étaient toujours plus élevées que celles des témoins non inoculés, ce qui explique que les chiffres de fixation de N_2 fondés sur la « méthode de la différence » sont souvent surévalués. Une partie de la discussion a porté sur le problème du choix de critères de sélection des clones.

MOTS CLÉS : sélection clonale, *Frankia*, *Casuarina equisetifolia*,
 fixation de N_2 , ^{15}N , azote du sol.

ABSTRACT

Three-month old cuttings of three clones of *Casuarina equisetifolia* (S, α , β), already known to differ by their mean nodule weight, were planted in a sterile N-deficient soil labelled with ^{15}N urea to compare the amounts of plant N derived from N_2 fixation (N_{dfa}), and from soil (N_{dfs}). One half of the cuttings was inoculated with *Frankia* strain ORS021001, the other half remained uninoculated. Twelve months later, plants were harvested. Inoculated clones appeared to differ from each other not only by their nodule weight, but also by their ability to fix N_2 (N_{dfa}) and to absorb soil N (N_{dfs}). Uninoculated clones differed from each other by their N_{dfs} . Unexpectedly, N_{dfs} were not correlated with N_{dfa} . N_{dfs} of inoculated plants was significantly higher than that of uninoculated controls, which explains why figures of N_2 fixation based on the "difference method" are often overestimated. The choice of criteria for selecting the clones is discussed.

KEY WORDS: clonal selection, *Frankia*, *Casuarina equisetifolia*,
 N_2 fixation, ^{15}N , soil N.

1. INTRODUCTION

Les espèces ligneuses sont souvent caractérisées par une grande variabilité. Depuis plus d'une décennie, on a commencé à exploiter cette variabilité naturelle pour accroître la productivité de plusieurs espèces d'Eucalyptus (DELWAULLE, 1985) et de Pins (FRANCO & SCHWARZ, 1985) en faisant notamment appel à la sélection clonale.

Mais jusqu'à présent, à part le cas des aulnes (HUSS-DANEL, 1980; TREMBLAY *et al.*, 1984), cette approche n'a pas encore été utilisée pour augmenter la fixation de N_2 chez les espèces ligneuses.

Au cours d'une expérience préliminaire effectuée en 1985, nous avons identifié deux clones de *Casuarina equisetifolia* appelés clones α et β , qui à l'âge de 7 mois présentaient des différences significatives en ce qui concerne la biomasse de leurs parties aériennes, leur nodulation et leur aptitude à fixer N_2 mesurée par la méthode de réduction à l'acétylène (SOUGOUFARA *et al.*, 1986 et 1987). Ces premiers résultats ont montré clairement que ces plants de *Casuarina equisetifolia* âgés de 7 mois présentaient de grandes différences dans leur aptitude à fixer N_2 . C'est pourquoi nous avons décidé d'étendre cette étude à trois clones plus âgés (1 an au lieu de 7 mois) en comparant les caractéristiques suivantes: nodulation et fixation de N_2 mesurée par différentes méthodes; absorption de l'azote du sol; biomasse des plantes exprimée en poids sec ou N total.

Cette comparaison a permis de proposer, parmi ces différentes caractéristiques, celles qui pourraient être utilisées pour identifier les individus à la fois bons fixateurs de N_2 et bons producteurs de biomasse.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les trois clones utilisés ont été les deux clones, α et β , qui avaient fait l'objet de l'étude préliminaire déjà citée (SOUGOUFARA *et al.*, 1986 et 1987) et un troisième clone, S, choisi en raison de sa nodulation médiocre. La souche de *Frankia* utilisée pour l'inoculation a été la souche ORS 021001 (DIEM *et al.*, 1982 et 1983).

On a rempli 54 seaux en plastique de 15 l chacun avec un sol dunaire dit sol de Cambérène préalablement stérilisé au bromure de méthyle. Ce sol est très sableux (98% de sable), acide (pH eau = 5,0) et très pauvre en N (0,01%) et en C (0,12%). Les seaux ont été installés en plein champ avec un espacement de 1,5 x 1,5 m. On les a enfoncés dans le sol en veillant à ce que le bord de chaque récipient dépasse la surface du sol de 5 à 10 cm. Les boutures des trois clones choisis (S, α , β), obtenues par la méthode usuelle de bouturage, ont été mises en place dans les seaux, lorsqu'elles avaient 3 mois, à raison d'une bouture par seau. Étant donné que le sol de Cambérène est très pauvre en éléments minéraux (somme des bases échangeables: 0,17 meq/100 g), on a apporté au début de l'expérience 5 g de K_2HPO_4 par récipient. Toutes les 2 semaines, on a apporté à chaque arbre 50 ml de la solution nutritive de Hewitt (1966) contenant par litre: $MnSO_4$, $4H_2O$: 2,230 g; $CuSO_4$, $5H_2O$: 0,250 g; $ZnSO_4$, $7H_2O$: 0,290 g; H_3BO_3 : 3,100 g; $NaCl$: 5,850 g; Na_2MoO_4 , $2H_2O$: 0,121 g.

L'expérience a comporté trois traitements avec six répétitions:

— *Traitement 1*: arbres non inoculés; application d'urée marquée ^{15}N (excès isotopique 9,19%) à raison de 0,234 g N-urée par seau.

— *Traitement 2*: arbres non inoculés; application d'urée marquée ^{15}N (excès isotopique 1,89%) à raison de 1,400 g N-urée par seau.

— *Traitement 3*: arbres inoculés avec *Frankia*; application d'urée marquée suivant les mêmes modalités que dans le traitement 1.

Le marquage du sol à l'aide de ^{15}N avait pour objet de calculer d'une part la quantité de N_2 fixé par les plantes inoculées, d'autre part la quantité de N du sol absorbé par les plantes inoculées et non inoculées.

La souche de *Frankia* ORS 021001 (DIEM *et al.*, 1982) a été cultivée sur milieu Qmod (LALONDE & CALVERT, 1979).

L'inoculation des boutures (traitement 3) a eu lieu au moment de leur mise en place dans les seaux en apportant à chaque plante une quantité de culture de *Frankia* ORS 021001 âgée de 3 semaines équivalente à 20 μg de protéines. Pendant toute la durée de l'expérience, les plantes ont été arrosées régulièrement à l'eau du robinet.

Neuf mois après leur transplantation dans les seaux, les plantes ont été sacrifiées et l'on a récolté séparément les rameaux assimilateurs, les tiges, les racines et les nodules dans le cas des plantes inoculées. Aucune des plantes non inoculées n'a été contaminée par *Frankia*.

Pour chacun des différents organes des plantes (rameaux assimilateurs, tiges, racines, nodules) on a déterminé le poids sec, la teneur en N total et l'excès isotopique, cette dernière analyse ayant été effectuée au laboratoire de l'A.I.E.A. à Seibersdorf, Autriche.

A partir des excès isotopiques ainsi déterminés et du poids de chacun des différents organes, on a calculé l'excès isotopique pondéré de chaque plante. La fixation de N_2 et de la quantité d'azote provenant du sol ont été estimées en utilisant la méthode isotopique directe et la méthode de la valeur A, le principe de ces deux méthodes ayant été rappelé par ailleurs par différents auteurs (FRIED *et al.*, 1983; RENNIE & RENNIE, 1983; CORNET *et al.*, 1985; HAUCK & WEAVER, 1986).

3. RÉSULTATS

3.1. BIOMASSE DES NODULES EXPRIMÉE EN POIDS SEC OU N TOTAL

Le poids sec des nodules diffère très significativement entre les trois clones, les valeurs moyennes étant les suivantes: $S = 11,5$; $\alpha = 17,3$; $\beta = 27,5$ g par plante. La biomasse des nodules exprimée en N total diffère également très significativement entre les trois clones, les valeurs moyennes étant les suivantes: $S = 0,128$; $\alpha = 0,227$; $\beta = 0,440$ g N par plante (tableau I).

Le classement des clones en fonction du critère « biomasse des nodules » est le suivant:

$$S < \alpha < \beta.$$

3.2. QUANTITÉ DE N_2 FIXÉ

3.2.1. Quantité de N_2 fixé exprimée en valeur absolue

Quelle que soit la méthode d'estimation utilisée (méthode isotopique ou méthode de la valeur A) les clones diffèrent significativement les uns des autres mais le classement n'est plus le même que le classement fondé sur la biomasse des nodules (tableau I): $\alpha < S < \beta$.

Si l'on regroupe l'ensemble des données correspondant aux trois clones et aux deux méthodes d'estimation et que l'on effectue une analyse factorielle de toutes ces données, on obtient le même classement des clones: $\alpha < S < \beta$, les valeurs

TABLEAU I. — Biomasse des nodules des trois clones (S, α , β) de *Casuarina equisetifolia* âgés de 12 mois et quantité de N_2 fixé estimée suivant la méthode isotopique directe ou la méthode de la valeur A.

Clones	Biomasse des nodules (g/plante)		Quantité de N_2 fixé (g/plante)	
	Poids sec	N total	Méthode isotopique directe	Valeur A
S	11,5 a	0,128 a	2,51 a (54)	2,73 (62)
α	17,3 b	0,227 b	1,87 (32)	1,54 (30)
β	27,5 c	0,440 c	3,27 c (37)	3,85 (47)

(¹) Entre parenthèses % de N_2 fixé.

Dans chaque colonne les données suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement ($P < 0,01$).

moyennes ainsi calculées étant les suivantes: clone S = 2,62; clone α = 1,70; clone β = 3,56 g N_2 fixé par plante.

Cette analyse factorielle montre en outre que les deux méthodes d'évaluation donnent des résultats non significativement différents, les valeurs moyennes calculées étant assez proches: méthode isotopique directe = 2,55 et méthode de la valeur A = 2,70 g N_2 fixé par plante.

3.2.2. Pourcentage de N_2 fixé

Quelle que soit la méthode d'estimation utilisée (méthode isotopique ou méthode de la valeur A), les clones diffèrent significativement les uns des autres, le classement étant toutefois différent du classement fondé sur les valeurs absolues de quantité d'azote fixé (tableau I): $\alpha < \beta < S$. L'analyse factorielle de l'ensemble des données confirme ce classement; les trois clones diffèrent significativement, les pourcentages moyens calculés étant les suivants: clone S = 58,2%; clone α = 31,3%; clone β = 42,5%. Les deux méthodes d'évaluation du pourcentage de N_2 fixé donnent des résultats non significativement différents.

3.3. QUANTITÉ DE N PROVENANT DU SOL

Dans le cas des plantes non inoculées (traitement 1), la quantité de N provenant du sol dans les tissus de la plante, est pratiquement égale à la quantité de N total (biomasse exprimée en N total) puisque le pourcentage de N provenant de l'engrais est faible: 1,5 à 2,3% (tableau II). C'est ainsi que pour le clone S la quantité de N provenant du sol est 1,48 g par plante et la quantité de N total (biomasse exprimée en N total) est de 1,51 g par plante. Les quantités de N provenant du sol pour chacun des clones non inoculés diffèrent très significativement: S = 1,48; α = 2,14; β = 3,25 g N par plante.

Si l'on considère l'ensemble des données correspondant aux traitements 1 (plantes non inoculées) et 3 (plantes inoculées ayant reçu le même apport d'urée) et que l'on effectue une analyse factorielle de ces données, l'on observe que les clones diffèrent très significativement, les valeurs moyennes calculées étant les suivantes: S = 1,73; α = 2,91; β = 4,20 g N du sol par plante et que l'effet de l'inoculation est très significatif: plantes non inoculées = 2,29 plantes inoculées = 3,60 g N du sol par plante.

Si l'on considère maintenant l'ensemble des données correspondant aux traitements 2 (plantes non inoculées ayant reçu un apport d'urée relativement élevé) et 3 (plantes inoculées avec un faible apport d'urée) et que l'on effectue une analyse factorielle portant sur ces données, l'on observe que les clones diffèrent significativement (α versus β) ou très significativement (S versus β ; S versus α) les uns des autres, les valeurs moyennes calculées étant les suivantes: $S=1,83$; $\alpha=3,27$; $\beta=3,76$ g N du sol par plante et que l'effet de l'inoculation est très significatif: plantes non inoculées = 2,46; plantes inoculées = 3,45 g N du sol par plante.

Dans tous les cas, le classement des clones est le suivant: $S < \alpha < \beta$.

TABLEAU II. — N provenant du sol et de l'engrais et biomasse des trois clones (S, α , β) de *Casuarina equisetifolia* âgés de 12 mois non inoculés et inoculés avec la souche de *Frankia* ORS 021001.

Clone	N°	Traitements		N provenant (¹)		Biomasse	
		N-urée (g/plante)	Inoculat.	du sol (g/plante)	de l'engrais (%)	Poids sec (g/plante)	N total (g/plante)
S	1	0,232	0	1,48	2,3	204	1,51
	2	1,400	0	1,91	15,0	295	2,24
	3	0,232	+	1,99 (I) 1,76 (A)	1,0 (I) 1,0 (A)	417	4,54
α	1	0,232	0	2,14	1,5	379	2,18
	2	1,400	0	2,52	8,2	421	2,28
	3	0,232	+	3,69 (I) 4,02 (A)	1,0 (I) 1,0 (A)	534	5,62
β	1	0,232	0	3,25	1,8	574	3,31
	2	1,400	0	2,95	11,7	764	3,35
	3	0,232	+	5,14 (I) 4,57 (A)	1,1 (I) 1,1 (A)	947	8,51

(¹) Pour les données correspondant au traitement 3, les estimations peuvent être différentes suivant que l'on a utilisé la méthode isotopique directe (I) ou la méthode de la valeur A (A).

3. 4. BIOMASSE DES PLANTES EXPRIMÉE EN POIDS SEC OU EN N TOTAL

En l'absence d'inoculation (traitement 1) les biomasses des trois clones diffèrent très significativement les uns des autres, avec les valeurs suivantes pour le poids sec: clone S = 204; clone α = 379; clone β = 574 g par plante et pour l'azote total: clone S = 1,51; clone α = 2,18; clone β = 3,31 g N par plante (tableau II).

Si l'on considère l'ensemble des données correspondant au traitement 1 (plantes non inoculées) et au traitement 3 (plantes inoculées ayant reçu le même apport d'urée) et que l'on effectue une analyse factorielle de ces données, l'on observe que les clones diffèrent très significativement. Les valeurs moyennes calculées pour les biomasses exprimées en poids sec sont les suivantes: clone S = 310; clone α = 456; clone β = 760 g par plante et pour les biomasses exprimées en N total: clone S = 3,02; clone α = 3,90; clone β = 5,91 g N/plante.

L'effet de l'inoculation est hautement significatif, les valeurs calculées des poids secs étant les suivantes: plantes non inoculées = 385; plantes inoculées = 632 g par plante et des biomasses exprimées en N total: plantes non inoculées = 2,33; plantes inoculées = 6,22 g par plante.

Si l'on considère maintenant l'ensemble des données correspondant aux traitements 2 (plantes non inoculées ayant reçu un apport d'urée relativement élevé) et 3 (plantes inoculées ayant reçu un faible apport d'urée) et que l'on effectue une analyse factorielle de ces données l'on observe que, là encore, les clones diffèrent très significativement. Les valeurs calculées pour les biomasses exprimées en poids sec étant les suivantes: clone S = 356; clone α = 477; clone β = 855 g par plante et pour les biomasses exprimées en N total: clone S = 3,39; clone α = 3,95; clone β = 5,93 g par plante.

L'effet de l'inoculation est hautement significatif, les valeurs calculées pour les biomasses exprimées en poids sec étant les suivantes: plantes non inoculées = 493; plantes inoculées = 632 g par plante et pour les biomasses exprimées en N total: plantes non inoculées: 2,62 plantes inoculées: 6,23 g N par plante.

Dans tous les cas, le classement des clones est le suivant: $S < \alpha < \beta$.

3. 5. CORRÉLATIONS

Dans le cas des plantes inoculées, on a construit une matrice de corrélation entre les huit variables étudiées (tableau III).

TABLEAU III. — Matrice des corrélations entre les huit variables étudiées (plantes inoculées).

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1.000	0.950	0.886	0.851	0.385	0.407	0.869	0.888
2	0.950	1.000	0.850	0.753	0.535	0.587	0.873	0.912
3	0.886	0.850	1.000	0.962	0.010	0.339	0.769	0.761
4	0.851	0.753	0.962	1.000	-0.112	0.131	0.694	0.678
5	0.385	0.535	0.010	-0.112	1.000	0.566	0.426	0.512
6	0.407	0.587	0.339	0.131	0.566	1.000	0.554	0.540
7	0.869	0.873	0.769	0.694	0.426	0.554	1.000	0.977
8	0.888	0.912	0.761	0.678	0.512	0.540	0.977	1.000

1. Biomasse des plantes exprimée en poids sec.

2. Biomasse des plantes exprimée en N total.

3. N provenant du sol déterminé par la méthode isotopique directe.

4. N provenant du sol déterminé par la méthode de la valeur A.

5. N₂ fixé déterminé par la méthode isotopique directe.

6. N₂ fixé déterminé par la méthode de la valeur A.

7. Biomasse des nodules exprimée en poids sec.

8. Biomasse des nodules exprimée en N total.

On a indiqué en italique les corrélations correspondant à $P < 0,01$.

4. DISCUSSION ET CONCLUSION

Les trois clones étudiés diffèrent significativement les uns des autres, mais les classements varient en fonction des paramètres considérés.

Le classement $\alpha < S < \beta$ correspond au paramètre « quantité de N₂ fixé en valeur absolue ». Le classement $\alpha < \beta < S$ correspond au paramètre « pourcentage de N₂ fixé ».

Le classement $S < \alpha < \beta$ s'observe pour les paramètres «biomasse des plantes (poids sec et N total)», «N provenant du sol», «biomasse des nodules (poids sec et N total)».

Ces résultats suggèrent que l'aptitude à fixer N_2 est indépendante de l'aptitude à utiliser N du sol. Ce fait est très bien mis en évidence sur la figure 1, où l'on voit que le clone S, bien que bon fixateur de N_2 , utilise moins bien N du sol de sorte que sa biomasse totale est inférieure à celle du clone α .

L'existence d'une variabilité intraspécifique en ce qui concerne l'aptitude à fixer N_2 est bien connue depuis longtemps chez les légumineuses (CALDWELL & VEST, 1977; HEICHEL & VANCE, 1983; GRAHAM, 1984). Mais il semble que jusqu'à présent, on n'ait pas attaché assez d'importance à la variabilité intraspécifique que les plantes fixatrices d'azote peuvent présenter en ce qui concerne leur aptitude à assimiler l'azote du sol. Cette variabilité a été rapportée récemment par PHILLIPS *et al.* (1986), qui ont observé que, chez certaines lignées de *Cicer arietinum* et *Vigna unguiculata*, le pourcentage de N provenant du sol pouvait varier entre 30 et 190 % dans 4 graines. Malheureusement cette étude diffère de la nôtre par le fait qu'elle porte seulement sur les graines et non sur l'ensemble du végétal. Il est donc probable que les pourcentages considérés par PHILLIPS *et al.* sont la résultante de deux processus distincts : l'absorption de N du sol et distribution de N dans les différentes parties de la plante.

Lorsque les clones α et β sont inoculés, on remarque, en outre, qu'ils utilisent mieux N du sol, probablement (mais peut être pas exclusivement) grâce à une extension de leur système racinaire. Cet effet de l'inoculation a pour conséquence d'entraîner une surestimation parfois importante de fixation de N_2 lorsqu'elle utilise la méthode de la différence (DOMENACH & CORMAN, 1985). C'est pourquoi, il est indispensable de faire appel à une méthode isotopique pour évaluer le potentiel fixateur d'un arbre.

Pour identifier les individus caractérisés à la fois par un bon potentiel fixateur de N_2 et une productivité élevée sur le plan de la biomasse, il est donc en principe nécessaire de déterminer :

(i) Le potentiel fixateur de N_2 en utilisant une méthode isotopique, les résultats obtenus ici montrant qu'il n'y a pas de différence significative entre la méthode directe et la méthode de la valeur A.

(ii) La biomasse des plantes inoculées exprimée en N total, celle-ci reflétant à la fois le potentiel fixateur de N_2 et l'aptitude de l'arbre à utiliser N du sol (fig. 1).

L'utilisation de ces deux critères n'est pas toujours facile si l'on cherche à effectuer un criblage rapide d'un nombre élevé d'individus. Puisqu'en pratique, la sélection des clones a pour objet l'accroissement de la production de biomasse, on peut se contenter de faire appel à deux critères simples «biomasse des plantes inoculées exprimée en N total» et «biomasse des nodules exprimée en poids sec et N total», le deuxième paramètre étant significativement ($P < 0,01$) lié au premier (coefficients de corrélation 0,873 et 0,912). La biomasse des nodules est aussi significativement ($P < 0,01$) liée à la quantité de N_2 fixé déterminée par la méthode de la valeur A (coefficient de corrélation 0,554 et 0,540). Lorsque la biomasse des nodules est exprimée en N total (et seulement dans ce cas) la corrélation avec la quantité de N_2 fixé déterminée par la méthode isotopique directe est moins étroite mais encore significative ($P = 0,03$) avec un coefficient de corrélation de 0,512. Par

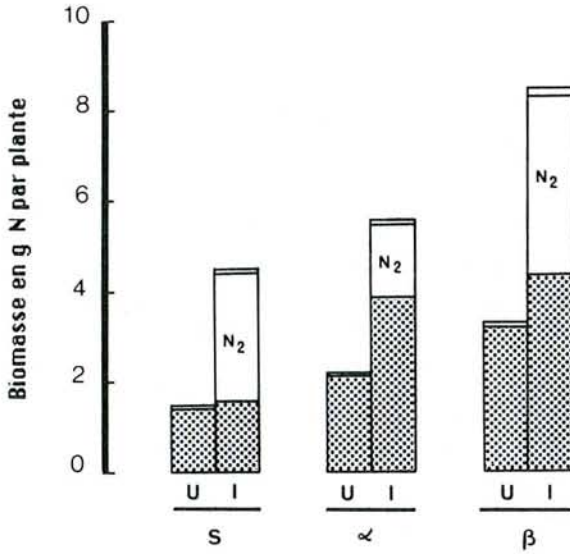


FIG. 1. — Biomasse (exprimée en g N par plante) des trois clones de *Casuarina equisetifolia* (S, α , β) 12 mois après leur transplantation. U: plants non inoculés; I: plants inoculés avec la souche de *Frankia* ORS 021001. La contribution du sol est représentée par les rectangles renfermant des points, celle de l'engrais azoté par les rectangles vides et celle de la fixation de N_2 par les rectangles avec l'indication « N_2 ». Cette figure a été établie à partir des résultats obtenus par la méthode de la valeur A. Ils auraient été légèrement, mais non significativement, différents si l'on avait fait appel à la méthode isotopique directe.

Fig. 1. — Biomass (expressed in terms of g N per plant) of the three clones of *Casuarina equisetifolia* (S, α , β) harvested 12 months after transplantation. U: uninoculated plants; I: plants inoculated with *Frankia* strain ORS 021001, N derived from soil is represented by rectangles with dots; N derived from nitrogen fertilizer by empty rectangles and N derived from N_2 fixation by rectangles with the indication « N_2 ». The graph was drawn from the A value data; it would have been slightly, but not significantly different, if the direct isotope method data had been used.

contre, lorsque la biomasse des nodules est exprimée en poids sec, la corrélation n'est pas significative. Cette remarque suggère qu'il serait préférable d'exprimer la biomasse des nodules en N total. Il en est de même pour la biomasse des plantes pour laquelle l'idéal serait de se fonder sur la détermination de N total. Des expériences conduites par ailleurs ont montré que, contrairement à ce qui a été suggéré pour *Alnus* (HUSS-DANELL, 1980), le paramètre « hauteur » ne peut être substitué au paramètre « biomasse ».

Si l'on utilise le critère « biomasse des nodules », il est nécessaire de recourir, pour l'inoculation, à la même souche de *Frankia*. On peut toutefois objecter à cette façon de procéder le fait qu'il peut y avoir des interactions différentes entre les souches de *Frankia* et les clones, problème qui mériterait d'être exploré ultérieurement.

Il est probable que la sélection des clones sur la base des critères « biomasse totale des plantes » et « biomasse des nodules » pourrait être effectuée à un stade

- HAUCK R. D. & WEAVER R. D. (Eds), 1986. — *Field measurement of dinitrogen fixation and denitrification. Soil Science Society of America*, Madison, Wisconsin.
- HEICHEL G. H. & VANCE C. P., 1983. — Physiology and morphology of perennial legumes. In: *Nitrogen fixation; legumes*, vol. 3, BROUGHTON W. J. éd., Clarendon Press, Oxford, 99-143.
- HEWITT E. J., 1966 - *Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical communication n. 22. Commonwealth Agricultural Bureaux*, London.
- HUSS-DANELL K., 1980. — Nitrogen fixation and biomass production in clones of *Alnus incana*. *New Phytol.*, **85**, 503-511.
- LALONDE M. & CALVERT H. E., 1979. — Production of *Frankia* hyphae and spores as an infective inoculant for *Alnus* species. In: *Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests* GORDON J. C., WHEELER C. T. & PERRY D. A., (ed.), Oregon State University. Corvallis, Oregon, 95-110.
- PHILLIPS D. A., JONES M. B. & FOSTER K. W., 1986. — Advantages of the nitrogen-15 dilution techniques for field measurements of dinitrogen fixation in legumes. In: *Field measurement of dinitrogen fixation and denitrification*. HAUCK R. D. & WEAVER R. W., eds., *Soil Science Society of America*, Madison, Wisconsin, 11-21.
- RENNIE R. J. & RENNIE D. A., 1983. — Techniques for quantifying N_2 fixation in association with non legumes under field and greenhouse conditions. *Can. J. Microbiol.*, **29**, 1022-1035.
- SOUGOUFARA B., DUHOUX E., CORBASSON M. & DOMMERGUES Y., 1986. — Amélioration de la fixation d'azote chez le filao (*Casuarina equisetifolia*) par sélection clonale. *Bois & Forêts des Tropiques*, **211**, 47-51.
- SOUGOUFARA B., DUHOUX E., CORBASSON M. & DOMMERGUES Y., 1987. — Improvement of nitrogen fixation by *Casuarina equisetifolia* through clonal selection. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, **1**, 129-132.
- TREMBLAY F. M., NESME X. & LALONDE M., 1984. — Selection and micropropagation of nodulating and non-nodulating clones of *Alnus crispa* (Ait.) Pursch. *Plant Soil*, **78**, 171-179.

CONCLUSIONS

Les stratégies d'amélioration de la productivité des arbres reposent, comme chez les plantes cultivées annuelles, sur une amélioration génétique des individus et également sur l'utilisation de méthodes culturales adaptées. Ce qui diffère chez les ligneux, c'est tout d'abord, la durée de vie de la plante qui peut être parfois considérable et ensuite, la grande variabilité génétique naturelle qui existe dans les peuplements, par suite d'une hétérozygotie très prononcée.

L'amélioration des systèmes symbiotiques est complexe car elle résulte de l'association des meilleurs gènes de la bactérie et de la plante hôte pour la nodulation et la fixation de N_2 et la quantité de biomasse végétale produite. Or, on constate que, pour les différentes associations symbiotiques (symbioses Légumineuse-Rhizobium et plantes actinorhiziennes), l'étude du partenaire végétal a été longtemps délaissée au profit de celle du microorganisme. Notre travail, résumé dans ce mémoire, prend en compte la présence des deux partenaires de la symbiose et propose une approche méthodologique de l'amélioration de la productivité du *Casuarina* fondée sur l'exploitation de la variabilité génétique naturelle à la fois de la plante hôte et du microorganisme associé (*Frankia*, champignons ectomycorhiziens).

LA VARIABILITE GENETIQUE NATURELLE ET SON EXPLOITATION

Les preuves moléculaires de ces dernières années ont permis de démontrer l'importance du rôle de la plante hôte à toutes les étapes de la symbiose. Actuellement, on connaît plus de 45 gènes de plante hôte directement impliqués dans la nodulation et la fixation de N_2 chez les Légumineuses (Vance et al., 1988) et on peut penser qu'il en est de même chez les plantes actinorhiziennes. Les observations agronomiques constatées depuis longtemps chez les Légumineuses herbacées (soja par exemple) et celles que nous avons réunies pour *Casuarina equisetifolia* soulignent clairement une grande variabilité naturelle dans la potentialité de fixer N_2 . Pour les plantes herbacées annuelles de nombreux essais au champ accompagnés de programme d'hybridation sont nécessaires pour conserver les caractères génétiques observés. En ce qui concerne

le matériel ligneux qui nous préoccupe, la sélection clonale constitue une voie privilégiée de conservation des individus sélectionnés à cause 1) du caractère pérenne du matériel, 2) de la faible densité (500 à 3.000 plants/ha) qui rend plus économique la multiplication végétative des individus sélectionnés.

Afin de pouvoir expérimenter sur du matériel homogène, nous avons mis au point des techniques de micropropagation tant sur les sujets juvéniles que sur les arbres âgés, car ces techniques présentent de nombreux avantages sur les méthodes conventionnelles de propagation. Tout d'abord, cette technique de propagation conforme peut être utilisée pour une multiplication en masse puisqu'elle permet une très grande augmentation du nombre de plantes génétiquement identiques, copiées à partir d'un seul plant mère. Ensuite, elle nécessite peu d'espace et peut être programmée indépendamment des saisons. La sélection d'individus supérieurs matures et leur multiplication par micropropagation à l'aide des IFIs devrait permettre ainsi la production massive et régulière de plants de qualité caractérisés par un pouvoir fixateur élevé.

La fixation de N_2 est liée à la présence de souches spécifiques du microorganisme et l'inoculation des *Casuarina* par les *Frankia* est nécessaire lorsque les microorganismes sont absents dans le sol. Elle assure alors une bonne installation et un développement satisfaisant des plantes. Nous avons montré également que l'on peut améliorer considérablement la réponse des plantes à l'inoculation en faisant appel à la technologie fondée sur l'utilisation des microorganismes inclus dans une matrice polymérique. On peut penser d'ailleurs, qu'à l'avenir l'utilisation d'inoculum avec certaines souches de microorganismes pourrait accroître non seulement la fixation de N_2 et la croissance des plantes, mais aussi renforcer leur résistance aux parasites et pathogènes.

CHOIX DES CRITERES DE SELECTION

En partant de l'idée que la sélection clonale de la plante hôte de *Casuarina equisetifolia* devait tout d'abord tenir compte de son aptitude à fixer N_2 en association avec *Frankia*, nous avons comparé différents clones (α , β , S et L) et mesuré leur aptitude à fixer N_2 en faisant appel à la méthode de l'activité réductrice

d'acétylène (ARA), à la méthode de culture sur un milieu sans N, à la méthode par différence et à la méthode isotopique. Parallèlement, nous avons déterminé la quantité de N du sol absorbé par la plante et la biomasse totale. Cette étude a abouti aux quatre conclusions suivantes :

- 1) Il existe effectivement une grande variabilité dans l'aptitude à fixer N_2 chez les différents clones ;
- 2) Il existe en outre, une grande variabilité dans l'aptitude des clones à absorber N du sol ;
- 3) Il n'y a pas nécessairement une corrélation positive entre ces deux caractéristiques ;
- 4) Il n'y a pas d'interaction significativement forte entre les combinaisons souches de *Frankia* et clones.

Il en résulte que pour sélectionner les *Casuarinas* on peut faire appel à trois types de critères i) le premier qui prend en compte le potentiel fixateur de N_2 , ii) le second qui tient compte du potentiel fixateur de N_2 et de l'aptitude à utiliser N combiné du sol, iii) le troisième qui tient compte de la meilleure combinaison clone x souche de *Frankia*. On pourrait également ajouter dans les travaux à venir, la recherche d'une forte tolérance de la symbiose à l'égard de N du sol, qui réduit la nodulation et réprime la fixation dans les forêts installées depuis plusieurs années.

CHOIX D'UNE STRATEGIE D'AMELIORATION DE LA PRODUCTIVITE DU CASUARINA

L'absence d'interaction forte (le classement des clones n'est pas modifié par la présence des souches et réciproquement) entre la plante hôte du *Casuarina* et les souches de *Frankia* utilisées facilite la mise au point d'une stratégie d'amélioration. Dans un premier temps, les meilleurs individus de la plante hôte sont d'abord sélectionnés en exploitant la variabilité naturelle de leur potentiel fixateur de N_2 . Le choix d'une souche très effective du *Frankia* n'intervient que dans un second temps.

En définitive, une première stratégie pourrait être la suivante :

- 1) Un premier ciblage d'individus, fondé sur le contrôle du potentiel fixateur de N_2 en utilisant une souche efficiente de *Frankia* ; les graines provenant d'une ou de plusieurs provenances. Les mesures de fixation de N_2 sont réalisées en utilisant la méthode de l'ARA, qui a l'avantage d'être rapide et peu coûteuse, mais ne peut être utilisée que sur des plantes encore jeunes (6-7 mois) et la méthode de culture sur milieu sans azote.
- 2) Les individus retenus sont multipliés par bouturage, technique simple et efficace sur des jeunes *Casuarinas*. Un deuxième criblage sur les mêmes clones, fondé sur le contrôle de l'aptitude à fixer N_2 , est réalisé à partir de la méthode d'abondance isotopique ^{15}N dans des conditions expérimentales au champ, ou en stimulant les conditions au champ pour la méthode de dilution isotopique. Elle a pour but de déterminer les caractéristiques physiologiques (% azote provenant du sol et de l'air) des différents clones.
- 3) Une étude des combinaisons "souches x clones" les plus efficientes permet d'identifier les meilleures d'entre elles.
- 4) Enfin, on procède à la multiplication des arbres d'élite par micropropagation des IFIs et à leur inoculation par des souches sélectionnées de *Frankia*, appliquées selon la technologie des inoculums matriciels.

La stratégie d'amélioration que nous proposons repose uniquement sur des arguments physiologiques. Il serait nécessaire de les intégrer dans un véritable schéma d'amélioration reposant sur des bases génétiques et en prenant les précautions d'usage de la sylviculture multiclonale. Nous sommes néanmoins conscients que la sélection sur le seul phénotype, ne permet d'apprécier, ni les aptitudes génétiques transmissibles des individus sélectionnés, ni la variation des caractères interagissant avec les conditions de l'environnement.

Toutefois, compte-tenu de la simplicité de la méthode, fondée sur l'absence d'interaction forte entre les deux symbiotes, et des gains de productivité obtenus à faible coût, nous espérons que nos résultats pourront être utilisés dans les futurs programmes de reboisement des pays tropicaux.

NOM DE L'ETUDIANT : SOUGOUFARA Bassirou

NATURE DE LA THESE :

La fixation de N_2 par les Camarinas :
amélioration par sélection clonale et
quantification par différentes méthodes.

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le 10 SEP. 1990 n° 1784

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I



TITRE

LA FIXATION DE N_2 PAR LES CASUARINAS : AMELIORATION PAR SELECTION CLONALE ET QUANTIFICATION PAR DIFFERENTES METHODES

RESUME

La symbiose *Casuarina* - *Frankia* a été étudiée au Sénégal dans les conditions expérimentales au laboratoire et au champ avec pour objectif l'amélioration de la potentialité fixatrice de N_2 de cette association symbiotique. Nos recherches ont porté d'une part sur les microorganismes symbiotiques racinaires (*Frankia* et champignons ectomycorhiziens) et d'autre part sur la plante hôte.

En ce qui concerne *Frankia*, il existe deux groupes de souches.

(i) Le groupe des souches à spectre large qui nodulent à la fois les plantes du genre *Allocasuarina* et celle du genre *Casuarina*.

(ii) Le groupe des souches à spectre restreint qui nodulent seulement les *Casuarina*.

Dans le cas de la symbiose *Casuarina equisetifolia* - *Frankia* plus particulièrement étudiée ici, les souches utilisées appartiennent au deuxième type. L'exploitation de la variabilité de ces souches nous a permis de sélectionner une souche ORS021001 (syn : Cj.1.82) particulièrement effective.

En ce qui concerne les Casuarinacées, il existe une grande variabilité dans l'aptitude à fixer N_2 pour une souche de *Frankia* donnée. Pour exploiter cette variabilité naturelle génétique de la plante hôte, nous avons proposé la stratégie suivante d'amélioration de la potentialité fixatrice de N_2 et de la productivité en sol carencé en N de *Casuarina equisetifolia* :

(i) En premier lieu on effectue un criblage d'individus d'arbres juvéniles, ce criblage étant fondé d'une part sur la détermination de la biomasse des nodules en faisant appel à la méthode de réduction à l'acétylène (ARA), la méthode par différence (TND), à la méthode isotopique (ID et AV) et d'autre part sur la mesure de la biomasse des plantes entières exprimée en poids sec et en N total.

(ii) Ensuite les individus d'arbres sélectionnés sont multipliés végétativement par des techniques de micropropagation à partir de fragments de rameaux photosynthétiques (individus jeunes) ou d'inflorescences femelles immatures (IFI) (individus âgés).

(iii) Les clones ainsi obtenus sont enfin inoculés avec des souches de *Frankia* sélectionnées en fonction de leur efficacité, l'inoculation étant faite avec un inoculum polymérique.

MOTS-CLES

Casuarinas, Fixation de N_2 , Quantification, Sélection clonale, *Frankia*