

1876

-1039

MYCORRHIZES ET FIXATION D'AZOTE

par

Y. DOMMERMUES

RESUMEN

MICORRIZAS Y FIJACION DE NITROGENO

Nuestros actuales conocimientos sobre la fijación no simbiótica del N_2 en la micorrizosfera son todavía rudimentarios. Efectivamente sólo se han aislado algunas de las bacterias responsables de la fijación. Por otra parte, las evaluaciones de actividad fijadora publicadas están, en buena parte, oscurecidas por errores metodológicos graves.

Nuestros conocimientos actuales se resumen en el hecho de que ciertas plantas micorrizadas no fijan nitrógeno, mientras que otras, por el contrario, sí lo fijan, aunque parece ser que débilmente. En estas circunstancias parece necesario continuar con investigaciones sistemáticas a fin de establecer un inventario de la actividad fijadora de nitrógeno del mayor número posible de plantas micorrizadas, creciendo en condiciones climáticas y edáficas diversas.

En el caso de que mediante tales investigaciones sea posible descubrir la existencia de sistemas micorrizicos con actividad fijadora significativa, se podrá emprender el estudio del aumento de eficiencia de la asociación entre los hongos micorrizicos y las bacterias fijadoras de N_2 .

Otra vía, que nos parece especialmente prometedora, consistiría en el estudio de asociaciones de tres: la planta, un simbiote fijador de N_2 (*Rhizobium* o actinomiceto), y un hongo endo- o ecto-micorrizico conocido por su capacidad para mejorar la nutrición mineral de la planta huésped. Este tipo de asociación tripartita existe: se la conoce en el caso del aliso que puede albergar ecto-micorrizas (Mejstrik y Benecke, 1969) o en el de las *Casuarina*, que parece albergar endo-micorrizas (Dommergues, 1963).

Igualmente se conoce la existencia de asociaciones entre leguminosas noduladas por *Rhizobium* y ciertos hongos micorrizicos (por ejemplo, Safir et al., 1971). Tales asociaciones de tres presentan la ventaja de facilitar considerablemente la implantación y el crecimiento de las plantas, leñosas o no, en los suelos pobres en nitrógeno y en elementos minerales (Bowen, 1973).

INTRODUCTION

De nombreuses observations au champ suggèrent que les champignons mycorrhiziens améliorent la nutrition azotée des arbres. Bien plus, il a été constaté que certaines espèces forestières mycorrhizées peuvent améliorer la nutrition azotée d'autres espèces forestières, l'effet étant

25 AVR. 1978

O. R. S. I. O. M.

Collection de Références

B 9114 Bio Sol

comparable à l'apport d'une fumure minérale azotée. A titre d'exemple, citons l'effet favorable de *Pinus silvestris* sur des plants de *Fraxinus americana*, de *Pinus radiata*, sur des plants de *Cupressus macrocarpa* et *Chamaecyparis lawsonia*, de *P. toeda* ou *P. elliotii*, sur *Araucaria cunninghami* (Voigt, 1971).

Malheureusement, le mécanisme de ces effets bénéfiques des mycorrhizes sont inconnus. On ne peut émettre que des hypothèses (Voigt, 1971):

- 1) Accélération de la minéralisation de l'azote organique dans le sol (Lundeberg, 1970).
- 2) Amélioration de l'absorption par la plante-hôte de l'azote sous forme minérale et organique (Schramm, 1966).
- 3) Amélioration de la synthèse des protéines chez la plante-hôte (Krupa et al., 1973).
- 4) Fixation de N_2 chez les plantes mycorrhizées, qu'il s'agisse d'ecto ou d'endomycorrhizes.

C'est l'analyse de cette dernière hypothèse qui fait l'objet de la présente conférence.

I. AGENTS DE FIXATION DE N_2 DANS LA MYCORRHIZOSPHÈRE

La première question qui se pose est de savoir si la fixation de N_2 est le fait de champignons mycorrhiziens eux-mêmes ou bien si elle est le fait de bactéries associées de la mycorrhizosphère.

Avant de répondre à cette question, nous devons préciser la notion de la mycorrhizosphère. Par mycorrhizosphère (Marx, 1972; Rambelli, 1973), on entend la rhizosphère des racines mycorrhizées. Cette zone privilégiée héberge une population de microorganismes saprophytes fongiques ou bactériens, en général plus abondante que le sol témoin, éloigné des mycorrhizes. Tribunskaya (1955) a dénombré 10 fois plus de champignons dans la rhizosphère de jeunes pins mycorrhizés que dans celle de pins témoins non mycorrhizés.

En ce qui concerne l'ultrastructure de la mycorrhizosphère, les travaux de Foster et Marks (1967) nous apportent des précisions intéressantes dans le cas de *Pinus radiata*. C'est la zone extérieure du manteau qui est la plus riche en bactéries, la densité de ces microorganismes étant 16 fois plus élevée dans ce site qu'à la périphérie de la région rhizosphérique. Le tabl. 1 dû à Neal et al. (1964) montre que la composition des populations bactériennes dépend de l'espèce de champignon mycorrhizien impliqué dans l'association avec le sapin de Douglas. Quant à la distribution des microorganismes libres de la mycorrhizosphère, elle est très hétérogène; d'après Bowen et Rovi-

ra (1973), le pourcentage de la surface des racines couverte par des cellules bactériennes ou fongiques est de l'ordre de 15 % seulement dans le cas de *Pinus radiata*.

On pourra trouver d'autres exemples d'effet mycorrhizosphère dans des revues récentes de Marx (1972) et Rambelli (1973). On a isolé la mycorrhizosphère des espèces bactériennes fixatrices d'azote, notamment des *Azotobacter* (Silvester et Bennett, 1973; Bauzon, 1974, communication personnelle), *Beijerinckia* et *Clostridium* (Richards, 1973). Mais il s'agit-là de recherches préliminaires et il est vraisemblable que de nombreuses autres espèces bactériennes fixatrices de N_2 sont susceptibles de coloniser la mycorrhizosphère.

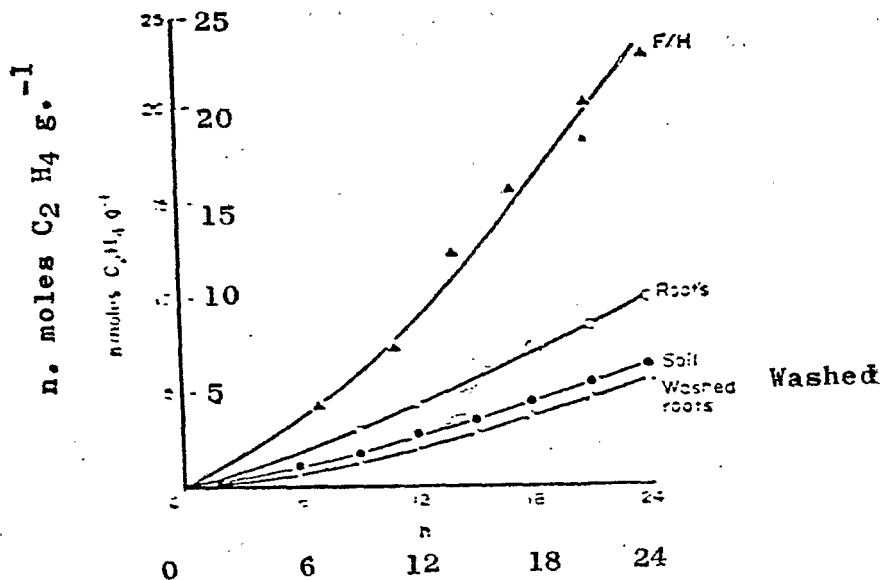


Fig. 1.—Fixation de N_2 mesurée par la réduction de l'acétylène en éthylène 1) par des racines excisées lavées ou non de *Dacrydium cupressinum*, 2) par le sol rhizosphérique sans racines, 3) par la litière F/H. (Silvester et Bennett, 1973).

Jusqu'à une date récente, on admettait que les champignons mycorrhiziens pouvaient fixer N_2 . Mais l'on sait maintenant que la propriété de fixer N_2 est strictement limitée aux procaryotes (Bowen, 1973; Postgate, 1974) et n'a jamais été montrée chez les champignons filamenteux. Il en résulte que si une racine mycorrhizée fixe N_2 , cette fixation ne devrait pas être imputée au champignon lui-même mais aux bactéries associées de la mycorrhizosphère.

L'expérience suivante, due à Silvester et Bennett (1973) étaye ce concept. Ces auteurs ont comparé la fixation de N_2 mesurée par la réduction de l'acétylène de 4 systèmes suivants (Fig. 1):

- racines mycorrhizées de *Dacrydium cupressinum* non lavées
- racines mycorrhizées de *Dacrydium cupressinum* lavées (c'est-à-dire débarrassées d'une partie de la microflore associée de la mycorrhizosphère)
- mélange des horizons F et H d'une litière de la même espèce forestière
- horizon minéral du sol correspondant.

Le lavage des racines provoque une chute de l'activité nitrogénasique, ce qui indique que celle-ci était localisée dans les cellules des bactéries de la mycorrhizosphère (la Fig. 1 montre, en outre, que la litière forestière considérée est le site d'une fixation plus active que la mycorrhizosphère elle-même; la possibilité de fixation de N_2 dans la litière a déjà été signalée dans l'introduction).

II. ACTIVITÉ FIXATRICE DE N_2 DES SYSTÈMES MYCORRHIZIENS

1. Rappel concernant la fixation non symbiotique de N_2

La fixation biologique de N_2 est le processus qui consiste dans la réduction enzymatique de N_2 (azote moléculaire) en azote ammoniacal: cette forme de N combiné (NH_3), appelée intermédiaire-clé, représente la fin de la réaction de fixation et le début de l'incorporation de l'azote fixé dans le squelette carboné. La différence essentielle entre le système biologique fixateur de N_2 et le système chimique réside dans le fait que les conditions optimales de la catalyse biologique correspondent à une pression de 0,2 à 1,0 atm de N_2 et une température de 30-35° C, alors que les conditions de la catalyse chimique sont très sévères: pression de 250-1.000 atm de N_2 et température de 450° C (Hardy et Knight, 1968).

Les recherches effectuées à l'échelle moléculaire ou cellulaire nous renseignent avec précision sur les mécanismes intimes de la fixation de N_2 ; elles permettent, en outre, de prévoir les caractéristiques des habitats qui, *in situ*, doivent *a priori* être le siège d'une fixation non symbiotique de N_2 particulièrement active. C'est ainsi qu'on peut penser que sera favorable à la fixation hétérotrophe tout habitat ou micro-habitat:

- où des substrats énergétiques utilisables par la microflore bactérienne fixatrice libre sont disponibles (la fixation de N_2 est une réaction endergonique)
- où la teneur en O_2 est faible ou nulle
- où la teneur en azote combiné est réduite.

L'expérience confirme l'existence de tels habitats favorables à la fixation hétérotrophique non symbiotique de N_2 , par exemple la rhizosphère du riz.

En ce qui concerne l'aspect quantitatif de la fixation non symbiotique de N_2 , de nombreux auteurs sont parvenus à la conclusion que celle-ci était négligeable, leur conviction se fondant sur les considérations suivantes :

1) *La quantité de substrats énergétiques disponible dans le sol est faible.* En fait, on connaît très mal actuellement le flux de substrats énergétiques provenant de la photosynthèse et parvenant aux microorganismes vivant dans la zone périracinaire. On discutera ce problème au paragraphe III. b, est donc pas encore possible de donner une réponse définitive à cette objection, que l'on tende actuellement à considérer que l'apport de substrats énergétiques microflore soit plus grande qu'on ne le supposait antérieurement.

2) *Le rendement de fixation de N_2 (N_2 fixé: hydrates de carbone consommés) faible: 1 à 2.% seulement, d'où forte consommation de substrat énergétique.* En on a montré (O'Toole et Knowles, 1973) que ce rendement pouvait s'élever à 3 % de la teneur en substrat est faible, ce qui est le cas de la rhizosphère, en particulier, où l'approvisionnement en substrat semble se maintenir à un niveau assez bas.

TABL. 1

Densité absolue et relative des Streptomycètes et densité absolue des bactéries et des champignons dans des rhizosphères de Pseudotsuga menziesii dotées de systèmes mycorrhiziens différents (Neal et al., 1964)

Type de rhizosphère et de mycorrhize	Streptomycètes		Bactéries et actinomycètes (Densité absolue en millions)	Champignons (Densité absolue en milliers)
	Densité absolue en millions	Densité relative ‰		
Mycorrhizes jaunes....	10,0	3,1	325,0	64,0
Mycorrhizes blanches..	1,2	1,5	83,8	162,0
Mycorrhizes grises.....	5,3	2,6	206,0	200,0
Racines subérisées	24,2	13,2	183,0	183,0
Sol non rhizosphérique.	1,3	20,4	6,3	238,8
Plus petite différence significative ($P=0,05$)..	1,9		10,8	10,7

3) *En admettant que la quantité de substrats énergétiques disponibles pour la microflore soit relativement importante, les bactéries fixatrices de N_2 n'auraient accès qu'à une partie de ces substrats.* A l'appui de cette thèse, on a avancé que le nombre des microorganismes fixateurs de N_2 dans le sol et même dans la rhizosphère, était très faible: de l'ordre de 10^3 unités/g de sol sec. Or, les comptages conduits avec des méthodes modernes ont mis en évidence des nombres beaucoup plus élevés, de l'ordre de 10^6 unités/g de sol sec, dans certaines rhizosphères (Villemin et al., 1974). L'objection n'en reste pas moins sérieuse et, dans l'état actuel de nos connaissances, il n'est pas possible de trancher le débat.

4) *Le sol renferme souvent des quantités telles d'azote minéral que la synthèse de la N_2 ase par les bactéries fixatrices est réprimée.* En fait, cette objection est sans fondement dans la zone périracinaire, sauf dans le cas de fumures azotées élevées, car la teneur en azote minéral est faible dans cette zone, par suite de l'absorption active de cet élément par la plante.

En fait, ces conditions théoriques ne nous permettent pas de faire des prévisions quantitatives sur la fixation effective de N_2 dans les écosystèmes et en particulier dans la rhizosphère ou la mycorrhizosphère. C'est pourquoi il a été nécessaire d'entreprendre des recherches visant à déterminer directement la fixation globale de N_2 dans les systèmes considérés.

2. MESURE DE LA FIXATION GLOBALE DE N_2 DANS LA MYCORRHIZOSPHERE

Le premier type d'investigation qui vient à l'esprit lorsque l'on aborde le problème de la fixation de N_2 dans un écosystème consiste à effectuer des bilans de N. Ces bilans établis dans le cas de formations forestières ne renfermant pas ou peu de légumineuses ou non légumineuses fixatrices de N_2 , montrent des gains d'azote pouvant atteindre jusqu'à 50 kg/ha/an dans certaines formations de conifères (Richards, 1962, 1964). Même si l'on soustrait de ces apports ceux qui proviennent des pluies (3 à 10 kg en moyenne), l'enrichissement en azote des systèmes reste encore très élevé. Malheureusement, sauf exception, on ne connaît pas le ou les sites de la fixation de N_2 , qui peuvent être:

- la phyllosphère (par ex.: Emidsen et Harrelson, 1969; Jones, 1970)
- la litière (cf. fig. 1)
- la rhizosphère des plantes herbacées des sous-bois (Harris et Dart, 1973) ou la mycorrhizosphère.

En outre, l'interprétation des bilans est compliquée par le fait que dans certains cas (sols très profonds, notamment sols sableux), il est

probable que l'enrichissement mesuré de l'écosystème résulte de la concentration d'une partie des éléments nutritifs puisés en profondeur par les racines, qui sont concentrés dans les horizons de surface. Ce processus de distribution est difficile à déceler puisque les bilans d'azote des écosystèmes ne portent pas, en général, sur des profondeurs supérieures à 1 m (Jaiyebo et Moore, 1963).

La méthode des bilans ne permet pas de répondre à la question de savoir si les mycorrhizes jouent un rôle actif dans la fixation de N_2 . Une étude approfondie de la fixation de N_2 dans les systèmes mycorrhiziens doit recourir à des méthodes plus précises. Ces méthodes sont fondées soit sur la technique isotopique (^{15}N) soit sur la technique de réduction de l'acétylène en éthylène. Les mesures portent sur 4 types de systèmes mycorrhizés :

- a) racines excisées (par ex. : Silvester et Bennett, 1973)
- b) plantes entières extraites du sol (par ex. : Richards, 1973)
- c) plantes entières en pots
- d) plantes entières en place (par ex. : Balandreau et Rouquerol, 1974, communication personnelle).

En fait, la plupart des déterminations ont porté sur des racines excisées et nous verrons ultérieurement les inconvénients graves que présentent une telle façon d'opérer. Les résultats publiés à ce jour peuvent être classés en deux catégories (on a indiqué entre parenthèses par les lettres a, b, c ou d la nature du système utilisé pour la mesure lorsque celui-ci est connu).

1) *Résultats négatifs* : aucune fixation significative n'a pu être décelée. Il s'agit des systèmes impliquant les plantes appartenant aux genres ou espèces suivantes :

- *Pinus silvestris* : Bond et Scott, 1955 (c) ; Bond, 1967 (c).
- *Podocarpus* : Baylis, 1969 ; *Podocarpus rospigliosii* : Furman, 1970.
- *Pinus uncinata* : Balandreau et Rouquerol, 1974, communication personnelle (d).

2) *Résultats positifs* : Des résultats positifs ont été obtenus dans le cas de systèmes mycorrhiziens excisés (a) que nous avons comparé à des systèmes non mycorrhiziens et à un nodule de légumineuse (Tab. 2). Une série de résultats positifs a également été obtenue lors des mesures *in situ* dans le cas de *Picea excelsa*, par Rouquerol et Balandreau, 1974 (communication personnelle) ; mais les vitesses de fixation observées étaient faibles.

Ces différents résultats ne sont pas exempts de critiques relatives d'une part à la méconnaissance de l'influence des facteurs édaphiques

et climatiques, d'autre part à l'imperfection de la méthodologie employée, notamment en ce qui concerne les temps d'incubation des systèmes qui sont en général trop longs. Nous reviendrons sur ces deux points au paragraphe suivant.

TABL. 2

Comparaison de la vitesse de fixation de N_2 dans différents systèmes excisés: mycorrhizosphère, rhizosphère et nodule de légumineuse

Nature du système excisé	Durée d'incubation (heures)	Vitesse de Fixation $ng N_2$ fixé/ $g.h^{-1}$ (poûds frais)	Références
<i>Mycorrhizosphère</i> («nodules»)			
Podocarpus lawrencii.....	4	66	Bergersen et Costin, 1964
P. rospigliosii	24	183	Becking, 1965
Dadrydium cupressinum.....	30	8	Silvester et Benndti, 1973
<i>Rhizosphère</i>			
Stochys silvatica	> 24	36	Harris et Dart, 1978
<i>Nodule de légumineuse</i>			
Soja..	4	1300	Bergersen et Costin, 1965

Quoi qu'il en soit, en se fondant sur les données encore très insuffisante dont nous disposons à ce jour, nous pouvons admettre provisoirement:

1) que l'activité fixatrice de N_2 des mycorrhizosphères actuellement connues, est en général faible comparée à celle des systèmes symbiotiques bien connus ou à celle des systèmes rhizosphériques en sols engorgés (Balandreau et al., 1974) ou en milieux aquatiques (Knowles, 1975);

2) que cette activité varie considérablement d'un cas à l'autre, certains systèmes ne faisant preuve d'aucune activité, d'autres d'une activité décelable, mais dont la signification écologique n'a pas encore été clairement élucidée.

Bien entendu, au fur et à mesure du développement de nos connaissances sur la mycorrhizosphère, certaines différences entre ce système et le système rhizosphère apparaîtront. On peut déjà en prévoir deux types:

1) celles qui découlent du fait que la diffusion des exsudats racinaires dans le cas est ralentie par le manteau, les exsudats étant vraisemblablement utilisés en grande partie par le champignon mycorrhizien; celui-ci d'ailleurs pourrait aussi libérer des substances par exorption (effet hyphosphère);

2) celles qui découlent du fait que les mycorrhizes stimulent la production chez la plante-hôte de certains exsudats volatils (Krupa et Fries, 1971), de nature terpénique notamment, qui modifient l'activité et la composition des populations de microorganismes libres de la mycorrhizosphère.

III. PROBLÈMES SOULEVÉS PAR LES RECHERCHES SUR LA FIXATION DE N_2 DANS LA MYCORRHIZOSPHÈRE

1. *Problèmes de nature conceptuelle*

On a vu antérieurement que la fixation de N_2 dans la mycorrhizosphère était le fait de bactéries libres associées aux racines mycorrhizées. Il s'agit donc là d'un système très comparable au système rhizosphère. L'expérience acquise dans le domaine de la fixation de N_2 dans la rhizosphère de diverses plantes, notamment des graminées, peut nous guider dans le domaine qui nous intéresse ici. C'est pourquoi il nous paraît intéressant de rappeler ici quelques-uns des concepts fondamentaux qui découlent des recherches sur la rhizosphère et qui nous semblent applicables au cas de la mycorrhizosphère.

a) *La rhizosphère en tant que compartiment du système sol-plante-atmosphère*

Partant de l'idée que la rhizosphère constitue un compartiment du système complexe sol-plante-atmosphère, on peut, *a priori*, prévoir que l'activité des microorganismes dans cet habitat est commandée par l'ensemble des facteurs de l'environnement qui agissent sur le système (Balandreau et al., 1974-b). En d'autres termes, l'activité microbienne dans la rhizosphère devrait être régie :

- par des facteurs de l'environnement climatique, notamment humidité de l'air, température, radiation solaire, teneur en CO_2 ,
- par des facteurs de l'environnement édaphique, notamment : teneur du sol en eau et en oxygène, température du sol, teneur du sol en éléments assimilables par les plantes, présence de composés phytotoxiques.

Effectivement, de nombreux résultats expérimentaux confirment l'intervention de ces différents facteurs sur l'activité microbienne de la

rhizosphère, ce qui justifie le concept de rhizosphère, partie intégrante du système sol-plante-atmosphère.

Les facteurs climatiques agissent par l'intermédiaire de la plante, puisqu'i régissent, en particulier, la photosynthèse, la translocation et l'exsudation d'une fraction des produits de photosynthèse au niveau des racines. En d'autres termes, un flux d'énergie s'établit entre les organes photosynthétiques de la plante et les microorganismes de la rhizosphère. Nous reviendrons sur cette notion de flux au paragraphe suivant.

En ce qui concerne le mécanisme de formation des mycorrhizes, il y a lieu de souligner que la lumière n'intervient pas seulement dans le processus de photoassimilation mais aussi dans d'autres processus de biosynthèse tels que la synthèse de composés phénoliques, de caroténoïdes, d'acide abscisique, d'inhibiteurs de croissance (Slankis, 1973).

Le rôle des facteurs édaphiques était facilement prévisible, même en dehors du concept de systèmes sol-plante-atmosphère. C'est ainsi que l'on a vérifié *in situ* que l'application d'engrais minéraux azotés au sol réduisait considérablement la fixation libre de N_2 (Balandreau et Dommergues, 1972). Nous n'insisterons pas ici sur le rôle du sol, nous devons toutefois attirer l'attention sur l'importance de ces facteurs puisque ce sont ceux que l'agronome sait le mieux contrôler.

b) Flux d'énergie dans le système sol-plante-atmosphère

Les microorganismes de la rhizosphère étant, pour la plupart des organismes hétérotrophes, leur activité est liée à la fourniture d'énergie sous forme de composés organiques exsorbés par la plante. Or, cette fourniture de substrats que l'on désigne sous le terme de *flux d'énergie* a été mis expérimentalement en évidence 1) par des méthodes directes fondées sur l'emploi de traceurs dans le cas de systèmes stériles ou non, 2) par des méthodes indirectes fondées sur la mesure des variations d'une activité microbienne dans la rhizosphère lors de la modification de l'activité photosynthétique de la plante à la suite de différents traitements comme l'ombrage ou la coupe des parties aériennes.

De telles expériences ont permis de calculer 1) le temps nécessaire au transport du C fixé par la photosynthèse, depuis les feuilles jusqu'aux racines où il est exsudé (cf. par ex. Tabl. 3), 2) le temps écoulé entre la photosynthèse et l'utilisation des produits de photosynthèse par les microorganismes de la rhizosphère, utilisation qui se traduit par la respiration microbienne (Warembourg et Paul, 1973) ou d'autres processus tels que la fixation de N_2 , détectée par la réduction de l'acétylène en éthylène par les bactéries fixatrices de N_2 .

Il semble que le flux dont bénéficie la microflore rhizosphérique soit beaucoup plus considérable qu'on ne le supposait il y a encore quelques

années; en effet, certains auteurs admettent actuellement que la quantité totale de substrats carbonés (solubles, insolubles, volatils) fournis par la plante aux microorganismes de la rhizosphère peut représenter jusqu'à 10-20 % (ou même plus) de la quantité de composés photosynthétisés (cf. Balandreau et Fares-Hamad, 1975).

TABL. 3

Distribution des produits de photosynthèse marqués dans le système racinaire après une exposition de courte durée (pulse) des parties aériennes au $^{14}\text{CO}_2$ (Mac Dougall, 1968)

Temps écoulé après l'exposition (min.)	Radioactivité (coups/100 sec) dans les segments de racines à différentes distances à partir de la base des racines			
	0 - 1 cm	1 - 3 cm	3 - 5 cm	5 - 7 cm
45	0	0	0	0
60	5320	5070	0	0
75	15200	4150	0	0
90	8680	18800	12630	3540

On notera enfin que le système plante-sol-atmosphère n'est pas seulement le site d'un flux d'énergie mais qu'il est le site de flux gazeux —notamment d'un flux d'oxygène— qui s'établit entre les organes aériens de la plante et la rhizosphère elle-même, ce flux jouant un rôle particulièrement important dans l'approvisionnement en O_2 des microorganismes de la rhizosphère des plantes poussant dans les sols engorgés (ex. : riz).

c) Rythme et variations de l'activité microbienne dans la rhizosphère

En se fondant sur le concept précédemment défini, à savoir que la rhizosphère fait partie du système sol-plante-atmosphère, on peut prévoir que les variations journalières de la photosynthèse sont susceptibles d'entraîner des variations journalières de l'approvisionnement en énergie des microorganismes rhizosphériques, d'où l'apparition probable d'un rythme nyctéméral d'activité microbienne dans la rhizosphère. L'expérience a confirmé l'existence d'un tel rythme (Balandreau et al., 1974-a; Balandreau et Fares-Hamad, 1975). On a, en outre, montré qu'à ce rythme nyctéméral se superposaient des variations induites par des modifications des caractéristiques de l'environnement climatiques et édaphiques. Il en résulte que l'activité microbienne *in*

situ se présente sous la forme d'une succession de flushes d'activité d'intensité très variable (Balandreau et Dommergues, 1972).

d) *Déterminisme génératique de la composition et de l'activité des micropopulations rhizosphériques*

La plante ne fournit pas seulement des substrats énergétiques à la microflore rhizosphérique; elle libérerait en outre des composés susceptibles d'intervenir en tant qu'inducteurs ou répresseurs des enzymes microbiens (Macura, 1968). On peut penser que la production par la plante de ces divers composés qui orientent la composition quantitative et qualitative de la microflore rhizosphérique, est elle-même contrôlée par des caractères génétiques particuliers. La validité de ce concept a été vérifiée dans quelques cas seulement. C'est ainsi que Neal et al. (1970 et 1973) ont pu expérimentalement modifier la composition de la rhizosphère du blé en modifiant le génotype de la plante-hôte. De leur côté, Döbereiner et al. (1972) ont montré que des variétés de *Paspalum notatum* tétraploïdes hébergeaient dans leur rhizosphère une microflore fixatrice de N_2 plus active que les variétés diploïdes. L'intérêt majeur de ce concept réside dans le fait que la manipulation génétique du végétal pourrait constituer un moyen puissant de contrôle de l'activité microbienne dans la rhizosphère.

2. Problèmes méthodologiques

Les méthodes d'évaluation de l'activité fixatrice de N_2 actuellement utilisées sont souvent très imparfaites; pour être appliquées à l'étude des systèmes complexes qui nous intéressent, elles devraient présenter des qualités dont les plus importantes sont les suivantes:

- être sensibles et exemptes d'artefacts
- apporter le minimum de perturbation du système à étudier lors du prélèvement et lors de l'incubation
- tenir compte des variations journalières et saisonnières d'activité.

a) *Sensibilité et absence d'artefacts*

1) La détection de faibles augmentations de la teneur en azote de systèmes complexes (sols, écosystèmes sol-végétation, eaux) a été difficile, aussi longtemps qu'on n'a disposé que des méthodes Dumas ou Kjeldahl, bien que des modifications récentes (Rouquerol, 1964;

Rinaudo, 1970) aient amélioré considérablement la précision et la sensibilité de la méthode.

2) L'utilisation de l'azote $^{15}\text{N}_2$ —isotope stable de l'azote— a accru considérablement la sensibilité des mesures (la sensibilité est multipliée par 1.000 environ par rapport aux méthodes précédentes). Il s'agit, en outre, d'une méthode très sûre: en effet, l'enrichissement en ^{15}N d'un système mis en contact avec $^{15}\text{N}_2$ (moléculaire) prouve qu'on a affaire à un système fixateur de N_2 moléculaire, alors que les méthodes Dumas ou Kjeldahl ne permettent pas de distinguer N_2 moléculaire et N ayant une autre origine que l'atmosphère (N endogène du sol, par exemple). Mais cette méthode isotopique présente un inconvénient majeur: son prix de revient élevé, à la fois dans le domaine du fonctionnement et dans celui de l'équipement, qu'il s'agisse de spectromètre de masse ou de spectroscopie optique d'émission.

3) Méthodes indirectes. Ces méthodes, fondées sur la non-spécificité de N_2 ase vis-à-vis de différents substrats consistent à évaluer la vitesse de réduction des substrats de remplacement mis à la disposition des systèmes fixateurs à étudier. Le substrat de remplacement le plus utilisé actuellement est incontestablement C_2H_2 , le dosage du produit de réduction (C_2H_4) étant effectué par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à ionisation de flamme.

Les avantages de la méthode de mesure de vitesse de réduction de C_2H_2 sont les suivants:

- très grande sensibilité (10^3 fois la sensibilité de la méthode isotopique et 10^5 à 10^6 fois la sensibilité de la méthode Kjeldahl);
- simplicité;
- économie;
- rapidité;
- faible bruit de fond;
- non métabolisation de C_2H_4 .

Dans le cas de systèmes faiblement fixateurs, la méthode indirecte sur la réduction de l'acétylène est supérieure à la méthode isotopique; mais elle présente des inconvénients dont les deux principaux sont les suivants:

1) il peut y avoir interférence avec la production spontanée de C_2H_4 par divers champignons du sol (cf. par ex.: Lynch et Harper, 1974), cette production étant loin d'être négligeable dans certains sols forestiers puisqu'elle y est du même ordre de grandeur que la production de C_2H_4 résultant de la réduction de C_2H_2 par la N_2 ase (Balandreau, 1974; communication personnelle);

2) des processus physiques d'adsorption, de solubilisation ou de diffusion des gaz dans le sol peuvent perturber les mesures.

b) *Techniques de prélèvement et d'incubation non ou peu perturbatrices*

Le système fixateur à étudier est placé soit dans une enceinte étanche dans laquelle l'air est enrichi en $^{15}\text{N}_2$ ou C_2H_2 ; *in situ* la plante à étudier est recouverte d'une cloche où l'on injecte C_2H_2 avec un gaz marqueur (Balandreau et Dommergues, 1972).

Les techniques fondées sur l'utilisation de *racines excisées* sont très perturbatrices; il faut leur préférer les techniques fondées sur l'étude du *système complet* constitué par la plante entière et son substratum (sol ou modèle de sol).

Les trois dispositifs les moins perturbateurs actuellement en usage sont les suivants:

1) plantes cultivées en pot avec racines isolées de l'atmosphère (par ex.: Bond et Scott, 1965);

2) plantes extraites du sol avec un monolithe de sol comprenant la plus grande partie du système racinaire placées dans une enceinte de grande dimension (par ex.: La Rue, 1973, communication personnelle);

3) plantes *in situ* recouvertes par une cloche (Balandreau et Dommergues, 1972).

Lors de l'incubation des précautions doivent être prises pour simuler aussi rigoureusement que possible les conditions de l'environnement naturel en ce qui concerne notamment l'éclairage, la température et l'humidité atmosphérique. En outre, les temps d'incubation doivent être réduits au minimum pour éviter les artefacts tels que ceux qui résultent de l'installation d'une anaérobiose au niveau des racines (Bowen, 1973).

c) *Prise en compte des variations journalières et saisonnières*

Les mesures effectuées doivent être répétées dans une même journée et au cours de la saison de végétation pour tenir compte des variations, parfois considérables que nous avons signalées antérieurement.

Remarque.—Parallèlement aux recherches conduites sur le système «plante-mycorrhizes-sol», il est utile de faire appel à des modèles expérimentaux simplifiés: «plante + mycorrhizes + bactéries fixatrices + sol artificiel ou solution nutritive liquide». Mais l'interprétation des résultats devra être faite avec prudence car la nutrition de la plante et le développement des mycorrhizes et des hyphes et des cordons mycéliens dans les modèles expérimentaux peut être très différente dans ce qu'ils seraient dans les systèmes naturels.

IV. CONCLUSIONS

Nos connaissances actuelles dans le domaine de la fixation non symbiotique de N_2 dans la mycorrhizosphère sont encore rudimentaires. En effet, on a isolé seulement quelques unes des bactéries responsables de la fixation. D'autre part, les évaluations d'activité fixatrices publiées sont, pour une bonne part, entachées d'erreurs méthodologiques graves. Nos connaissances actuelles se résument au fait que certaines plantes mycorrhizées ne fixent pas N_2 , d'autres, au contraire, fixeraient N_2 mais, semble-t-il, faiblement. Dans ces conditions, il apparaît nécessaire de poursuivre des recherches systématiques tendant à établir un inventaire des activités fixatrices de N_2 chez le plus grand nombre possible de plantes mycorrhizées poussant dans des conditions climatiques et édaphiques diverses. Au cas où de telles recherches permettraient de découvrir l'existence de systèmes mycorrhiziens présentant une activité fixatrice de N_2 significative, on pourrait envisager l'étude de l'amélioration de l'efficacité des associations entre les champignons mycorrhiziens et les bactéries fixatrices de N_2 .

Une autre voie, qui nous semble particulièrement prometteuse, est celle qui consisterait à s'orienter vers l'étude de systèmes à trois partenaires: la plante, un symbiote fixateur de N_2 (*Rhizobium* ou *actinomycète*), un champignon endo- ou ecto-mycorrhizien connu pour son aptitude à promouvoir la nutrition minérale de la plante-hôte. Ce type d'association tripartite existe: on le connaît dans le cas de l'aune qui peut héberger des ectomycorrhizes (Mejstrik et Benecke, 1969) ou les *Casuarina* qui semblent héberger des endomycorrhizes (Dommergues, 1963). On connaît également bien l'existence d'associations entre les légumineuses nodulées par des *Rhizobium* et certains champignons mycorrhiziens (par ex.: Safir et al., 1971). De telles associations, comportant 3 partenaires, présenteraient l'avantage de faciliter considérablement l'installation et la croissance de plantes ligneuses ou non dans des sols pauvres en azote et en éléments minéraux (Bowen, 1973).

BIBLIOGRAPHIE

1. LIVRES

- BOULLARD, B. 1968. Les mycorrhizes. Masson, Paris.
CARSON, E. W., ed. 1974. The Plant root and its environment. University Press of Virginia, Charlottesville, 691.
HACSKAYLO, E., ed. 1971. Mycorrhizae. U. S. Government Printing Office, Washington, 255.
HARLEY, J. L. 1959. The Biology of Mycorrhiza. Leonard Hill, London, 233.

MARKS, G. C., KOZLOWSKI, T. T., ed. 1973. Ectomycorrhizae. Their Ecology and Physiology. Academic Press, New York and London.

2. REFERENCES

- BALANDREAU, J., DOMMERMUES, Y. 1972. Assaying nitrogenase C_2H_2 activity in the field. Bull. Ecol. Res. Comm. (Stockholm), 17, 247-254.
- BALANDREAU, J., FARES-HAWAD, I. 1975. Importance de la fixation d'azote dans la rhizosphère du riz. Colloque sur la Rhizosphère, 15-16 novembre 1974.
- BALANDREAU, J., MILLIER, C. R., DOMMERMUES, Y. 1974-a. Diurnal variations of nitrogenase activity in the field. Appl. Microbiol., 27, 662-665.
- BALANDREAU, J., RINAUDO, G., OUMAROV, M., DOMMERMUES, Y. 1974. Asymbiotic N_2 fixation in paddy soils. In «The Proceedings of the International Symposium on N_2 Fixation, Pullman» (sous presse).
- BAYLIS, G. T. S. 1969. Mycorrhizal nodules and growth of *Podocarpus* in nitrogen-poor soil. Nature, Lond., 223, 1385-1386.
- BECKING, J. H. 1965. Nitrogen fixation and mycorrhiza in *Podocarpus* root nodules. Plant and Soil, 23, 213-226.
- BOND, G. 1967. Fixation of nitrogen by higher plants other than legumes. A Rev. Pl. Physiol., 18, 107-126.
- BOND, G., SCOTT, D. G. 1955. An examination of some symbiotic systems for fixation of nitrogen. Ann. Bot., 19, 67-77.
- BOWEN, G. D. 1973. Mineral nutrition of ectomycorrhizae. Ectomycorrhizae. Their Ecology and Physiology» (G. C. Marks and T. T. Kozlowski, ed.), Academic Press, New York and London), 151-197.
- BOWEN, G. D., ROVIRA, A. D. 1973. Are modelling approaches useful in rhizosphere biology? Bull. Ecol. Res. Comm. (Stockholm), 17, 443-450.
- DÖBEREINER, J., DAY, J. M., DART, P. J. 1972. Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum*-*Azotobacter paspali* association. J. Gen. Microbiol., 71, 103-116.
- DOMMERMUES, Y. 1963. Distribution des *Azotobacter* et des *Beijerinckia* dans les principaux types de sol de l'Ouest africain. Ann. Inst. Pasteur, 105, 179-187.
- BERGENSEN, F. J., COSTIN, A. B. 1964. Root nodules on *Podocarpus laurencii* and their ecological significance. Aust. J. Biol. Sci., 17, 44-48.
- EDMISTEN, J. A., HARRELSON, M. A. 1969. Nitrogen fixation by epiphyllae et El Verde. Puerto Rico Nuclear Center, Rep. PRNC-129, 131-141.
- FOSTER, R. C., MARKS, G. C. 1967. Observations on the mycorrhizae of forest trees. II. The rhizosphere of *Pinus radiata* D. Don. Austral. J. Biol. Sci., 20, 915-926.
- FURMAN, T. E. 1970. The nodular mycorrhizae of *Podocarpus rospigliosii*. Am. J. Bot., 57, 910-915.
- HARDY, R. W. F., KNIGHT, E. Jr. 1968. The biochemistry and postulated mechanisms of N_2 fixation. In «Progress in Phytochemistry» (L. Reinhold, ed.), 387-469.
- HARRIS, D., DART, P. J. 1973. Nitrogenase activity in the rhizosphere of *Stachys silvatica* and some other dicotyledonous plants. Soil Biol. Biochem., 5, 277-279.
- JAIYEBO, E. O., MOORE, A. W. 1963. Soil nitrogen accretion under different covers in a tropical rain-forest environment. Nature, 197, 317-318.
- JONES, K. 1970. Nitrogen fixation in the phyllosphere of the Douglas Fir, *Pseudotsuga douglasii*. Ann. Bot., 34, 239-244.
- KNOWLES, R. 1975. Fixation d'azote moléculaire dans la rhizosphère des macrophytes aquatiques. Colloque sur la Rhizosphère, 15-16 novembre 1974.
- KRUPA, S., FRIES, N. 1971. Studies on ectomycorrhizae of pine. I. Production of volatile organic compounds. Can. J. Bot., 49, 1425-1431.

- KRUPA, S., FONTANA, A., PALENZONA, M. 1973. Studies on the nitrogen metabolism in ectomycorrhizae. I. Status of free and bound amino acids in mycorrhizal and non mycorrhizal root systems of *Pinus radiata* and *Corylus avellana*. *Physiol. Plant.*, **28**, 1-6.
- LESPINAT, P. A., BERLIER, Y. B. 1975. Les facteurs externes agissant sur l'excrétion racinaire. Colloque sur la Rhizosphère, 15-16 novembre 1974.
- LUNDEBERG, G. 1970. Utilisation of various nitrogen sources, in particular bound soil nitrogen, by mycorrhizal fungi. *Studia Forest. Suecica*, **79**, 95.
- LYNCH, J. M., HARPER, S. H. T. 1974. Formation of ethylene by a soil fungus. *J. Gen. Microbiol.*, **80**, 187-195.
- MACURA, J. 1968. Physiological studies of rhizosphere bacteria. In «The ecology of soil bacteria» (Gray et Parkinson, ed.), Liverpool University Press, 379-395.
- MARK, D. H. 1972. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **10**, 429-454.
- MCDUGALL, B. M. 1968. The exudation of C¹⁴-labelled substances from roots of wheat seedlings. *Trans. 9th Int. Congr. Soil Sci. (Adélaïde)*, **3**, 647-655.
- MEJSTRIK, V., BENECKE, U. 1969. The ectotrophic mycorrhizas of *Alnus viridis* (Chaix) D. C. and their significance in respect to phosphorus uptake. *New Phytol.*, **68**, 141.
- NEAL, J. L. Jr., ATKINSON, T. G., LARSON, R. I. 1970. Changes in the rhizosphere microflora of spring wheat induced by disomic substitution of a chromosome. *Can. J. Microbiol.*, **16**, 153-158.
- NEAL, J. L. Jr., BOLLEN, W. B., ZAK, B. 1964. Rhizosphere microflora associated with mycorrhizae of Douglas Fir. *Can. J. Microbiol.*, **10**, 259-265.
- NEAL, J. L. Jr., RUBY, J. R., RARSON, I., ATKINSON, T. G. 1973. Changes in rhizosphere populations of selected physiological groups of bacteria related to substitution of specific pairs of chromosomes in spring wheat. *Plant and Soil*, **39**, 209-212.
- O'TOOLE, P., KNOWLES, R. 1973. Efficiency of acetylene reduction (nitrogen fixation) in soil: effect of type and concentration of available carbohydrate. *Soil Biol. Biochem.*, **5**, 789-797.
- POSTGATE, J. R. 1974. Evolution within nitrogen-fixing systems. *Symposia of the Society for General Microbiology*, **24**, 263-292.
- RAMBELLI, A. 1973. The rhizosphere of mycorrhizae. In «Ectomycorrhizae. Their Ecology and Physiology» (G. C. Marks and T. T. Kozlowski, ed.), Academic Press, Inc. New York and London, 299-343.
- RICHARDS, B. N. 1962. Increased supply of soil nitrogen brought about by *Pinus*. *Ecol.*, **43**, 68-74.
- RICHARDS, B. N. 1964. Fixation of atmospheric nitrogen in coniferous forest. *Austral. Forest.*, **23**, 68-74.
- RICHARDS, B. N. 1973. Nitrogen fixation in the rhizosphere of conifers. *Soil Biol. Biochem.*, **5**, 149-152.
- RINAUDO, G. 1970. Fixation biologique de l'azote dans trois types de sols de rizières de Côte d'Ivoire. Thèse Doct. Ing., Fac. Sci., Montpellier.
- ROUQUEROL, T. 1964. Sur l'activité des fixateurs d'azote dans les sols du Delta de Camargue. Application d'une technique de mesure de capacité potentielle de fixation. *Ann. Agron.*, **15**, 599-617.
- SAFIR, G., BOYER, J. S., GEDERMANN, J. W. 1971. Mycorrhizal enhancement of water transport in soybean. *Science*, **172**, 581.
- SCHRAMM, J. R. 1966. Plant colonization studies on black wastes from anthracite mining in Pennsylvania. *Amer. Philosoph. Soc.*, **56**, 194.
- SILVESTER, W. B., BENNETT, K. J. 1973. Acetylene reduction by roots and associated soil of new zealand conifers. *Soil Biol. Biochem.*, **5**, 171-179.
- SLANKIS, V. 1973. Hormonal relationships in mycorrhizal development. In «Ectomycorrhizae» (G. C. Marks et T. T. Kozlowski, ed.), Academic Press, New York, 231-298.

- TRIBUNSKAYA, A. J. 1955. Investigations of the microflora of the rhizosphere of pine seedlings. *Mikrobiologia*, 24, 188-192.
- VILLEMEN, G., BALANDREAU, J., DOMMARGUES, Y. 1974. Utilisation du test de réduction de l'acétylène pour la numération des bactéries libres fixatrices d'azote. *Ann. Microb.* (sous presse).
- VOIGT, G. K. 1971. Mycorrhizae and nutrient mobilization. In «Mycorrhizae» U. S. Government Printing Office, Washington, 122-131.
- WAREMBOURG, F. R., PAUL, E. A. 1973. The use of $C^{14}O_2$ canopy techniques for measuring carbon transfer through the plant-soil system. *Plant and Soil*, 38, 331-345.

Recibido para publicación: 15-IV-75