

LA SYMBIOSE

Frankia - Casuarina Equisetifolia

Thèse de Doctorat d'Etat

soutenue le 5/11/84

par

Daniel GAUTHIER

pour obtenir le grade

de Docteur ès-Sciences

devant le jury composé de

Président

J. P. AUBERT

Rapporteur

P. GADAL

Directeur de Thèse

Y. DOMMERGUES

Examineurs

C. ELMERICH

J. TAVLITZKI

ASSESSMENT OF N₂ FIXATION BY CASUARINA EQUisetifolia
INOCULATED WITH FRANKIA ORS021001 USING ¹⁵N METHODS

D. GAUTHIER, H.G. DIEM, Y.R. DOMMERGUES
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET
TECHNIQUE OUTRE MER
B.P. 1386. DAKAR, SÉNÉGAL.

AND

F. GANRY
INSTITUT SÉNÉGALAIS DE RECHERCHES AGRICOLES
INSTITUT DE RECHERCHE AGRONOMIQUE TROPICALE
BAMBÉY, SÉNÉGAL.

oOoOoOoOoOoOo

Summary - Casuarina equisetifolia seedlings, uninoculated or with Frankia strain ORS021001 were grown for 4.5 months in pouches, then transplanted into 1 m³ concrete containers forming 1 m² microplots. Trees were harvested 6.5 months later when they were 11 months old. N₂ fixation was measured using three methods of assessment : the direct isotopic method, the A value method and the difference method. Estimations of N₂ fixation during the 6.5 months following transplantation were respectively 3.27, 2.31 and 3.07 g N₂ per tree. From these values it was calculated that about 40-60 kg N₂ would be fixed per ha in a year at normal densities of 10,000 trees ha⁻¹. The results of this experiment confirm that Frankia strain ORS021001 can be confidently recommended to inoculate casuarinas in the field. Means to improve nodulation and subsequently N₂ fixation by casuarinas are discussed.

INTRODUCTION

The outstanding ability of casuarinas to thrive in poor N-deficient soils is due to their association with Frankia, the symbiotic N_2 -fixing actinomycete forming nodules on their roots. Because of this characteristic, casuarinas can give a high yield of biomass, exploited as timber, firewood or charcoal in many tropical countries. Furthermore casuarinas are sometimes used in rotational agriculture to improve the N status of soil. Casuarinas are then planted in wasted, N-deficient soils, grown for 5-10 years, cleared for wood or charcoal, after which the land is planted with various crops, such as yams in New Guinea (Silvester, 1976) or non- N_2 -fixing trees such as Anacardium occidentale for the production of cashew nuts in India (J.C.C. Ottow, personal communication). The crops or forest plantations following casuarinas benefit from the soil N accretion resulting from the N_2 -fixing activity of the actinorhizal tree. Thus it is a primary task to evaluate the amount of N_2 actually fixed by field-grown casuarinas. Up to now, only two estimations have been published. The first one by Hannon, quoted by Silvester (1977), is related to a stand of Allocasuarina littoralis near Sydney, Australia. The litter fall was estimated as $29 \text{ t ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$. Since this litter contained 1%N, the N circulation rate in it was estimated to be $290 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$. Taking into account the fact that the N content of all the soils in the region was less than 0.1% it was assumed that at least 75 % of this N was recently fixed, thus suggesting a fixation rate of $218 \text{ kg N}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$.

The second estimation is related to a 13-year-old Casuarina equisetifolia stand established in the sand dunes of the Cap-Vert peninsula 30 km from Dakar (Dommergues, 1963). By comparing the soil and tree N content of a planted plot with the soil N content of an adjacent plot devoid of vegetation, the mean N_2 fixation rate was calculated to be ca 58 kg N_2 ha⁻¹ year⁻¹.

Since the results mentioned above are questionable because the methods of estimation are not the most reliable and since we wanted to check the effectiveness of recently isolated strain of Frankia ORS021001 (Diem et al, 1982), we decided to apply the ¹⁵N-tracer technique. We report here the results of a study to evaluate N_2 fixation by Casuarina equisetifolia inoculated with Frankia ORS021001 and growing in conditions very close to those encountered in the open field. This experiment covered a growth period of 6.5 months thus providing a basis for estimation of the annual N_2 fixation. Three different methods for measuring N_2 fixation were compared : the direct isotopic dilution method, the A value method and the difference method.

It is now well known that casuarina roots have symbioses not only with Frankia but also with ecto- (Bamber et al, 1980) or endomycorrhizal fungi (Rose, 1980 ; Diem et al, 1981) that help the trees scavenge mineral nutrients, especially P, thus enhancing nodulation and N_2 fixation (Diem and Gauthier, 1982). However this response to mycorrhizal infection occurs only when the soil content in available P is low (≤ 10 kg P ha⁻¹). Since the aim of the experiment reported here was not to study the effect of mycorrhizal fungi we added to the soil a relatively high level of P (30 kg P ha⁻¹) at the onset of the experiment and later N-free Hewitt (1966) solution so that the plant requirements in elements other than N were largely fulfilled, thus masking a possible effect of any mycorrhizal infection.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was conducted from July 1982 to May 1983 at the ORSTOM Bel Air Station in Dakar, Senegal, in twelve lm^3 concrete containers forming lm^2 microplots. The soil used was Bel Air soil, a typical sandy (93 % sand), neutral (pH 7.0) soil, with C and N contents of 0.3 and 0.025 % respectively (psamment ; vernacular name : Dior). The soil was carefully homogenized, introduced into the concrete containers and finally fumigated with methyl bromide.

Seeds of Casuarina equisetifolia harvested in the vicinity of Dakar were sown in sterile Bel Aire soil. When 1-month-old, the seedlings were planted into 5 x 25 cm polyethylene pouches filled with a mixture of vermiculite and sterile soil (1 : 5). Inoculation of the seedlings was performed by dipping their roots in a suspension of a 2-months-old culture of Frankia ORS021001 grown at 28°C in liquid QMOD medium (Lalonde and Calvert, 1979), the amount of Frankia inoculum brought to each plant being equivalent to 3 μg of proteins.

Plants were raised in the pouches for 3.5 months and then transplanted into the microplots with four plants per microplant, all of which received PK as K_2HPO_4 at the rate of 17 g m^{-2} .

Treatments. At transplantation time three treatments with four replications each were used as follows :

Treatment 1. No inoculation ; application of ^{15}N -labelled NH_4^+ - N at the rate of 2 g N m^{-2} (i.e., 0.5 g N plant^{-1}) as a solution of $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ containing 10.5 atom % ^{15}N excess.

Treatment 2. No inoculation ; application of ^{15}N -labelled NH_4^+ - N at the rate of 10 g N m^{-2} (i.e., 2.5 g N plant^{-1}) as a solution of $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ containing 1.9 atom % ^{15}N excess.

Treatment 3. Inoculation with Frankia ORS021001 ; application of ^{15}N -labelled fertilizer as in treatment 1.

Throughout their growth the plants were carefully irrigated. When the plants were 8 months old, they exhibited symptoms of an undefined nutrient deficiency which was eliminated following application of 1 liter of Hewitt (1966) N-free nutrient solution to each microplot every 2 weeks. Plants were harvested 6.5 months after transplantation to the microplots when they were 11 months old. Three out of the 16 plants in treatment 1 and three out of 16 plants in treatment 2 were found to bear nodules. These contaminated plants were discarded so that calculations were based on 13 plants instead of 16 in treatments 1 and 2.

Estimation of N₂ fixation. Shoots were divided into three fractions : cladodes, branchlets (diameter < 4 mm), and stems plus branches (diameter > 4 mm), dried to a constant weight at 60-70°C. The totality of each fraction was ground into 100 µm powder. Samples of each powdered fraction were analysed for total N and ¹⁵N. ¹⁵N analyses were carried out at the Seibersdorf Laboratory (IAEA) using Dumas' method (the combustion performed in this technique converts total N directly to N₂) and emission spectrometry. For each individual tree N and ¹⁵N values were calculated taking into account the weight, N and ¹⁵N contents of the different fractions of the tree (cladodes, branchlets, stems and branches).

As already indicated in the introduction N₂ fixation was assessed using three methods : the direct isotope dilution method (Bremmer, 1975 ; Fried and Middleboe, 1977; Vose et al., 1982), the A value method proposed by Fried and Broeschart (1975) and the difference method (Williams et al., 1977).

a. Use of the direct isotope dilution method

The percentage \bar{y} of the plant N derived from N₂ fixation was calculated according to the formula :

$$y = 1 - \frac{en}{e0}$$

$e0$ and en being the atom % ¹⁵N excess in non-N₂-fixing and N₂-fixing plants respectively.

The individual y values for each of the 16 N₂-fixing plants were calculated taking into account each of the en values

whereas e_0 was the average value for the non- N_2 -fixing trees.

If N was the total content of each N_2 -fixing tree, N_2 fixed per tree was :

$$Y = \frac{y \times N}{100}$$

b. Use of the A value method

In this modification of the isotope dilution method proposed by Fried and Broeschart (1975), the ^{15}N -labeled fertilizer is applied at a low rate to the N_2 -fixing plant but at a normal (higher) rate to the non- N_2 -fixing plant.

The A value method involves the assumption that, when confronted with different sources of N, the plant uptake is directly proportional to the amount of N available in each source, provided that this amount is measured in the same unit, designated A. This unit is expressed as fertilizer N equivalent :

$$\frac{\% \text{ N derived from fertilizer}}{\text{A value of fertilizer}} = \frac{\% \text{ N derived from } N_2 \text{ fixation}(y)}{\text{A value of } N_2 \text{ fixation}} =$$

$$\frac{\% \text{ N derived from soil}}{\text{A value of soil}}$$

The available amount of soil plus fixed N is determined using the N_2 -fixing plants :

$$A \text{ 'soil + fix' } = \frac{(100 - f_n) \times \text{fertilizer rate (} N_2 \text{-fixing plants)}}{f_n}$$

The available amount of soil N is determined using the non- N_2 -fixing plants :

$$A \text{ 'soil' } = \frac{(100 - f_o) \times \text{fertilizer rate (non-} N_2 \text{-fixing plants)}}{f_o}$$

and the A value for fixed N_2 is :

$$A \text{ 'fix' } = A \text{ 'soil + fix' } - A \text{ 'soil' }$$

fn and fo being the percentages of N derived from fertilizer in N₂-fixing and non-N₂-fixing plants respectively :

$$fn = \frac{en}{efn} \quad \text{and} \quad fo = \frac{eo}{efo}$$

en and eo being the atom % ¹⁵N excess in N₂-fixing and non-N₂-fixing plants respectively and efn and efo the atom % ¹⁵N excess in the fertilizer applied on N₂-fixing and non-N₂-fixing plants respectively.

The percentage y of the total plant N derived from N₂ fixation is calculated using the formula :

$$y = \frac{A \text{ 'fix' } \times fn}{\text{fertilizer rate (N}_2\text{-fixing plants)}}$$

We calculated the average A 'soil' value which was considered as a constant in our experiment. For each individual N₂-fixing (inoculated) plant, we calculated A 'soil + fix', A 'fix', y and finally the amount of N₂ fixed per plant :

$$Y = \frac{y \times N}{100}$$

where N was the total N content of each plant.

C. Use of the difference method

For each individual N₂-fixing plant (treatment 3), N₂ fixation was estimated to be the difference between the total N content of the harvested portion of each of these plants and the average total N content of harvested portion of uninoculated ones.

RESULTS

N₂ fixation by Casuarina equisetifolia

At transplantation time the seedlings were 4.5 months old, the height of inoculated seedlings was ca 30 cm and that of uninoculated ones was ca 25 cm. The mean N content of inoculated seedlings was $\leq 30 \text{ mg plant}^{-1}$. Thus N₂ fixation before transplantation was $\leq 30 \text{ mg plant}^{-1}$, which

is negligible in comparison to the amount of N_2 fixed after transplantation. Therefore N_2 fixation values presented hereafter are related to the 6.5 months following transplantation to the field. During this period of time N_2 fixation was 2.31 - 3.27 g N_2 fixed tree⁻¹, depending on the method of assessment (Table 2). If we assume that N_2 fixation would have been stabilized at this rate during the whole year following transplantation, extrapolation would give figures in the range of 4.26 to 6.04 g N_2 fixed plant⁻¹ year⁻¹.

Table 2 indicates that in 95 out of 100 times we can expect a large variation in the estimation of N_2 fixation since the related values lie within the range of 0.84 to 4.93 N_2 fixed plant⁻¹ if we take into account the highest and the lowest figures calculated from the three methods.

Nitrogen uptake from soil and fertilizer

The percentage of plant N derived from soil by N_2 -fixing plants was 42.5 or 56.9 % according to the method of assessment used (Fig. 1). The percentage of plant N derived from fertilizer was 4.1 - 8.8 % (lower application of fertilizer) and 26.1 % (higher application of fertilizer). The contribution of N fertilizer to plant nutrition was small probably because the percentage of utilization of N fertilizer remained low (27.12 - 31.26 %), a situation comparable to that reported for soybean and millet in other Senegalese soils (Ganry, unpublished data).

DISCUSSION

N_2 fixation by Casuarina equisetifolia

From the values on Table 2 it can be calculated that at normal planting densities for Casuarina equisetifolia i.e. 10, 000 trees ha⁻¹ (Kondas, 1983), and in the presence of 20 kg fertilizer N ha⁻¹, N_2 fixation would be in the range of 40-60 kg N_2 fixed ha⁻¹ year⁻¹. The three methods used led to N_2 fixation estimates not very different from each other. The ¹⁵N based estimates should be interpreted with caution since the methods used involve not only the

assumption that the N_2 -fixing plant takes up N from soil and added ^{15}N -labelled fertilizer in the same ratio, but also that the time courses of declining ^{15}N enrichment in N and of assimilation of N for the nodulated and non-nodulated treatments are the same (Witty, 1983). The difference based estimates differ somewhat from the ^{15}N estimates probably for the reason, suggested by Witty (1983), that the relative fertilizer uptake of non- N_2 -fixing and N_2 -fixing casuarinas differ, being 8.8 and 4.1 % respectively (Fig.1).

Further field experiments are required to improve the accuracy of the ^{15}N method used, especially by attempting to get more stable soil enrichment throughout the experiment (Witty, 1983).

In addition it would be desirable (1) to study more extensively the influence of plantation density on N_2 fixation taking into account the fact that in semi-arid conditions many plantations do not contain more than 2,000 trees ha^{-1} (Andeke-Lengui and Dommergues, 1983 ; Ataia, 1983) ; (2) to follow up the N_2 -fixing activity of aging plantations, this activity supposedly increasing up to 5-10 years of age, then decreasing with the progressive accumulation of N in the forest litter.

Variation in the N_2 -fixing potential of individual trees

This variation could not be attributed to the endophyte, since trees were inoculated with a pure strain of Frankia and contamination by external strains was unlikely. Nor could the variation be due to soil heterogeneity, because the soil was carefully homogenized before filling the microplots. Since table 1 shows that the total dry weight of trees was in the range of 363 to 687 g ($P = 0.05$), which indicates a heterogeneous growth, we assume that a large part of the variation in N_2 fixation was due to differences in individual tree growth. These differences were probably related (1) to the intrinsic genetic variability of the trees, which were all obtained from seeds and exhibited conspicuous differences in shape and color ; (2) to variations in the physiological state of the seedlings at

ability of the host-plant genotype. Attempting to explore this variability would probably be a fruitful approach to increasing N_2 fixation of casuarina stands.

Acknowledgments - We thank F. Cornet for setting up the experiment and the Soils Section of the joint FAO/IAEA Division, IAEA, Vienna and its Seibersdorf staff for its assistance in performing the ^{15}N analyses. We also thank Dr. Fried for revising the manuscript.

REFERENCES

- Andeke-Lengui M.A. and Dommergues Y.R. (1983) Coastal sand dune stabilization in Senegal. In Casuarina Ecology Management and Utilization (S.J. Midgley, J.W. Turnbull and R.D. Johnston, Eds), pp. 158-166. CSIRO, Melbourne.
- Ataia A. (1983) Casuarina oligodon in the Eastern Highlands Province-Papua New Guinea. In Casuarina Ecology Management and Utilization (S.J. Midgley, J.W. Turnbull and R.D. Johnston, Eds), pp. 80-87. CSIRO, Melbourne.
- Bamber R.K., Mullette K. and Mackowski C. (1980) Mycorrhizal studies. In Research Report 1977-1978, pp. 70-72. Forestry Commission of New South Wales, Sydney.
- Bremmer J.M. (1975) Use of nitrogen-tracer techniques for research on nitrogen fixation. In Biological Nitrogen Fixation in Farming Systems of the Tropics (A. Ayanaba and P.J. Dart, Eds), pp. 335-352. John Wiley, Chichester.
- Diem H.G. and Gauthier D. (1982) Effet de l'infection endomycorhizienne (Glomus mosseae) sur la nodulation et la croissance de Casuarina equisetifolia. Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Paris, 294, III, 215-218.
- Diem H.G., Gauthier D. and Dommergues Y.R. (1982) Isolement et culture in vitro d'une souche infective et effective de Frankia isolée de nodules de Casuarina sp. Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Paris 295, III, 759-763.
- Diem H.G., Gauthier D. and Dommergues Y.R. (1983) An effective strain of Frankia from Casuarina sp. Canadian Journal of Botany 61; 2815-2821.
- Diem H.G., Gueye I., Gianinazzi-Pearson V., Fortin J.A. and Dommergues Y.R. (1981) Ecology of VA mycorrhizae in the tropics : the semi-arid zone of Senegal. Oecologia Plantarum 2, 53-62.
- Dommergues Y.R. (1963) Evaluation du taux de fixation de l'azote dans un sol dunaire reboisé en filao (Casuarina equisetifolia). Agrochimica 105, 179-187.

- Duncan D.B. (1955) Multiple range and multiple F test. Biometrics 11, 1-42.
- Fried M. and Broeschart H. (1975) An independent measurement of the amount of nitrogen fixed by a legume crop. Plant and Soil 43, 707-711.
- Fried M. and Middelboe V. (1977) Measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop. Plant and Soil 47, 713-715.
- Hewitt E.J. (1966) Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition. Technical Communication n° 22. Commonwealth Agricultural Bureaux, London.
- Lalonde M. and 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 (J.C. Gordon, C.T. Wheeler and D.A. Perry, Eds), pp. 95-110. Forest Research Laboratory, Corvallis.
- Rose S.L. (1980) Mycorrhizal associations of some actinomycete nodulated nitrogen-fixing plants. Canadian Journal of Botany 58, 1449-1454.
- Silvester W.B. (1976) Ecological and economic significance of the non-legume symbioses. In Nitrogen Fixation (W.E. Newton and C.J. Nyman, Eds), pp. 489-506. Washington State University Press.
- Silvester W.B. (1977) Dinitrogen fixation by plant associations excluding legumes. In A Treatise on Dinitrogen Fixation (R.W.F. Hardy and A.H. Gibson, Eds), pp. 141-190. John Wiley, New York.
- Vose P.B., Ruschel A.P., Victoria R.L., Saito S.M.T. and Matsui E. (1982) ^{15}N as a tool in biological nitrogen fixation research. In Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture (P.H. Graham and S.C. Harris, Eds), pp. 575-592. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali.
- Williams W.A., Jones M.B. and Delwiche C.C. (1977) Clover N-fixation measurement by total N difference and ^{15}N A values in lysimeters. Agronomy Journal 69, 1023-1024.

Witty J.F. (1983) Estimating N_2 fixation in the field using ^{15}N labelled fertilizer : some problems and solutions. Soil Biology and Biochemistry 15, 631-639.

Caption for Figure 1.

Contribution of soil (S), fertilizer (F) and N_2 fixation (NF) to the N nutrition of Casuarina equisetifolia as assessed using direct isotope (left) and A value (right) methods.

Results expressed as g of N tree⁻¹ or as percentage of total N content of the trees. Numbers 1, 2 and 3 refer to the treatments as defined in the text.

Table 1. Influence of inoculation with *Frankia* ORS021001 on nodule weight, height, dry weight and N content of 11-month-old *Casuarina equisetifolia*⁽¹⁾

| Treatments ⁽²⁾ | Nodule weight (g tree ⁻¹) | Height (cm) | Dry weight (g tree ⁻¹) | | | | N content (%) | | | N total ₋₁ (g tree ⁻¹) |
|---------------------------|---------------------------------------|---------------|------------------------------------|--------------------------|----------------------------------|----------------|-----------------|--------------------------|----------------------------------|---|
| | | | Cladodes | Branchlets (diam. < 4mm) | Stems and branches (diam. > 4mm) | Total | Cladodes | Branchlets (diam. < 4mm) | Stems and branches (diam. > 4mm) | |
| 1 | 0 | 170 a ±22 | 151 a ±32 | 43 a ±13 | 100 a ±27 | 295 a ±70 | 0.86 a ±0.05 | 0.36 a ±0.02 | 0.30 a ±0.01 | 1.77 a ±0.45 |
| 2 | 0 | 192 ab ±20 | 204 ab ±58 | 66 b ±18 | 140 ab ±34 | 409 ab ±105 | 1.00 a ±0.09 | 0.39 a ±0.03 | 0.29 a ±0.04 | 2.71 a ±0.75 |
| 3 | 17 ±9 | 216 b ±21 | 260 b ±88 | 76 b ±20 | 188 b ±58 | 525 b ±162 | 1.30 b ±0.14 | 0.54 b ±0.05 | 0.40 b ±0.09 | 4.78 b ±1.90 |

(1) Mean values ± confidence interval (P = 0.05)

(2) Treatment 1: uninoculated trees with application of ¹⁵N-labelled fertilizer, 0.5 g N tree⁻¹

Treatment 2: uninoculated trees with application of ¹⁵N-labelled fertilizer, 2.5 g N tree⁻¹

Treatment 3: inoculated trees with application of ¹⁵N-labelled fertilizer, 0.5 g N tree⁻¹

For each experiment, numbers in column with same letter do not differ significantly, P = 0.05 (Duncan, 1955).

Table 2. N_2 fixation by 11-month-old Casuarina equisetifolia as estimated by three different methods⁽¹⁾.

| Methods | N_2 fixation ⁽²⁾ expressed as | |
|-------------------------|---|--------------------------------------|
| | Percent plant N derived from N_2 fixation (y) | g N_2 fixed tree ⁻¹ (Y) |
| Direct isotope dilution | 55.0 \pm 11.0 | 3.27 \pm 1.60 |
| A value | 39.1 \pm 11.9 | 2.31 \pm 1.47 |
| Difference | 49.0 \pm 14.8 | 3.07 \pm 1.86 |

(1) Mean values \pm confidence interval (P = 0.05)

(2) For the period of 6.5 months following transplantation to the field.



SOMMAIRE

| | |
|---|----|
| INTRODUCTION GENERALE | 1 |
| 1. Les fixateurs d'azote | 2 |
| 1.1. Les symbioses avec les cyanobactéries | 2 |
| 1.2. La symbiose <u>Frankia</u> -non-légumineuses | 3 |
| 1.3. La symbiose <u>Rhizobium</u> -légumineuses | 4 |
| 2. Les arbres fixateurs d'azote..... | 4 |
| 3. Les plantes actinorhiziennes..... | 5 |
| 4. Les Casuarinacées..... | 7 |
| 4.1. Taxonomie et aire de distribution géographique..... | 7 |
| 4.1.1. Genre <u>Gymnostoma</u> | 7 |
| 4.1.2. Genre <u>Casuarina</u> (<u>sensu stricto</u>)..... | 8 |
| 4.1.3. Genre <u>Allocasuarina</u> | 8 |
| 4.1.4. Genre C..... | 8 |
| 4.2. Utilisation des <u>Casuarina</u> | 8 |
| 4.3. Endophyte spécifique aux casuarinas..... | 9 |
| | |
| CHAPITRE I. ISOLEMENT DE L'ENDOPHYTE DE <u>CASUARINA</u> <u>EQUISETIFOLIA</u> | |
| 1. Isolement de l'endophyte de <u>Casuarina</u> <u>equisetifolia</u> | 12 |
| 1.1. Historique de l'isolement des endophytes chez les plantes actinorhiziennes..... | 12 |
| 1.2. Isolement des <u>Frankia</u> de <u>Casuarina</u> | 12 |
| 1.2.1. Isolement de <u>Frankia</u> à partir d'un broyat de nodules..... | 13 |
| 1.2.1.1. Principe de la méthode..... | 13 |
| 1.2.1.2. Résultats..... | 13 |

| | |
|--|----|
| 1.2.1.2.1. Isolement sur milieu QMOD gélifié..... | 13 |
| 1.2.1.2.2. Isolement sur milieu QMOD liquide..... | 14 |
| 1.2.2 Isolement de <u>Frankia</u> à partir de morceaux de nodules..... | 14 |
| 1.2.2.1. Principe de la méthode..... | 15 |
| 1.2.2.2. Résultat..... | 15 |
| 1.3. Désignation des isolats..... | 15 |
| 2. Morphologie des <u>Frankia</u> isolés de nodules de <u>Casuarina</u> | 16 |
| 2.1. Morphologie du type I..... | 16 |
| 2.2. Morphologie du type II..... | 17 |
| 3. Application de nos méthodes d'isolement à des <u>Frankia</u> appartenant à d'autres symbioses actinorhiziennes..... | 17 |
| 4. Discussion et conclusions..... | 18 |

CHAPITRE II. INTERACTIONS FRANKIA-PLANTE-HOTE

| | |
|---|----|
| 1. Introduction..... | 21 |
| 2. Etude du nodule de <u>Casuarina equisetifolia</u> ... | 22 |
| 2.1. Structure du nodule de <u>Casuarina</u> | 24 |
| 2.2. Infectivité et spectre d'hôte du broyat de nodule de <u>Casuarina equisetifolia</u> | 24 |
| 3. Etude d'une souche de <u>Frankia</u> de type morpho- logique I, isolée de nodules de <u>Casuarina</u> <u>equisetifolia</u> : <u>Frankia</u> ORS020602 (syn. D11).. | 26 |
| 3.1. Infectivité, effectivité et spectre d'hôte de ORS020602..... | 26 |
| 3.2. Structure des nodules obtenus par inoculation d' <u>Hippophaë rhamnoides</u> avec la souche ORS020602..... | 27 |
| 4. Etude d'une souche de <u>Frankia</u> de type morphologique II, isolée de nodules de <u>Casuarina</u> : <u>Frankia</u> ORS021001 (syn. CJ-1-82).. | 27 |
| 4.1. Infectivité, effectivité et spectre d'hôte. | 27 |
| 4.1.1. Etapes préliminaires de la nodulation.... | 28 |

| | |
|---|----|
| 4.1.2. Spectre d'hôte de la souche ORS021001..... | 29 |
| 4.2. Structure des nodules induits sur les <u>Casuarina</u> par ORS021001..... | 29 |
| 5. Etude de deux souches de <u>Frankia</u> isolées de nodules de Rhamnales : <u>Hippophaë</u> <u>rhamnoides</u> et <u>Colletia spinosissima</u> | 29 |
| 6. <u>Frankia</u> en tant que microorganisme rhizosphérique..... | 30 |
| 7. Discussion et conclusions..... | 32 |
| 7.1. Infection multiple du nodule de <u>Casuarina</u> <u>equisetifolia</u> | 32 |
| 7.2. Continuum <u>Casuarina</u> -Rhamnales..... | 33 |
| 7.3. Existence d'une forme de <u>Frankia</u> "extra- nodulaire"..... | 34 |
| 7.4. La morphologie des <u>Frankia</u> est sous la dépendance de la plante-hôte..... | 34 |

CHAPITRE III. PHYSIOLOGIE DES FRANKIA CULTIVES IN VITRO

| | |
|--|----|
| 1. Introduction..... | 36 |
| 2. Etude <u>in vitro</u> d'une souche de <u>Frankia</u> , de type morphologique I, isolée de nodules de <u>Casuarina</u> : ORS020602 (syn. D11)..... | 37 |
| 2.1. Propriétés nutritionnelles..... | 37 |
| 2.1.1. Croissance sur milieu complexe (QMOD).... | 37 |
| 2.1.2. Etude nutritionnelle..... | 37 |
| 2.1.2.1. Sources de carbone utilisables par ORS020602..... | 38 |
| 2.1.2.2. Sources d'azote utilisables par ORS020602..... | 38 |
| 2.1.2.3. Effet de l'apport de vitamines sur la croissance de ORS020602..... | 38 |
| 2.1.3. Conclusions..... | 38 |
| 2.2. Physiologie de la fixation de l'azote <u>in vitro</u> | 39 |
| 2.2.1. Dérépression de la biosynthèse de la nitrogénase en conditions de non-croissance. | 39 |
| 2.2.1.1. Effet de la tension d'oxygène..... | 40 |

| | |
|---|----|
| 2.2.1.2. Effet des sources d'azote..... | 41 |
| 2.2.2. Dérépression de la biosynthèse de la nitrogénase en conditions de croissance.. | 41 |
| 2.2.2.1. Croissance de la souche ORS020602 aux dépens de l'azote moléculaire..... | 41 |
| 2.2.2.2. Effet des sources d'azote..... | 42 |
| 2.2.2.3. Rôle des vésicules..... | 42 |
| 2.3. Voies initiales du métabolisme de l'ammoniaque chez <u>Frankia</u> ORS020602 (syn.D11) | 43 |
| 2.3.1. La glutamine synthétase..... | 44 |
| 2.3.2. Les autres enzymes de l'assimilation de l'azote..... | 46 |
| 2.3.3. Conclusions..... | 46 |
| 3. Etude <u>in vitro</u> d'une souche de <u>Frankia</u> , de type morphologique II, isolée de nodule de <u>Casuarina</u> : ORS021001 (syn.CJ-1-82)..... | 47 |
| 3.1. Propriétés nutritionnelles..... | 47 |
| 3.2. Physiologie de la fixation d'azote..... | 47 |
| 4. Etude <u>in vitro</u> de deux souches de <u>Frankia</u> isolées de nodules de Rhamnales : <u>Hippophaë</u> <u>rhamnoides</u> (ORS140101) et <u>Colletia spinosissima</u> (ORS060501)..... | 48 |
| 5. Conclusions et discussion..... | 48 |
| 5.1. Les souches de <u>Frankia</u> , isolées dans ce travail, diffèrent peu en ce qui concerne leurs caractères physiologiques..... | 48 |
| 5.2. Aptitude des <u>Frankia</u> à fixer l'azote <u>in vitro</u> et à croître aux dépens de l'azote moléculaire : rôle des vésicules..... | 49 |
| 5.3. Voies initiales du métabolisme de l'azote chez <u>Frankia</u> cultivé <u>in vitro</u> | 51 |

CHAPITRE IV. ESTIMATION DU POTENTIEL FIXATEUR D'AZOTE DE CASUARINA EQUISETIFOLIA

| | |
|--|----|
| 1. Introduction..... | 53 |
| 2. Estimation de la fixation potentielle d'azote de <u>Casuarina equisetifolia</u> cultivé en micro- parcelles expérimentales..... | 54 |

| | |
|---|----|
| 2.1. Les méthodes d'estimation..... | 55 |
| 2.1.1. Méthode "par différence"..... | 55 |
| 2.1.2. Méthode de "l'équivalent engrais"..... | 55 |
| 2.1.3. Méthode de la réduction d'acétylène..... | 56 |
| 2.1.4. Méthodes isotopiques..... | 57 |
| 2.1.4.1. Méthodes basées sur l'apport d'engrais marqué au ^{15}N | 58 |
| 2.1.4.1.1. Dilution isotopique..... | 58 |
| 2.1.4.1.2. Valeur "A"..... | 60 |
| 2.1.4.2. Méthode de l'abondance isotopique ^{15}N naturelle..... | 62 |
| 2.2. Expérience n° 1..... | 64 |
| 2.2.1. Dispositif expérimental..... | 64 |
| 2.2.2. Résultats..... | 66 |
| 2.2.2.1. Estimation de la fixation d'azote.... | 66 |
| 2.2.2.1.1. Estimation par la méthode "par diffé- rence"..... | 66 |
| 2.2.2.1.2. Estimation par la méthode de "l'équivalent engrais"..... | 66 |
| 2.2.2.1.3. Estimation par la méthode de dilution isotopique ^{15}N | 67 |
| 2.2.2.1.4. Estimation par la méthode de la "valeur A"..... | 67 |
| 2.2.2.2. Variabilité du potentiel fixateur d'azote des arbres nodulés par <u>Frankia</u> . | 68 |
| 2.3. Expérience n°2..... | 69 |
| 2.3.1. Dispositif expérimental..... | 69 |
| 2.3.2. Estimation de la fixation d'azote..... | 70 |
| 2.3.2.1. Estimation par la méthode "par différence"..... | 70 |
| 2.3.2.2. Estimation par la méthode de l'abondan- ce naturelle en ^{15}N | 70 |
| 2.4. Expérience n° 3..... | 70 |
| 2.4.1. Dispositif expérimental..... | 71 |
| 2.4.1.1. Obtention des plants bouturés de <u>Casuarina</u> | 71 |
| 2.4.1.2. Les différents traitements..... | 71 |
| 2.4.2. Résultats..... | 72 |

| | |
|--|----|
| 2.4.2.1. Estimation de la fixation de l'azote par <u>Casuarina equisetifolia</u> | 73 |
| 2.4.2.1.1. Estimation par la méthode "par différence"..... | 73 |
| 2.4.2.1.2. Estimation par la méthode de la réduction de l'acétylène..... | 73 |
| 3. Exemple d'un facteur influençant la nodulation et la croissance de <u>Casuarina equisetifolia</u> dans un sol déficient en phosphore : les endo- mycorhizes..... | 76 |
| 4. Conclusions et discussion..... | 76 |
| 4.1. Comparaison entre les différentes méthodes d'estimation de la fixation de l'azote..... | 76 |
| 4.2. Quantité d'azote fixé par <u>Casuarina</u> <u>equisetifolia</u> cultivé en microparcelles expérimentales..... | 77 |
| 4.2.1. Fixation spécifique d'azote..... | 77 |
| 4.2.2. Fixation d' N_2 par arbre..... | 78 |
| 4.2.3. Extrapolation sur un hectare et un an.... | 79 |

CONCLUSION GENERALE

| | |
|--|----|
| 1. Introduction..... | 82 |
| 2. Notre contribution au développement de la "Frankialogie"..... | 83 |
| 2.1. Recherches fondamentales..... | 83 |
| 2.2. Recherches appliquées..... | 84 |
| 3. Les connaissances actuelles concernant les symbioses actinorhiziennes..... | 85 |
| 3.1. Recherches sur les <u>Frankia</u> cultivés <u>in vitro</u> | 85 |
| 3.1.1. Isolement des endophytes..... | 85 |
| 3.1.2. Propriétés nutritionnelles..... | 86 |
| 3.1.3. Taxonomie des <u>Frankia</u> | 87 |
| 3.1.4. Pléomorphisme des <u>Frankia</u> | 88 |
| 3.1.4.1. Régulation de la sporulation..... | 88 |
| 3.1.4.2. Régulation de la formation des vésicules..... | 89 |
| 3.1.5. Fixation d'azote par les <u>Frankia in vitro</u> | 90 |

| | |
|---|---------|
| 3.1.6. Assimilation de l'azote chez <u>Frankia</u> cultivé <u>in vitro</u> | 90 |
| 3.1.7. Génétique de <u>Frankia</u> | 91 |
| 3.2. Intéractions <u>Frankia</u> -plante-hôte..... | 91 |
| 3.2.1. Infection de la plante-hôte..... | 91 |
| 3.2.2. Spécificité d'hôte..... | 92 |
| 3.2.3. Structure des nodules..... | 93 |
| 3.2.4. Hémoglobines..... | 94 |
| 3.2.5. Fonctionnement de la symbiose..... | 95 |
| 3.2.5.1. Source de carbone fourni à l'endophyte. | 95 |
| 3.2.5.2. Métabolisme de l'azote..... | 95 |
| 3.2.6. <u>Frankia</u> , micro-organisme rhizosphérique.. | 97 |
| 3.3. Potentiel fixateur d'azote des plantes actinorhiziennes..... | 97 |
| 3.4. Applications..... | 98 |
| 3.5. Perspectives..... | 99 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 100 |
| RESUME..... | 122 |
| PLUBLICATIONS..... | 125 |
| LISTE DES ARTICLES..... | 125 |

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de l'ORSTOM à Dakar. Je tiens à exprimer, en premier lieu, ma reconnaissance à la Direction de l'ORSTOM qui m'a permis de mener à bien mes recherches dans des conditions de travail très favorables.

Je remercie particulièrement Monsieur Y. Dommergues, Directeur de recherches au CNRS, qui a dirigé mes recherches. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour tous les conseils qu'il n'a cessé de me prodiguer tout au long de ce travail.

Mes remerciements vont également à Monsieur H.G. Diem, Maître de recherches au CNRS, qui m'a fait profiter de ses grandes connaissances en écologie microbienne.

Je tiens à remercier également Monsieur Aubert, Monsieur Gadal, Madame Elmerich et Monsieur Tavlitzki qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Enfin, je ne saurais oublier tous mes collègues de l'ORSTOM qui ont contribué, de près ou de loin, au succès de mon entreprise.

INTRODUCTION GENERALE

A côté des énergies fossiles (pétrole, charbon, gaz naturel), qui diminuent à un rythme qui s'accélère en fonction des besoins énormes de nos économies modernes, existe une source d'énergie inépuisable et gratuite : l'énergie solaire. Grâce à la photosynthèse, les plantes captent cette énergie sous forme de liaisons chimiques stables. Bien que le rendement du processus soit faible (0,2 % à 0,5 % pour les plantes habituellement cultivées), les potentialités sont considérables puisque les 176 milliards de tonnes de matière sèche, produits chaque année par la photosynthèse planétaire, représentent plus de 20 fois l'énergie fossile consommée dans le monde (Sasson 1983).

Cette gigantesque production végétale a deux facteurs limitants principaux : l'eau et l'azote. En ce qui concerne l'azote, il est important de souligner qu'il n'existe pas de gisements naturels d'azote fixé puisque les gisements de nitrate d'Amérique du Sud (Chili, Pérou) sont d'origine animale (Guano).

Dès le 19ème siècle, sous la poussée des besoins agricoles, il a été nécessaire de développer des méthodes industrielles permettant d'obtenir des engrais azotés de synthèse. La méthode la plus répandue étant le procédé Haber qui consiste à synthétiser de l'ammoniac à partir d'azote moléculaire et d'hydrogène, ceci à haute température et pression élevée. L'hydrogène étant un sous-produit du pétrole, le coût de production des engrais azotés n'a cessé d'augmenter ces dernières années. Ceci explique que l'utilisation des engrais chimiques de synthèse n'est largement répandue que dans les pays fortement industrialisés. Cependant, l'utilisation massive d'engrais présente des inconvénients puisque seulement une partie est assimilée par les plantes et que l'excédent, lessivé par les eaux de pluie, va contribuer à l'eutrophisation des lacs et à la pollution des eaux potables. Dans les régions agricoles comme la Brie, la pollution des eaux potables par les nitrates dépasse fréquemment 50 mg l^{-1} , ce qui est la concentration maximale admissible.

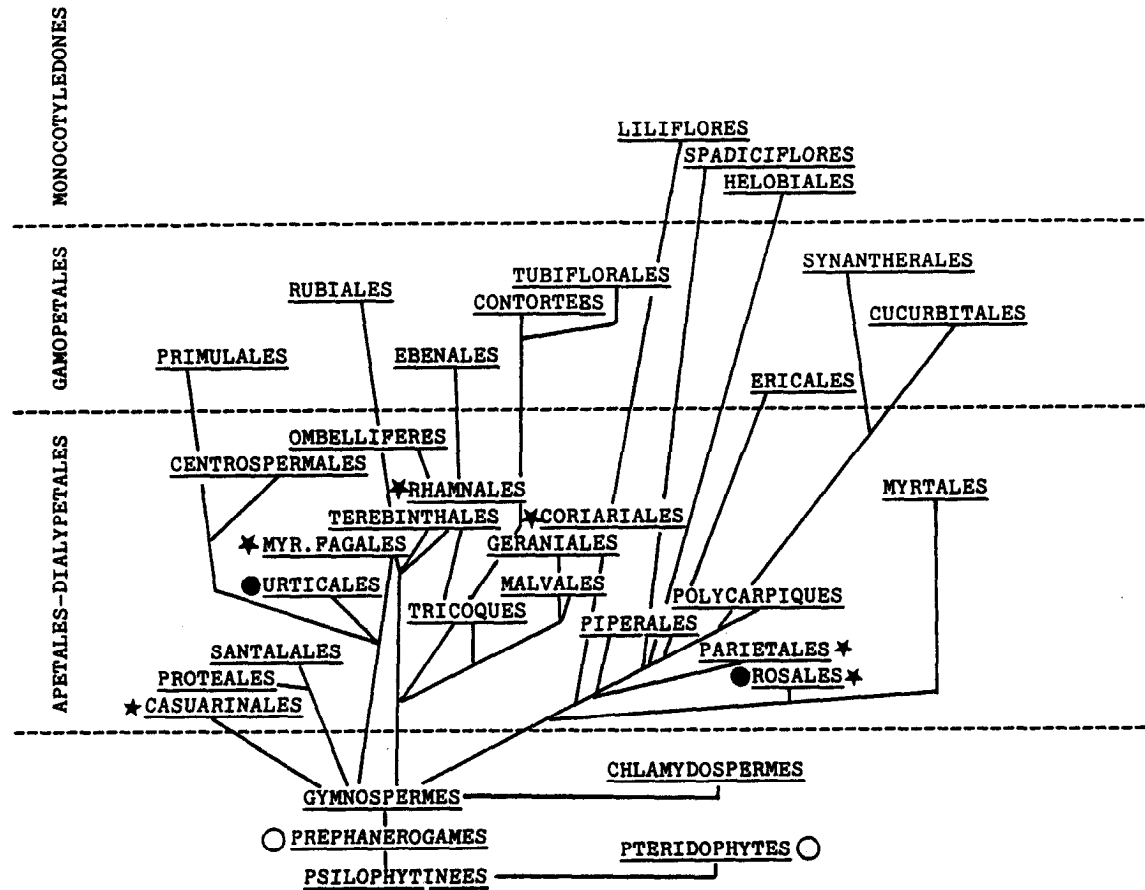


FIGURE 1. Arbre généalogique des plantes vasculaires (d'après L. Emberger) avec indication des ordres comportant des espèces susceptibles de s'associer symbiotiquement avec Rhizobium (●), Frankia (★) ou cyanobactérie (○). L'ordre des Rosales comprend la grande famille des Légumineuses (dont un très grand nombre d'espèces est associé symbiotiquement avec Rhizobium) et la famille des Rosacées dont on connaît cinq genres comportant des espèces associées symbiotiquement avec Frankia. Les Urticales comportent un seul genre, Parasponia (Ulmacée), connu pour s'associer symbiotiquement avec Rhizobium.

Or, une source d'azote inépuisable (4.10^{15} tonnes), gratuite et non-polluante existe : l'atmosphère (Dalton, H et Mortenson, L.E., 1972).

Pour l'ensemble de la biosphère, la principale voie d'entrée de l'azote atmosphérique est la fixation biologique de l'azote qui consiste en la réduction enzymatique de l'azote moléculaire en ammoniacque.

1. Les fixateurs d'azote

Tous les fixateurs d'azote (diazotrophes) connus sont des procaryotes (Quispel, 1974) regroupant, au moins 200 espèces bactériennes (Postgate, 1981) dont plus de la moitié sont des cyanobactéries (Stewart, 1976, 1980). Toutes ces espèces ont en commun la même enzyme : la nitrogénase. Cette enzyme a été purifiée à partir d'une quinzaine d'espèces bactériennes appartenant à des groupes taxonomiques différents. Malgré cette diversité, les propriétés physico-chimiques de l'enzyme se sont toujours révélées assez similaires (Emerich et Burris, 1978 ; Eady et Smith, 1979).

On distingue deux groupes de microorganismes diazotrophes : (1) les fixateurs libres qui sont généralement trouvés dans la rhizosphère de plantes, (2) les diazotrophes symbiotiques capables d'établir une symbiose fixatrice d'azote dans laquelle le partenaire végétal fournit le carbone et l'énergie (produits de la photosynthèse) alors que le partenaire bactérien fournit l'azote réduit par sa nitrogénase. On connaît actuellement trois principaux types de symbiose (Figure 1).

1.1. Les symbioses avec des cyanobactéries

Il s'agit probablement du type de symbiose le plus primitif existant actuellement. On distingue cinq groupes différents :

- symbiose cyanobactérie-hépatiques : les hépatiques appartiennent à la lignée des Bryophytes (plantes non vasculaires) qui sont des plantes incrustées ou rampantes (sur

le sol, les arbres et les rochers) des régions chaudes et humides. On connaît trois genres capables d'établir une symbiose avec une cyanobactérie du genre Nostoc, il s'agit de Blasia, de Cavicularia et de Anthoceros.

Dans ce type de symbiose, la cyanobactérie se développe dans des cavités situées à la base des thalles (Bond, 1983);

- symbiose cyanobactérie-lichens : les lichens résultent d'une symbiose entre un organisme hétérotrophe (champignon) et un organisme photosynthétique (algue verte ou cyanobactérie). Les lichens "à cyanobactérie" représentent 20 % des 18 000 espèces de lichens connues (Bond, 1983)

- symbiose Cyanobactérie - Gunnera (angiosperme) : aucun nodule typique n'est formé et la cyanobactérie du genre Nostoc est confinée dans des glandes spéciales que la plante développe à la base des feuilles (Becking, 1977) ;

- symbiose Cyanobactérie - Azolla (fougère) dans ce cas également l'infection de la plante par une cyanobactérie du genre Anabaena ne se fait qu'en surface dans des sacules ;

- symbiose Cyanobactérie - Cycadales : dans ce type de symbiose, il y a formation de structure similaires à des nodules. Cette symbiose est restreinte aux Cycadales qui sont des formes primitives de plantes à graines rattachées aux gymnospermes. Ce groupe est actuellement représenté, en milieu sub-tropical et tropical, par 9 genres et 90 espèces. Le microsymbiote responsable de la formation de ces "nodules de gymnospermes" est probablement une cyanobactérie du genre Nostoc ou Anabaena (Akkermans, 1978).

1.2. La symbiose Frankia non-légumineuse

Les non-légumineuses symbiotiques associées à Frankia (actinomycète fixateur d'azote) ou plantes actinorhiziennes (Torrey et Tjepkema, 1979) sont représentées par plus de 170 espèces appartenant à 8 familles et 7 ordres différents d'angiospermes présentés tant en régions tempérées qu'en régions tropicales.

1.3. La symbiose Rhizobium-légumineuses

On connaît 17 600 espèces de légumineuses (Meijer et Broughton, 1982) mais seulement une centaine d'entre-elles sont cultivées. Les légumineuses sont fondamentalement des espèces arborescentes tropicales ; les espèces herbacées ou buissonnantes des régions tempérées en seraient des formes dérivées récentes. Malgré les recherches intensives menées sur les légumineuses depuis le début du siècle, les études sur la nodulation n'ont porté que sur 10 % des espèces connues.

Depuis peu, on connaît un cas de symbiose Rhizobium non-légumineuses : il s'agit du Parasponia appartenant à la famille des Ulmacées et à l'ordre des Urticales (Trinick, 1979).

2. Les arbres fixateurs d'azote

Les arbres appartenant aux symbioses Rhizobium-légumineuses et Frankia-non-légumineuses seront probablement amenés à jouer un rôle économique essentiel dans les années à venir pour les raisons suivantes :

- Les besoins planétaires en bois doublent tous les 25 ans (J.W. Brewbaker, 1982) alors que la diminution de la forêt tropicale est estimée entre 7,5 à 20 millions d'hectares par an. Dans les pays en voie de développement, le besoin en bois de feu est particulièrement important. Dans la région Sahélienne, on estime que chaque habitant en utilise 1 kg par jour pour la cuisson des aliments ce qui contribue grandement à la déforestation dramatique observée dans cette région (Badji, 1982).

- La totalité des sols de bonne qualité est utilisée pour la production alimentaire nécessaire à une population mondiale qui atteindra 6 à 7 milliards d'individus en l'an 2000.

- Les variétés végétales modernes à haut rendement épuisent rapidement les sols et notamment les sols tropicaux souvent pauvres en azote et en phosphore. Cet épuise-

Tableau 1. Classification des non-légumineuses fixatrices d'azote associées à Frankia⁽¹⁾

| Ordre | Famille | Genre | Distribution géographique |
|--------------|---------------|---|--|
| Casuarinales | Casuarinacées | <i>Casuarina</i> <i>Allocasuarina</i> <i>Gymnostoma</i> | Circum-pacifique |
| Coriariales | Coriariacées | ^c <i>Coriaria</i> | Régions méditerranéennes, Nlle Zélande, Japon Amérique du Sud |
| Fagales | Betulacées | <i>Alnus</i> | Europe, Amérique du Nord, Amérique du Sud, montagnes d'Asie |
| Myricales | Myricacées | <i>Myrica</i> <i>Comptonia</i> | Régions tempérées, tropicales et sub-tropicales Amérique du Nord. |
| Pariétales | Datiscacées | <i>Datisca</i> | Californie, Mexique, bassin méditerranéen Asie Centrale. |
| Rhamnales | Rhamnacées | <i>Ceanothus</i> | Amérique du Nord, Mexique |
| | | <i>Colletia</i> | Amérique du Sud |
| | | <i>Discaria</i> | Amérique du Sud, Australie |
| | | <i>Kentrothamnus</i> | Chili |
| | | <i>Talguenea</i> | Chili |
| Rhamnales | Elaeagnacées | <i>Trevoa</i> | Chili |
| | | <i>Elaeagnus</i> | Asie, Europe, Amérique du Nord |
| | | <i>Hippophaë</i> <i>Shepherdia</i> | Asie, Europe Amérique du Nord |
| Rosales | Rosacées | <i>Cercocarpus</i> | Ouest des USA et Mexique |
| | | <i>Chamaebatia</i> | Californie |
| | | <i>Cowania</i> | Californie, Mexique |
| | | <i>Dryas</i> | Alaska, Canada, Montagnes d'Asie |
| | | <i>Purshia</i> <i>Rubus</i> | Amérique du Nord Asie, Indonésie |

(1) d'après Bond et Wheeler (1980) et Becking (1982).

ment des sols est souvent aggravé par l'érosion, éolienne ou due à l'irrigation, dont l'intensité peut être considérable sous les tropiques.

Il résulte de cet état de fait qu'il ne reste disponible pour les cultures forestières que les sols dégradés ou de mauvaise qualité. Les arbres fixateurs d'azote, grâce à leur rusticité et à leur adaptabilité à des conditions édaphiques et climatiques marginales, peuvent prospérer sur de tels sols. Si ces arbres sont également mycorhizés, ils peuvent alors vivre dans des sols déficients à la fois en azote et en phosphore ; en outre, bien souvent, ils supportent mieux l'aridité.

Les retombés économiques que l'on peut attendre de l'utilisation à grande échelle des arbres fixateurs d'azote sont considérables, les principales étant :

- production de bois pour les besoins industriels : bois d'oeuvre, pâte à papier ;
- production d'énergie : charbon de bois, méthanogénèse à partir de la matière sèche ;
- retour à l'agriculture
- protection contre l'érosion.

A côté des espèces appartenant à la grande famille des légumineuses, on commence à s'intéresser de plus en plus aux espèces appartenant à diverses famille de non-légumineuses ayant en commun leur capacité à vivre en symbiose avec un micro-organisme fixateur d'azote appartenant à l'ordre des actinomycétales : le Frankia. Ces non-légumineuses fixatrices d'azote sont désormais appelées plantes actinorhiziennes (Torrey et Tjepkema, 1979).

3. Les plantes actinorhiziennes

Les plantes actinorhiziennes sont réparties en 7 ordres comprenant 8 familles et 24 genres (Tableau 1). Actuellement, on connaît plus de 170 espèces capables de s'associer symbiotiquement avec Frankia. A part les genres Dryas et Datisca qui sont des herbacées, ces plantes sont en général ligneuses et à morphologie variables ; il s'agit

alors de buisson (Colletia, Rubus), de petits arbres (Hippophaë) ou d'arbres pouvant atteindre de grandes dimensions (Alnus, Casuarina). Leur aire de distribution géographique couvre l'ensemble de la planète.

On trouve des représentants des plantes actinorhiziennes dans les régions froides (Alnus, Dryas, Myrica, Elaeagnus), les régions méditerranéennes (Hippophaë, Elaeagnus, Coriaria, Alnus, Casuarina) et les régions tropicales et sub-tropicales (Cercocarpus, Coriaria, Alnus, Myrica, Casuarina) tant au niveau de la mer qu'en altitude.

Les espèces actinorhiziennes sont d'excellentes plantes pionnières capables de coloniser des sols très pauvres. De nombreux restes fossiles de plantes à actinorhizes (Dryas, Hippophaë, Elaeagnus, Shepherdia, Alnus) attestent que ces plantes ont joué un rôle essentiel dans la constitution des sols entre et après les époques glaciaires. Il est donc fort possible que ces plantes ont été les précurseurs des forêts actuelles d'Europe et d'Amérique du Nord (Silvester, 1974, 1977).

A part Rubus ellipticus de la famille des Rosacées qui produit un fruit comestible semblable à une framboise (Becking, 1982 ; Bailey, 1927), les plantes actinorhiziennes ne constituent pas une source pour l'alimentation humaine. Leur importance économique est essentiellement liée à leur grande capacité à coloniser des sols dégradés et à les enrichir en azote.

En région tempérée, ce sont les espèces appartenant au genre Alnus qui ont été le plus employées en particulier pour la mise en valeur des dunes sablonneuses et des terrils résultant de l'exploitation du charbon (Silvester, 1977).

Les plantes actinorhiziennes peuvent, en outre, servir d'alternative à l'utilisation d'engrais chimiques dans diverses conditions :

- plantations mixtes : Alnus rubra-Pin Douglas aux U.S.A. (Becking, 1982) ;

- sous-bois de plantes actinorhiziennes : Coriaria sp. dans le cas des forêts tempérées d'Europe (Silvester, 1977) ou Cercocarpus dans des plantations de Pinus flexilis de Californie (Lepper et Fleschner, 1977) ;

- engrais vert : Coriaria sinica est utilisé comme engrais vert en Chine et peut produire jusqu'à 10 tonnes de matière sèche par hectares et par an (Watanabe, communication personnelle).

Bien que toute les familles de plantes actinorhiziennes soient représentées en milieu tropical, c'est actuellement la famille des Casuarinacées qui forme le groupe le plus important au point de vue économique.

4. Les Casuarinacées

Les Casuarinas sont représentés dans le plupart des écosystème s'étendant du désert à la forêt tropicale humide. Leur capacité à établir des doubles symbioses (Frankia et mycorhizes) leur permet de coloniser des sols très pauvres et de pousser dans des conditions extrêmes, l'exemple le plus frappant étant Allocasuarina decaisneana qui pousse au centre de l'Australie dans des régions où la pluviométrie annuelle varie de 100 à 275 mm (Chuck, 1983) et où le potentiel d'évaporation annuelle se situe entre 2500 et 3300 mm. Malgré ces conditions peu clémentes, A. decaisneana atteint couramment des tailles allant de 9 à 12 m de haut.

4.1. Taxonomie et aire de distribution géographique

La famille des Casuarinacées comprend 82 espèces dont l'aire de distribution géographique est circum-pacifique. D'après L.A.S. Johnson (1982), cette famille peut être divisée en 4 genres distincts.

4.1.1. Genre Gymnostoma

Le genre Gymnostoma est le plus archaïque de la famille des Casuarinacées, il comprend 19 espèces indigènes aux îles Fidji, à Sumatra et à la Nouvelle Calédonie.

Ces espèces sont généralement arborescentes et poussent dans des régions de forêts tropicales humides.

4.1.2. Genre casuarina (sensu stricto)

Le genre Casuarina comprend 16 espèces originaires pour la plupart d'Australie mais aussi rencontrées dans le Sud-Est asiatique et dans les îles du Pacifique. Ce sont des espèces pouvant atteindre jusqu'à 20 ou 30 m de hauteur et appartenant à des biotopes tels que les zones côtières (C. equisetifolia), les mangroves (C. glauca) ou les bords des rivières (C. cunninghamiana).

4.1.3. Genre Allocasuarina

Ce genre comprend 45 espèces endémiques à l'Australie et présentes dans un large éventail d'écosystèmes allant de la forêt tropicale humide aux déserts du centre de l'Australie.

4.1.4. Genre C

Ce genre ne comprend que 2 espèces originaires de Palawan et de Nouvelle Guinée.

4.2. Utilisation des Casuarina

L'espèce la plus étudiée et la plus largement introduite hors de son aire géographique d'origine est sans conteste Casuarina equisetifolia. Cette espèce, qui produit un bois très dense (0,8 à 1,2) ayant un grand pouvoir calorifique (5050 Kcal kg⁻¹), est couramment utilisée pour fixer les dunes littorales, pour la reforestation, la confection de brise-vent et comme source de charbon de bois.

L'exemple le plus spectaculaire concernant les possibilités d'emploi de C. equisetifolia est la mise en place, depuis 1954, d'une bande côtière couvrant 1 million d'hectares en Chine du Sud (Turnbull, 1983). Cette ceinture de Casuarina a une longueur de 2300 km et une largeur variant de 0,5 à 5 km ; elle a permis, par son effet brise-vent et le blocage des dunes de sable, l'augmentation des

rendements agricoles. De plus, elle fournit aux populations locales leurs bois d'oeuvre et de feu.

Au Sénégal, les dunes côtières ont été stabilisées entre Saint-Louis et Dakar, par l'introduction de Casuarina equisetifolia. Malgré une pluviométrie faible (200-300 mm), cette espèce pousse très bien probablement grâce à l'humidité provenant de la mer (Andeke-Lengui et Dommergues, 1983).

Il est également possible d'utiliser les casuarinas en alternance avec des plantes agricoles. Après 5 à 10 ans de croissance sur des sols dégradés et déficients en azote, les casuarinas sont coupés et utilisés comme bois de feu. Les sols ainsi régénérés permettent diverses productions agricoles, telles que la patate douce en Nouvelle Guinée (Silvester, 1977), l'arachide en Inde (Kondas, 1983); ou la plantation d'arbre non-fixateur d'azote tel qu'Anacardium occidentale pour la production de noix de cajou en Inde (J.C.C. Ottow, communication personnelle).

4.3. Endophyte spécifique aux casuarinas

Dans la plupart des cas, l'introduction des Casuarina se fait sur des sols très pauvres ou dégradés et le plus souvent les échecs d'implantation sont dûs à la non-nodulation des casuarinas liée à l'absence de l'endophyte dans les sols en question. En effet, hors de leur aire géographique d'origine, les casuarinas sont rarement nodulés, un exemple typique étant l'absence totale de nodules rencontrée chez les casuarinas introduits en Nouvelle Zélande (Becking, 1982). La situation étant identique au Sénégal, les services forestiers ont pratiqué, à partir de 1976, une inoculation systématique des pépinières de Casuarina par des nodules broyés (Andeke-Lengui et Dommergues, 1983). Cependant, cette méthode présente deux inconvénients majeurs : (1) introduction possible de pathogènes qui peuvent détruire la plantation, (2) existence dans les environs de la plantation d'une source de nodules suffisante.

L'implantation de casuarinas sur des sols déficients en azote et dépourvus en Frankia spécifique ayant comme condition sine qua non l'introduction simultanée de leur endophyte, il était nécessaire de disposer d'une source d'endophytes autre que les broyats de nodules. Ceci nous a conduit à étudier, à partir de 1980, la symbiose Frankia-casuarina. Deux grands thèmes de recherches ont été développés dans cette optique :

1/ recherches fondamentales concernant les Frankia spécifiques des casuarinas, à savoir :

- Mise au point de méthodes d'isolement des Frankia responsables de la nodulation des casuarinas.

- Etude des Frankia in vitro : recherche des meilleures conditions de culture, physiologie de la fixation d'azote chez Frankia, étude des voies de l'assimilation de l'azote chez cet endophyte.

- Etude du spectre d'hôte des souches isolées de nodules de Casuarina. Ceci nous a conduit à étudier deux plantes actinorhiziennes appartenant à l'ordre des Rhamnales : Colletia spinosissima et Hippophaë rhamnoides.

2/ recherches appliquées, à savoir :

- estimation du potentiel fixateur d'azote de la symbiose Frankia Casuarina dans des conditions de croissance proches de celles rencontrées au champ.

Ce travail accompli au laboratoire de Microbiologie des Sols de l'ORSTOM à Dakar au Sénégal, a fait l'objet de neuf publications principales que j'ai rassemblé en fin d'ouvrage, non dans l'ordre chronologique, mais en fonction des sujets traités, à savoir :

- Isolement de Frankia de Casuarina (articles 1 et 2).

- Infectivité, effectivité et spectre d'hôte des Frankia isolés de Casuarinacées et de Rhamnales (articles 3 et 4).

- Comportement de Frankia dans la rhizosphère de Casuarina, sa vie saprophytique (article 5).

- Etude de Frankia in vitro (articles 6 et 7).

- Estimation du potentiel fixateur d'azote de la

symbiose Frankia Casuarina (article 8).

- La double symbiose Frankia-Mycorhize chez Casuarina-equisetifolia (article 9).

CHAPITRE I
ISOLEMENT DE L'ENDOPHYTE
DE CASUARINA-EQUISETIFOLIA

Tableau 2. Principales méthodes utilisées lors de l'isolement
des endophytes des plantes actinorhiziennes

| Auteurs | Technique utilisée | Espèces actinorhiziennes |
|-----------------------|---|---|
| Pommer, 1959 | Dilution de broyats de nodules et étalement sur milieu gelosé glucose-asparagin | <i>Alnus glutinosa</i> |
| Callaham et al., 1978 | Digestion enzymatique des nodules | <i>Comptonia peregrina</i> |
| Quispel et Tak, 1978 | Dilution de broyats de nodules et étalement sur milieu complexe supplémenté par des extraits racinaires | <i>Alnus crispa</i> |
| Baker et al., 1979 | Fractionnement sur colonne de Sephadex | <i>Myrica gale</i> <i>Elaeagnus umbellata</i> |
| Baker et al., 1979 | Fractionnement sur gradient de sucrose | <i>Alnus crispa</i> <i>Elaeagnus umbellata</i> |
| Lalonde et al., 1981 | Sterilisation de morceaux de nodules par Osmium tetroxide | <i>Alnus glutinosa</i> |
| Benson, 1982 | Filtration sur tamis de 20µm et 50µm | <i>Alnus incana</i> |

1. Isolement de l'endophyte de Casuarina (Articles 1 et 2).

1.1. Historique de l'isolement des endophytes chez les plantes actinorhiziennes

Le nom de Frankia a été adopté au 19ème siècle, en l'honneur du botaniste allemand Frank, pour désigner les endophytes des plantes actinorhiziennes. C'est en 1866 que Woronin apporta la preuve de la présence d'un microorganisme dans les nodules des plantes actinorhiziennes mais il faudra attendre plus d'un siècle pour que le premier isolement d'un Frankia ait lieu (Callaham et al., 1978). Entre ces deux dates, de nombreuses tentatives d'isolement furent faites mais sans succès. L'isolement, en 1959, du Frankia d'Alnus glutinosa par Pommer est sujet à caution du fait de la perte de la souche par son inventeur et de la non reproductibilité de sa méthode d'isolement (Quispel, 1960).

Les difficultés rencontrées pour isoler les endophytes des non-légumineuses expliquent probablement le foisonnement de techniques compliquées (Tableau 2) liées à l'utilisation de milieux souvent très complexes, qui permirent l'obtention des différentes souches de Frankia, endophytes d'espèces actinorhiziennes variées telles que Elaeagnus umbellata, Alnus crispa, Alnus glutinosa et Myrica gale.

En ce qui concerne les Frankia de Casuarina, aucune souche n'avait été isolée lorsque nous avons commencé notre étude sur la symbiose Frankia-Casuarina en 1980.

1.2. Isolement des Frankia de Casuarina

Lors de la mise au point des méthodes d'isolement des Frankia de Casuarina, nous avons adopté deux approches différentes du problème :

- (1) isolement à partir de broyats de nodules utilisés comme inoculum ;
- (2) isolement de Frankia à partir de morceaux de nodules incubés dans différents milieux.

Tableau 3. Origine géographique des souches de Frankia isolées et correspondance entre ancienne et nouvelle désignation des souches.

| Lieux d'origine des nodules | Ancienne désignation des <u>Frankia</u> | Nouvelle désignation des <u>Frankia</u> ⁽¹⁾ |
|------------------------------|---|--|
| Parc de Hann, Dakar, Sénégal | D1 | ORS020601 |
| | D11 | ORS020602 |
| Saint-Louis, Sénégal | S1 | ORS020610 |
| Petit-Bourg, Guadeloupe | G1 | ORS020603 |
| Saint-François, Guadeloupe | G2 | ORS020604 |
| IRRI, Los Baños, Philippines | P1 | ORS020605 |
| Bangkok, Thaïlande | Cj1-82 | ORS021001 |
| Rio Tercero, Argentine | - | ORS060501 |
| Mens, Isère, France | H13 | ORS140101 |

(1) ORS = ORSTOM. Les 2 premiers chiffres indiquent le genre (02 = Casuarina, 06 = Colletia, 14 = Hippophaë), les 2 suivants indiquent l'espèce (06 = equisetifolia, 10 = junghuhniana, 05 = spinosissima, 01 = rhamnoides), les 2 derniers indiquent la n° de la souche

Dans un premier temps, nous avons constitué une collection de nodules de différentes provenances géographiques (Tableau 3) en inoculant avec des broyats de nodules, récoltés à travers le monde, des plants axéniques de Casuarina equisetifolia cultivés sur milieu nutritif sans azote (Vincent, 1970). Les nodules ainsi obtenus ont été utilisés pour les différents isolements.

1.2.1. Isolement de Frankia à partir d'un broyat de nodule (Article 1).

1.2.1.1. Principe de la méthode

Les principales étapes de cette méthode sont les suivantes :

- stérilisation externe de lobes de nodules par la chloramine T (3 % dans l'eau) pendant 5 mn ;
- broyage des lobes de nodules dans de l'eau distillée stérile.
- dilution des broyats de nodules de 10^{-1} à 10^{-4} dans de l'eau distillée stérile.
- inoculation de milieu QMOD (Lalonde et Calvert, 1979) liquide ou gélosé, par les diverses dilutions et incubation à 28-30°C. (La composition du milieu QMOD est rapporté dans le Tableau 11).

1.2.1.2. Résultats

1.2.1.2.1. Isolement sur milieu QMOD gélosé

Après 15 à 20 jours d'incubation, 10 à 20 % des boîtes de Pétri, inoculées avec la dilution 10^{-3} , présentent des colonies de Frankia visibles à la loupe binoculaire. Ces colonies de 100 à 200 μ m de diamètre sont au nombre de 1 à 20 par boîte. Les boîtes de Pétri contenant le plus souvent des colonies bactériennes contaminantes, les colonies de Frankia sont prélevées et transférées, une à une, en milieu QMOD liquide. Après croissance pendant 1 à 2 mois, la colonie de Frankia est broyée et l'inoculum ainsi obtenu sert à multiplier la souche.

Une étude comparative de divers lobes de nodules a montré que le nombre d'unités conduisant à la formation de colonies de Frankia (U F F) est très variable puisque certains lobes ne produisent aucune colonie.

1.2.1.2.2. Isolement sur milieu QMOD liquide

Des piluliers de 15 ml contenant 7 ml de QMOD liquide sont inoculés avec diverses dilutions de broyats de nodules et incubés à 28-30°C. Dans ces conditions, 10 à 20 % des piluliers inoculés par les dilutions 10^{-3} et 10^{-4} contiennent une ou plusieurs colonies de Frankia après 4 à 6 semaines.

L'inconvénient de cette méthode consiste dans le fait qu'il est impossible de séparer contaminants et Frankia comme dans la méthode d'isolement sur le milieu solide. De ce fait, il faut inoculer 100 à 200 piluliers pour obtenir quelques cultures pures de Frankia. Cependant, en remplaçant le milieu QMOD par un simple milieu sans azote (Gauthier et al., 1981 b), on diminue notablement le nombre des contaminants et l'on peut obtenir jusqu'à 50 % de piluliers contenant du Frankia exclusivement.

Ces méthodes utilisant des broyats de nodules de Casuarina pour inoculer du milieu QMOD nous a permis d'isoler des souches de Frankia provenant de régions géographiques très diverses : Sénégal (souches D1 et D11), Guadeloupe (souches G1 et G2) et Philippines (souche P1). La souche S1 (originnaire de Saint-Louis au Sénégal) a été isolée en employant un milieu sans azote contenant du succinate comme source de carbone.

Toutes les souches de Frankia isolées à partir de broyats de nodules se sont montrées incapables de noduler Casuarina equisetifolia (voir chapitre II). Ceci nous a conduit à rechercher d'autres méthodes d'isolement permettant l'obtention de l'endophyte de Casuarina.

1.2.2. Isolement de Frankia à partir de morceaux de nodules (Article 2).

1.2.2.1. Principe de la méthode.

Les lobes de nodules sont lavés et stérilisés superficiellement avec une solution aqueuse de Tetroxide d'osmium (OsO_4) à 3 % pendant 4 mn selon la méthode décrite par Lalonde et al. (1981). Après rinçage à l'eau distillé stérile, ces lobes sont découpés aseptiquement en fragments d'un volume approximatif de $0,5 \text{ mm}^3$. Chaque fragment ainsi obtenu est introduit dans un pilulier de 15 ml contenant 7 ml de milieu QMOD gélosé à 0,3 %. Après 2 mois d'incubation à 28-30°C, environ 10 % des fragments non contaminés donnent naissance à une colonie de Frankia qui est prélevée et dispersée par agitation dans un flacon serum contenant du milieu QMOD liquide et un barreau aimanté. La suspension ainsi obtenue sert à inoculer du milieu QMOD pour multiplier la souche. Une variante de cette méthode consiste à déposer plusieurs fragments de nodule au fond d'une boîte de Pétri et à couler du milieu QMOD gélosé dessus.

1.2.2.2. Résultat.

Cette méthode nous a permis d'isoler la souche de Frankia Cj1-82 à partir de nodules d'un hybride de Casuarina equisetifolia et de Casuarina junghuhniana provenant de Thaïlande. Cette souche s'est montrée infective vis-à-vis de Casuarina equisetifolia (voir chapitre II).

1.3. Désignation des isolats.

Récemment, Lechevalier (1983) a proposé un mode de désignation codée des différents Frankia isolés. Ceci était devenu nécessaire étant donné la numérotation anarchique employée par les différents auteurs pour désigner leurs isolats. Il est désormais conseillé de désigner les différentes souches de Frankia par trois lettres suivies de 6 chiffres.

Le tableau 3 donne la correspondance entre l'ancienne et la nouvelle désignation des souches de Frankia isolées au cours de ce travail. La plupart des articles présentés

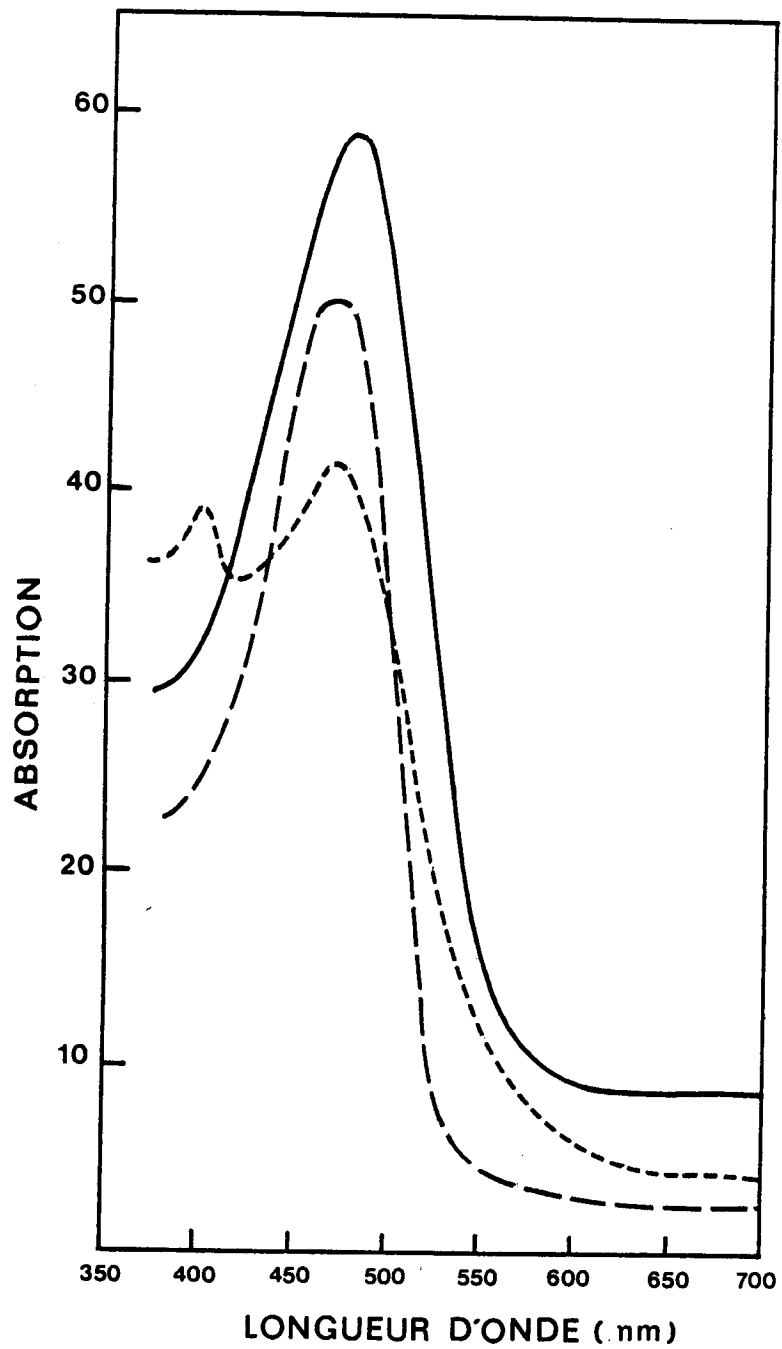


FIGURE 2. Spectre du pigment de la souche ORS020602 (— dans l'éthanol, - - dans l'acétone, -.- dans le méthanol.

dans cette thèse étant antérieurs à la terminologie proposée par Lechevalier, l'ancienne et nouvelle désignation des souches seront souvent utilisées simultanément.

2. Morphologie des Frankia isolés de nodules de casuarina

Les différentes souches de Frankia isolées de nodules de Casuarina peuvent être classées en deux types morphologiques.

2.1. Morphologie de type I. (article 1)

Ce type morphologique regroupe les souches D11, D1, G1, G2, P1 et S1 qui ont toutes été isolées à partir de broyats de nodules de Casuarina. Les principales caractéristiques de ce type de souches sont les suivantes :

- ces souches développent en milieu QMOD liquide, les structures maintenant reconnues spécifiques au genre Frankia : hyphes septées, sporanges très polymorphes productrices de spores polyédriques souvent relâchées dans le milieu, vésicules le plus souvent en position terminale sur les hyphes et parfois libérées dans le milieu ;
- ces souches sont incapables de noduler leur hôte d'origine, Casuarina equisetifolia ;
- ces souches produisent un mucilage et un pigment non diffusible qui précipite sous forme de microcristaux dans le mucilage. La teinte de ce pigment varie du "saumon clair" au "rouge sang" selon les souches. La figure 2 rapporte les spectres d'absorption du pigment de la souche ORS020602 (syn. D11) après extraction par divers solvants. Jusqu'à présent, aucune hypothèse concernant la fonction de ce pigment n'a été proposée.

Dans la suite de ce travail, la souche ORS020602 (syn. D11) sera utilisée comme souche de référence du type morphologique I et sera donc de ce fait, étudié en détail. La figure 3 rapporte les différentes structures morphologiques observées, chez la souche ORS020602, en microscopie électronique.

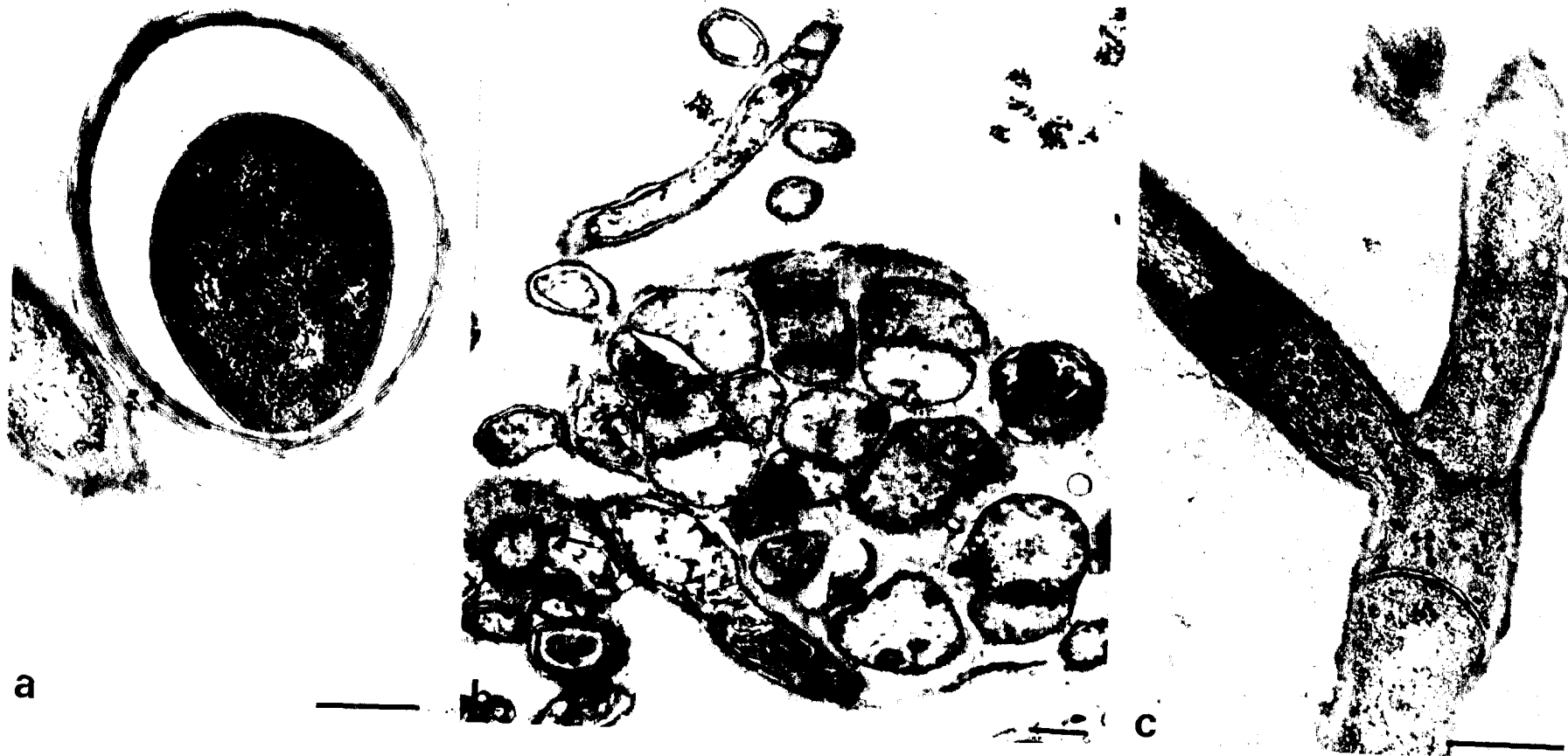


FIGURE 3. Observation en microscopie électronique de transmission de Frankia ORSO20602 (syn.D11) cultivé in vitro. (3a) : vésicule, (3b) : sporange, (3c) : hyphe septée. Dans les trois cas, la barre représente 1 μ m.

2.2. Morphologie de type II (Article 2).

Ce type de souche, représenté par le Frankia ORSO21001 (syn. Cj1-82), forme en milieu QMOD liquide des hyphes courtes et larges, des sporanges de formes typiques ainsi que des structures intercalaires et allongées, appelées S L S (Sporangia-like structures), ressemblant à des sporanges. Ces SLS peuvent donner naissance par fragmentation à des unités semblables à des spores. La souche ORSO21001 n'est pas pigmentée et ne forme pas de vésicule en milieu QMOD. L'apparition des vésicules ne se produit qu'en milieu sans azote. Cette souche s'est montrée capable de noduler Casuarina equisetifolia.

Récemment, Diem et Dommergues (1983) ont rapporté l'isolement de deux autres souches infectives de Frankia de Casuarina (CeF1-82 et CeD1-82) ayant le même type morphologique que la souche ORSO21001. La souche ORSO21001 servira de référence pour le type morphologique II tout au long de ce travail.

La figure 4 et le tableau 4 illustrent les différences très nettes existant entre les deux types morphologiques décrits.

3. Application de nos méthodes d'isolement à des Frankia appartenant à d'autres symbioses actinorhiziennes.

Pour mener à bien notre étude sur le spectre d'hôte des Frankia de Casuarina, nous avons été amené à isoler deux souches de Frankia à partir de deux espèces actinorhiziennes appartenant à l'ordre des Rhamnales.

La souche ORS140101 (syn. H13) a été isolée à partir de nodules d'Hippophaë rhamnoides en employant la méthode de dilution de broyats de nodules et en utilisant un milieu de culture sans azote. Cette souche présente une morphologie de type I ainsi qu'une pigmentation orangée (article 3).



FIGURE 4. (4a) : souche ORSO20602 (type morphologique I); H : hyphe, V : vésicule, Sp : sporange, S : spore. (4b) : souche ORSO21001 (type morphologique II); SLS : sporangia-like-structure, H : hyphe. Dans les 2 cas, la barre représente 10 μ m.

Par la méthode d'incubation de morceaux de nodules dans le milieu QMOD, nous avons isolé la souche ORS060501 qui est l'endophyte de Colletia spinosissima (article 4). Cette souche présente, elle aussi, une morphologie de type I.

Ces deux Frankia, isolées de nodules de Rhamnales, se sont montrées infectives et effectives vis-à-vis de leurs hôtes d'origine (voir chapitre II).

4. Discussion et conclusions

Deux raisons concourent à faire du Frankia de Casuarina un endophyte difficile à isoler :

1°/ la faible vitesse de croissance de Frankia in vitro augmente considérablement les risques de contamination par d'autres microorganismes tels que les bactéries et les champignons ;

2°/ il semble que les nodules de Casuarina renferment qu'une faible proportion d'unités capables de conduire à la formation de colonies de Frankia in vitro (U F F). Il est probable que le nombre d'U F F dans le nodule est en liaison avec l'âge du nodule et son état physiologique. Cependant, des déterminants génétiques liés à la plante-hôte et aux divers Frankia doivent intervenir au niveau des UFF. Ceci pourrait expliquer pourquoi certains Frankia tels que ceux de Colletia et d'Hippophaë sont plus facilement isolables que ceux de Casuarina.

En ce qui concerne les UFF de Casuarina, il semble que ceux conduisant aux souches de type I soient nettement plus nombreux que ceux conduisant aux Frankia de type II. En effet, il n'a jamais été possible d'isoler des souches des types II à partir de broyats de nodules. Cet état de chose est vraisemblablement le reflet du rapport numérique existant entre ces deux types de Frankia au sein du nodule de Casuarina.

Afin d'optimiser les résultats lors de l'isolement des Frankia, il nous est possible d'intervenir à deux

Tableau 4. Comparaison morphologique des deux types de Frankia, isolés de nodules de Casuarina, en milieu QMOD.

| Structures | <u>Frankia</u> | |
|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| | Type I: ORS020602 (syn. D11) | Type II: ORS021001 (syn. Cj1-82) |
| Hypthes | 0,4 - 0,9µm | 1 - 1,5µm |
| Vésicules | 2 - 3µm | absente |
| Sporanges typiques | 6 - 20µm | 6 - 20µm |
| Spores | 1,3 - 1,9µm | 1,3 - 1,9µm |
| SLS ⁽¹⁾ | absente | 3 - 50µm |
| Pseudo-spores venant des SLS | absente | 1,5 - 2µm |

(1) Sporangia-like-structures.

niveaux : la stérilisation des nodules et le milieu utilisé pour l'isolement.

1°/ La stérilisation des nodules : il faut pratiquer une stérilisation superficielle du nodule qui élimine la majeure partie des contaminants sans trop altérer la viabilité des UFF. Ce juste équilibre n'est pas toujours facile à trouver et varie en fonction de l'état du nodule. Les stérilisations à la chloramine T et à l'Osium tétroxyde, bien que très violentes, donnent de bons résultats alors que la stérilisation par le chlorure de mercure a un effet toxique qui le plus souvent inhibe la croissance ultérieure des Frankia.

La grande sensibilité des Frankia aux agents désinfectants lors de l'isolement est liée à la structure des nodules des plantes actinorhiziennes. En effet, contrairement aux légumineuses où l'endophyte (Rhizobium) est localisé dans la partie centrale du nodule entre les faisceaux vasculaires, l'endophyte des plantes actinorhiziennes (Frankia) occupe des cellules du cortex du nodule situées à l'extérieur du cylindre vasculaire central.

2°/ Le milieu d'isolement : le milieu QMOD utilisé pour la plupart des isolements nous paraît être trop riche et contribue à favoriser la croissance des contaminants. L'utilisation de ce milieu, lors de l'isolement des Frankia de Casuarina, s'explique par le manque de connaissance que nous avons au sujet de la physiologie de cet endophyte quand nous avons commencé nos recherches en 1980.

En ce qui concerne la méthode d'isolement par dilution de broyats de nodules, le remplacement du milieu QMOD par un milieu pour fixateur d'azote donne, le plus souvent, de bons résultats en permettant aux Frankia (qui comme on le verra plus loin sont capables de fixer l'azote moléculaire in vitro) d'avoir un avantage sélectif vis-à-vis des contaminants. L'ajout de cycloheximide ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) au milieu, favorise également la croissance des Frankia en inhibant les champignons qui sont une cause fréquente de contamination.

Enfin, la modification extrême du milieu d'isolement consiste en la suppression pure et simple des nutriments. Récemment, Diem et Dommergues (1983) ont isolé une souche de Frankia (CeFl-82) en incubant un morceau de nodule dans de l'eau gélosée. Dans cette variante, le Frankia utilise, pour se développer, uniquement les réserves nutritives du nodule ; dès que le Frankia est sorti du nodule, on le transfère en milieu QMOD pour le multiplier.

En conclusion, on peut penser que l'insuccès rencontré, dans les différentes tentatives d'isolement du Frankia de Casuarina, par certains auteurs tels que Torrey (1983) au Baker (communication personnelle) s'explique principalement par : (1) l'utilisation de méthodes non adaptées à l'endophyte des casuarinas (fractionnement sur gradient de sucrose dans le cas de Baker, par exemple), (2) la méconnaissance de la faible quantité d'UFF présente dans les nodules de Casuarina, (3) l'utilisation de milieux de culture non adaptés.

Les résultats présentés dans ce chapitre permettent d'énoncer les conclusions suivantes :

- Des méthodes d'isolement simples permettent d'isoler les Frankia de Casuarina.

- Ces méthodes d'isolement sont applicables à d'autres symbioses actinorhiziennes telles que Hippophaë rhamnoides et Colletia spinosissima.

- La notion d'UFF nous semble fondamentale et une étude systématique de l'évolution du taux d'UFF présent dans le nodule en fonction de son état physiologique pourrait être une voie de recherche prometteuse en ce qui concerne l'optimisation des méthodes d'isolement des Frankia.

- Il est possible d'isoler des nodules de Casuarina deux types de Frankia ayant des morphologies bien distinctes ; on verra plus loin qu'il s'agit de Frankia différents non seulement sur le plan morphologique mais aussi sur le plan de l'infectivité et dans une moindre mesure, sur le plan de leur physiologie. Ceci suggère la possibilité d'une infection multiple des nodules de Casuarina, par plusieurs souches de Frankia.

CHAPITRE II
INTERACTIONS FRANKIA-PLANTE-HOTE

1. Introduction

De part leur grande diversité, les plantes actinorhiziennes présentent un modèle de relation "plante-endophyte" d'une complexité extrême.

Becking, en 1970, fut le premier à proposer une classification des Frankia fondée sur la spécificité d'hôte et inspirée de celle employée pour la symbiose légumineuses-Rhizobium où les souches ont été regroupées, en fonction de leur spécificité vis-à-vis des plantes hôtes, dans des groupes d'inoculation croisée qui ont actuellement valeur d'espèce (Fred et al., 1932). Une telle classification n'est cependant pas sans faille étant donné que les groupes d'inoculation croisée ne s'excluent pas mutuellement. En particulier, on a pu mettre en évidence l'existence d'un continuum de souches reliant les souches typiques du groupe R. japonicum aux souches typiques appartenant au groupe de R. cowpea (Bromfield et Roughley, 1980 ; Jara, 1981).

La classification de Becking qui comptait dix espèces de Frankia (F. alni, F. casuarinaceae, F. coriariae, F. elaeagni, F. brunchorstii, F. ceanothi, F. discariae, F. cercocarpi, F. dryadis et F. purshiae) définies d'après des tests d'inoculations croisées effectuées avec des broyats de nodules, a dû être abandonnée dès l'isolement du premier Frankia infectif effectué par Callaham et al. (1978). En effet, Torrey et al. (1980) ont montré que la souche Cp11, isolée de nodules de Comptonia peregrina, pouvait noduler non seulement son hôte d'origine, mais également Myrica cerifera, Alnus glutinosa, Alnus rubra, Alnus rugosa et Alnus crispa.

L'obtention à partir de 1978 de nombreuses souches de Frankia provenant d'une grande variété de plantes hôtes, a conduit plusieurs auteurs à proposer diverses classifications des Frankia basées sur :

(1) la composition chimique des parois cellulaires (Lechevalier et Lechevalier, 1979), (2) la composition en sucre des hydrolisats cellulaires (Mort et al., 1983), (3) la

sérologie (Baker et al., 1981), (4) les propriétés physiologiques (Lechevalier et al., 1983), (5) la compatibilité avec la plante hôte (Quispel et Burggraaf, 1981).

Aucune de ces classifications n'est totalement satisfaisante, cependant on peut schématiser la situation en classant les Frankia en deux groupes :

- Le groupe I qui comprendrait les Frankia d'Alnus, de Myrica et de Comptonia. Il s'agirait d'un groupe homogène incluant les Frankia du sérogroupe I (Baker et al., 1981) et ceux du type B proposé par Lechevalier et al., (1983).

- Le groupe II qui comprendrait les Frankia d'Elaeagnus, d'Hippophaë et de Shepherdia. Il s'agirait d'un groupe hétérogène regroupant les souches du sérogroupe II (Baker et al., 1981) et celles du type A proposé par Lechevalier et al. (1983).

On verra qu'une telle classification peut difficilement intégrer les résultats présentés dans ce chapitre, à savoir :

- la multiple infection des nodules de Casuarina ;
 - l'existence au sein des nodules de Casuarina :
 (1) de Frankia spécifiques aux casuarinas sensu stricto (ORS021001), (2) de Frankia non infectifs vis-à-vis de Casuarina (ORS020602) mais capables de noduler des espèces appartenant à un autre ordre de plantes actinorhiziennes : les Rhamnales.

2. Etude du nodule de Casuarina equisetifolia

Les nodules des plantes actinorhiziennes ont été classés en deux types morphologiques par Becking en 1977 : le type "Alnus" et le type "Myrica-Casuarina". Ces deux types de nodules se différencient par la présence chez le type "Myrica-Casuarina", de racines nodulaires à géotropisme négatif.

L'infection, comme chez la plupart des légumineuses (Bauer, W.D., 1981), se fait par l'intermédiaire des poils absorbants racinaires (Callaham et al., 1979).

Contrairement aux légumineuses, la formation du nodule, chez les plantes actinorhiziennes, se fait en deux étapes : (1) invasion des cellules du cortex racinaire situées à la base du site d'infection, ce qui conduit à la formation d'un pré-nodule non-fixateur d'azote, (2) formation sur la racine, au niveau du site d'infection, de primordiums racinaires latéraux qui sont par la suite infectés par Frankia et s'hypertrophient pour donner naissance à un amas de lobes nodulaires appelé rhizothamnion (Blondeau, 1980).

Dans le nodule mature, le Frankia occupe un certain nombre de cellules du cortex du nodule situées à l'extérieur du cylindre vasculaire central.

On distingue dans les nodules les structures suivantes :

- des hyphes septées et ramifiées entourées d'une gaine de polysaccharides synthétisée par le cytoplasme de l'hôte (Newcomb et al., 1981) ;

- des vésicules dont la forme varie selon la plante hôte. Ces vésicules sont : (1) rondes et septées chez Alnus (Becking et al., 1964), Elaeagnus (Henry, 1978), Hippophaë (Gardner, 1976) et Discaria (Newcomb et Pankhurst, 1982a), (2) rondes non-septées chez Dryas (Newcomb, 1981) et Ceanothus (Strand et Laetsch, 1977), (3) oblongues chez Comptonia (Newcomb et al., 1978), Myrica (Mian et al., 1976) et Coriaria (Newcomb et Pankhurst, 1982b). De nombreux travaux suggèrent que les vésicules sont le site de la fixation de l'azote tant au niveau des nodules (Mian et al., 1976 ; Baker et al., 1980 ; Schwinter et al., 1982 ; Van Straten et al., 1977 ; Benson et al., 1979) que chez les Frankia cultivés in vitro (Tjepkema et al., 1980, 1981 ; Gauthier et al., 1981a, 1983 ; Tisa et al., 1983).

- des sporanges : ces structures sont absentes chez beaucoup d'espèces. Dans le cas des Alnus, elles peuvent être présentes ou absentes : on parle alors de nodules spore (+) ou spore (-) (Van Dijk, 1978). Les spores ne sont relachées des sporanges que dans les cellules lysées de l'hôte (Suetin et al., 1979).

2.1. Structure du nodule de Casuarina equisetifolia

Contrairement aux nodules des autres plantes actinorhiziennes, les nodules de Casuarina ne possèdent pas des structures comparables aux vésicules (Tyson et Silver, 1979, Torrey, 1976, Newcomb et al., 1981). Comme ces auteurs, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de vésiculés dans les coupes de nodules de C. equisetifolia observées en microscopie électronique (Figure 5).

L'absence de vésicules dans les nodules de C. equisetifolia pose le problème du site de la nitrogénase dans ce type de nodule. Deux hypothèses peuvent être formulées : (1) les vésicules dans les nodules de Casuarina, ont des formes qui les rendent difficiles à différencier des hyphes. Cette hypothèse est basée sur le fait que toutes les souches isolées de nodules de Casuarina sont capables de former des vésicules in vitro (voir chapitre III) ; on peut donc supposer qu'une structure existante chez l'endophyte cultivé in vitro pourrait être présente chez l'endophyte in planta, (2) les vésicules pourraient être remplacées chez Casuarina, par une subérisation importante des parois des cellules infectées (H. Berg, 1983) liée à la présence d'une hémoglobine (Tjepkema, 1983).

2.2. Infectivité et spectre d'hôte du broyat de nodule de Casuarina equisetifolia

Les résultats concernant les isollements de Frankia à partir de nodules de C. equisetifolia (Chapitre I) nous ont conduit à étudier en détail le spectre d'hôte du broyat de nodules de Casuarina.

Le tableau 5 rapporte l'effet de l'inoculation par le broyat de nodules de Casuarina equisetifolia sur différentes plantes actinorhiziennes représentant plusieurs famille (Casuarinacées, Elaeagnacées, Bétulacées et Rosacées).

Parmi les espèces appartenant à la famille des Casuarinacées, on distingue trois groupes en fonction de

leur réponse à l'inoculation par le broyat de nodules de Casuarina equisetifolia :

- les espèces appartenant au genre Casuarina. Ces espèces nodulent toutes à 100 % ;
- certaines espèces appartenant au genre Allocasuarina qui présentent de faibles pourcentages de nodulation (20-30 %) ;
- certaines espèces appartenant au genre Allocasuarina et le Gymnostoma deplancheana, qui ne nodulent pas dans ces conditions.

En ce qui concerne les autres familles de plantes actinorhiziennes, on constate que les broyats de nodules de C. equisetifolia sont incapables d'induire la nodulation d'Alnus glutinosa ou de Purshia tridentata mais peuvent provoquer la nodulation d'Hippophaë rhamnoides appartenant à l'ordre des Rhamnales. Ceci est très surprenant car les Casuarinacées et les Rhamnales sont des plantes ayant des aires de distribution géographique très éloignées et aucun lien phylogénétique.

Enfin, les broyats de nodules d'Hippophaë rhamnoides sont incapables de provoquer la nodulation de Casuarina equisetifolia.

Ces résultats nous conduisent à formuler les conclusions suivantes : (1) il existe des barrières d'incompatibilité au sein de la famille des Casuarinacées, (2) une transgression uni-directionnelle Casuarina-Hippophaë est possible. Une explication plausible de ces résultats serait la cohabitation, au sein du nodule de Casuarina, de différentes souches de Frankia. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié en détail les spectres d'hôte des souches de Frankia de type I et II isolées des nodules de C. equisetifolia (Chapitre I).

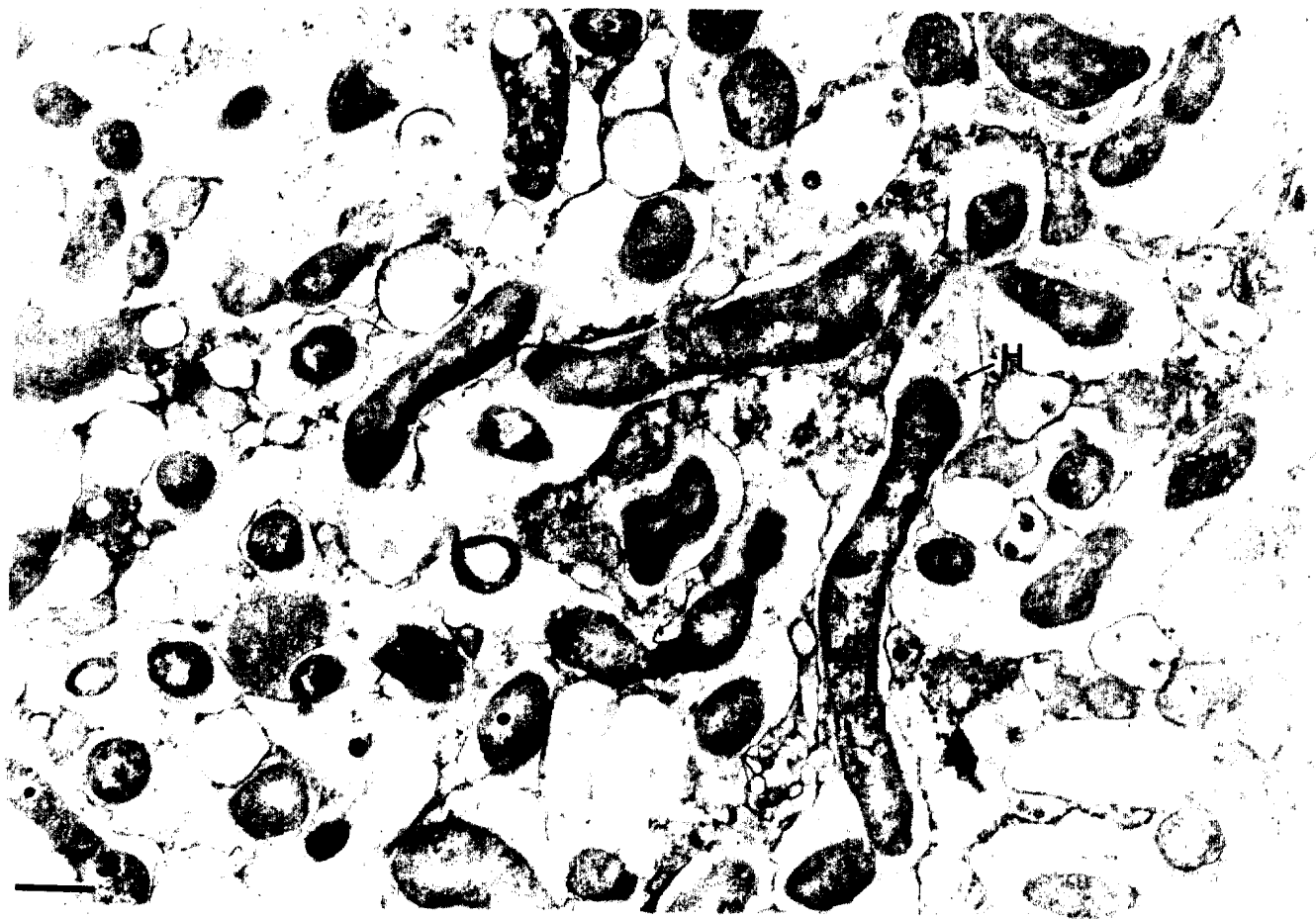


FIGURE 5. Observation en microscopie électronique de transmission, d'une coupe de nodule de Casuarina equisetifolia. H : hyphe. La barre représente 1 μm . La technique de préparation des échantillons est décrite dans l'article n°5.

3. Etude d'une souche de Frankia de type morphologique I, isolée de nodules de Casuarina equisetifolia : Frankia ORS020602 (syn. D11) (Articles 3 et 4).

3.1. Infectivité, effectivité et spectre d'hôte de ORS020602.

La souche ORS020602 isolée de broyats de nodules de C. equisetifolia s'est montrée incapable de noduler sa plante d'origine ni aucun membre de la famille des Casuarinacées. Par contre, cette souche peut induire la formation de nodules effectifs chez Hippophaë rhamnoides, Elaeagnus angustifolia et Colletia spinosissima qui sont trois représentants de l'ordre des Rhamnales (Tableau 6). Cette capacité à noduler d'autres plantes que son hôte d'origine semble restreinte à l'ordre des Rhamnales car ORS020602 est incapable de noduler les espèces actinorhiziennes, appartenant à d'autres familles telles que, Alnus glutinosa (Bétulacée) ou Purshia tridentata (Rosacée).

Le même spectre d'hôte, restreint aux Rhamnales se retrouve chez toutes les souches isolées de nodules de Casuarina et ayant une morphologie de type I. Le tableau 7 rapporte les pourcentages de nodulation ainsi que les activités réductrices d'acétylène des nodules obtenus après inoculation d'Hippophaë rhamnoides par ces différentes souches.

Les pourcentages de nodulation obtenus après inoculation de H. rhamnoides par les souches de types I sont très variables (8 % à 70 %) et inférieurs à ce qui est obtenu par inoculation avec la souche ORS140101 (syn. H13) qui est l'endophyte spécifique de H. rhamnoides. En ce qui concerne l'effectivité des nodules (ARA), elle est à peu près aussi bonne chez les nodules induits par les Frankia de Casuarina de type I que chez les nodules induits par ORS140101. On peut donc penser que les souches de type I, bien qu'ayant une infectivité moindre que celle de l'endophyte vrai de H. rhamnoides (probablement liée à des problèmes de reconnaissance Frankia-hôte), conduisent à une

Tableau 5. Spectre d'hôte du broyat de nodules de
Casuarina equisetifolia

| <u>Espèces actinorhiziennes</u> ⁽¹⁾ | <u>Nodulation</u> ⁽²⁾ |
|--|----------------------------------|
| <i>Casuarina equisetifolia</i> | + (10/10) |
| <i>Casuarina cunninghamiana</i> | + (10/10) |
| <i>Casuarina obesa</i> | + (10/10) |
| <i>Allocasuarina torulosa</i> | + (2/10) |
| <i>Allocasuarina verticillata</i> (stricta) | + (3/10) |
| <i>Allocasuarina littoralis</i> | - (0/10) |
| <i>Gymnostoma deplanchiana</i> | - (0/10) |
| <i>Hippophaë rhamnoides</i> (Elaeagnacée) | + (6/10) |
| <i>Alnus glutinosa</i> (Bétulacée) | - (0/10) |
| <i>Purshia tridentata</i> (Rosacée) | - (0/10) |

(1) Cultures des plantes hôtes: nous avons utilisé la méthode mise au point par Gibson en 1963 (voir article 4)

(2) Les différentes plantules ont été inoculées par des nodules de Casuarina equisetifolia stérilisés superficiellement puis broyés dans de l'eau stérile. Pour chaque espèce, nous avons effectué 10 répétitions. Le nombre de plantes nodulées a été estimé 3 mois après l'inoculation.

(+): nodulation; (-) absence de nodulation.

Tableau 6. Spectre d'hôte de la souche de Frankia
ORS020602 (syn.D11) isolée de nodule de
C. equisetifolia

| Espèces actinorhiziennes ⁽¹⁾ | Nodulation ⁽²⁾ |
|---|---------------------------|
| <i>Casuarina equisetifolia</i> | - |
| <i>Allocasuarina torulosa</i> | - |
| <i>Hippophaë rhamnoides</i> | + |
| <i>Elaeagnus angustifolia</i> | + |
| <i>Colletia spinosissima</i> | + |
| <i>Alnus glutinosa</i> | - |
| <i>Purshia tridentata</i> | - |

(1) Voir tableau 5

(2) (+): nodulation; (-): absence de nodulation

Tableau 7. Nodulation d'Hippophaë rhamnoides par différents Frankia de Casuarina de type morphologique I.

| Inoculums ⁽¹⁾ | Pourcentage de plants nodulés ⁽²⁾ | ARA spécifique ⁽³⁾ (μ moles C_2H_4 /h/g poids sec de nodule) |
|---|--|---|
| Témoin non inoculé | 0 (45) | 0 |
| Souches de type I isolées de nodules de <u>C. equisetifolia</u> | | |
| ORS020601 (syn.D1) | 16 (19) | 42 \pm 21 |
| ORS020602 (syn.D11) | 57 (66) | 60 \pm 19 |
| ORS020610 (syn.§1) | 8 (12) | 36 \pm 30 |
| ORS020603 (syn.G1) | 33 (12) | 43 \pm 20 |
| ORS020604 (syn.G2) | 44 (16) | 37 \pm 25 |
| ORS020605 (syn.P1) | 70 (13) | 60 \pm 24 |
| Souche isolée de nodules d' <u>Hippophaë rhamnoides</u> | | |
| ORS140101 | 100 (20) | 64 \pm 37 |

(1) Les différentes souches de Frankia ont été cultivées sur milieu QMOD, 15 jours à 30°C, puis centrifugées, resuspendues dans de l'eau distillée stérile et homogénéisées. Quelques gouttes de ces suspensions ont été utilisées pour inoculer les plantules de Hippophaë rhamnoides

(2) Voir Tableau 5; entre parenthèses: nombre de plants testés.

(3) A.R.A. : Activité réductrice d'acétylène.

symbiose aussi efficiente que celle obtenue avec l'endophyte isolé d'H. rhamnoides (ORS140101).

3.3. Structure des nodules obtenus par inoculation d'Hippophaë rhamnoides avec la souche ORS020602 (syn. D11).

L'observation en microscopie électronique de coupes de nodules d'Hippophaë rhamnoides induits par le Frankia ORS020602 (figure 6a), par des broyats de nodules d'Hippophaë rhamnoides (Figure 6b) ou par la souche ORS140101, isolées de nodules d'Hippophaë rhamnoides (Figure 6c), montre les mêmes structures. En particulier, on peut observer une grande quantité de vésicules septées contrairement à ce que l'on a observé chez C. equisetifolia où seules les hyphes sont visibles.

Le fait que la souche ORS020602 isolée d'un nodule de C. equisetifolia, où il n'y a pas de structures assimilables aux vésicules, puisse former des vésicules typiques quand son hôte est Hippophaë rhamnoides suggère fortement que la morphologie de l'endophyte est sous le contrôle de la plante-hôte.

4. Etude d'une souche de Frankia de type morphologique II, isolée de nodules de Casuarina : Frankia ORS021001 (syn. Cj1-82) (articles 2 et 4).

4.1. Infectivité, effectivité et spectre d'hôte.

La souche ORS021001 s'est montrée infective et effective sur Casuarina equisetifolia. L'infection de C. equisetifolia par ORS021001 se fait par l'intermédiaire des poils obsorbants racinaires comme c'est le cas chez plusieurs autres plantes actinorhiziennes telles que Comptonia, Alnus et Myrica (Callaham et al., 1979).

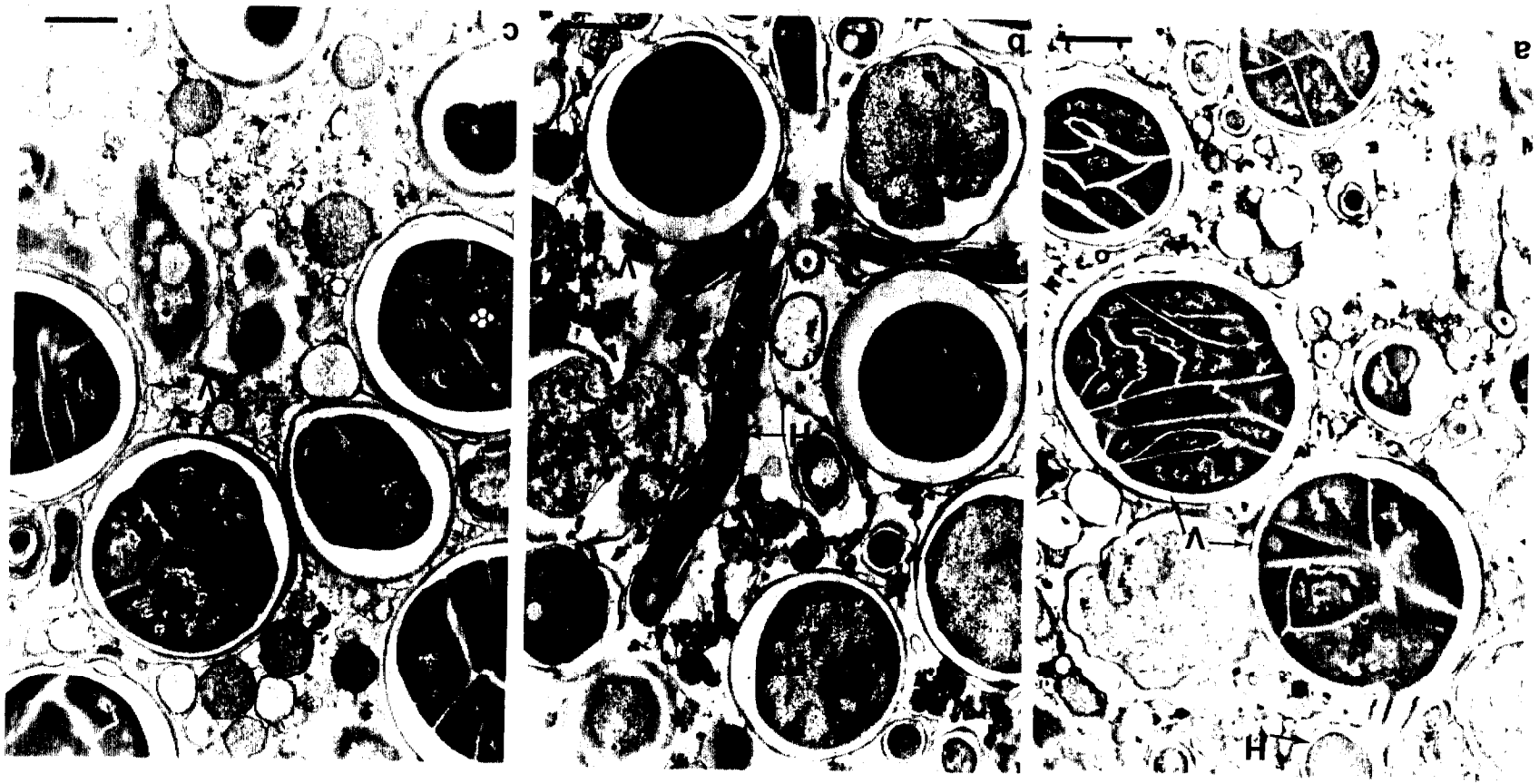


FIGURE 6. Observation en microscopie électronique de transmission de coupes de nodules d'Hippoboscidae obtenus par inoculation avec : (6a) : souche ORS20602 (syn.D11), (6B) : broyat de nodules d'*H. rhamnoides*, (6c) : souche ORS140101 (syn.H13).
 H : hyphes; V : vésicule. Dans les 3 cas, la barre représente 1 µm.

4.1.1. Etapes préliminaires de la nodulation (art. 2)

La déformation des poils absorbants est visible dans les 2 jours suivant l'inoculation. Lorsque l'inoculum est constitué par un fragment de colonie, les poils convergent en se courbant vers ce fragment et l'entourent, ce qui suggère l'intervention d'un processus de tactisme. Ultérieurement, les extrémités d'un certain nombre de poils se recourbent en crosse. De 7 à 10 jours après l'inoculation, les hyphes de Frankia se développent dans la crosse où s'accumulent des substances supposées de même nature que la paroi des poils (Callaham et al., 1978). Chaque poil absorbant contient une ou plusieurs hyphes infectieuses (équivalent du cordon infectieux des légumineuses) qui envahissent les cellules corticales de la racine en s'y ramifiant. Environ 10 jours après la déformation des poils, la base de la racine latérale se gonfle à la suite de la prolifération et de l'hypertrophie des cellules corticales. L'initiation du nodule peut résulter d'une infection simultanée de plusieurs poils, ce qui suggère que les nodules de Casuarina pourraient abriter une population mixte de Frankia. En général, sur chaque racine latérale, il se forme au début seulement un nodule à un lobe, mais parfois d'autres lobes peuvent se juxtaposer, chacun étant surmonté d'une racine nodulaire à croissance limitée.

L'activité fixatrice d'azote spécifique des nodules, appréciée par la réduction de C_2H_2 , s'élève 24 umoles de C_2H_4 par gramme (poids sec) et par heure, ce qui indique que la souche ORS021001 (syn. Cj1-82) est infective et effective.

A partir de ces nodules, nous avons réisolé une souche de Frankia ayant les mêmes caractéristiques que la souche ORS021001. Cet isolat s'est montré infectif et effectif vis-à-vis de Casuarina equisetifolia. On peut donc affirmer que dans le cas de ORS021001 nous avons répondu aux conditions du postulat de Koch.

Tableau 8. Spectre d'hôte de la souche ORSO21001
(syn. Cj1-82) isolée de nodules de Casuarina

| Espèces actinorhiziennes ⁽¹⁾ | Nodulation ⁽²⁾ |
|---|---------------------------|
| <i>Casuarina cristata</i> | + |
| <i>Casuarina cunninghamiana</i> | + |
| <i>Casuarina equisetifolia</i> | + |
| <i>Casuarina glauca</i> | + |
| <i>Casuarina junghuhniana</i> | + |
| <i>Casuarina obesa</i> | + |
| <i>Allocasuarina decaisneana</i> | - |
| <i>Allocasuarina distyla</i> | - |
| <i>Allocasuarina fraseriana</i> | - |
| <i>Allocasuarina huegeliana</i> | - |
| <i>Allocasuarina littoralis</i> | - |
| <i>Allocasuarina verticillata</i> (stricta) | - |
| <i>Allocasuarina torulosa</i> | - |
| <i>Gymnostoma deplancheana</i> | - |
| <i>Hippophaë rhamnoides</i> (Elaeagnacée) | - |
| <i>Colletia spinosissima</i> (Rhamnacée) | - |
| <i>Alnus glutinosa</i> (Betulacée) | - |
| <i>Purshia tridentata</i> (Rosacée) | - |

(1) Voir Tableau 5.

(2) (+): nodulation; (-) absence de nodulation

4.1.2. Spectre d'hôte de la souche ORS021001

Le tableau 8 rapporte le spectre d'hôte de la souche ORS021001. On peut remarquer que ce spectre d'hôte est très spécifique et se limite aux espèces appartenant au genre Casuarina sensu stricto. Aucune espèce appartenant au genre Allocasuarina ou au genre Gymnostoma ne peut être nodulée par cette souche. Enfin, ORS021001 est incapable de noduler les représentants de l'ordre des Rhamnales (qui comprend les familles des Elaeagnacées et des Rhamnacées) ni ceux d'autres familles testées par nous, telles que Purshia tridentata (Rosacée) ou Alnus glutinosa (Bétulacée).

4.2. Structure des nodules induits sur les casuarinas par ORS021001

Comme dans le cas des nodules de Casuarina obtenus par inoculation avec des broyats de nodules, les nodules induits par ORS021001 ne renferment que des hyphes (Figure 7) sans aucune structure pouvant rappeler les vésicules rencontrées dans les nodules des autres plantes actinorhiziennes. Ce résultat confirme les observations effectuées sur des nodules sauvages. Il semble donc que l'absence de vésicules dans les nodules de Casuarina soit un caractère spécifique à ce genre.

L'absence de vésicules dans les nodules de Casuarina induit par ORS021001 est d'autant plus étonnant du fait que cette souche est capable de produire des vésicules in vitro (Gauthier et al., 1984a) et dans la rhizosphère du Casuarina (Diem et al., 1983). On constate, une fois de plus, que la morphologie du Frankia est sous la dépendance de la plante hôte.

5. Etude de deux souches de Frankia isolées de nodules de Rhamnales : Hippophaë rhamnoides et Colletia spinosissima (article 4).

Les souches ORS140101 et ORS060501 isolées respectivement de nodules d'Hippophaë rhamnoides et de Colletia



FIGURE 7. Observation en microscopie électronique à balayage de nodule de Casuarina obesa induit par Frankia ORSO21001 (syn.CJ-1-82). La barre représente 5 μm . Les échantillons ont été préparés selon la méthode décrite par Tessier et Berrier (1979).

spinosissima ont le même spectre d'hôte puisqu'elles nodulent toutes deux Elaeagnus angustifolia, Hippophaë rhamnoides et Colletia spinosissima à l'exclusion des autres plantes actinorhiziennes testées : Casuarina equisetifolia, Allocasuarina torulosa et Purshia tridentata.

Les figures 8 et 9 rapportent les structures rencontrées dans les nodules de Rhamnales : hyphes, vésicules, sporanges.

Le fait, que les Frankia isolés de nodules de Rhamnales géographiquement très éloignées (Hippophaë et Colletia étant respectivement une plante européenne et une plante sud-américaine) aient la même spectre d'hôte, suggère que ces Frankia pourraient former un groupe d'inoculation croisée très homogène. Des études d'inoculation d'Hippophaë et de Colletia, par des souches de Frankia isolées de nodules de plantes actinorhiziennes n'appartenant pas à l'ordre des Rhamnales, sont venues conforter cette hypothèse. En effet, les Frankia isolés de Myricales (Cp11 et Mg11), d'une Fagale (Av11), d'une Rosale (Pt11) ou de Casuarinacées (ORS021001) sont incapables de noduler ces deux espèces.

Cependant, l'existence de la souche ORS020602, isolée de Casuarina mais capable de noduler le groupe des Rhamnales, montre les limites de la notion de groupe d'inoculation croisée et suggère l'existence d'un continuum reliant les Frankia isolés de Rhamnales à certaines souches isolées de nodules de Casuarinacées. Cette situation n'est pas sans rappeler le continuum qui s'étend des Rhizobium japonicum typique aux Rhizobium cowpea (Bromfield and Roughley, 1980 ; Jara, 1981.)

6. Frankia en tant que microorganisme rhizosphérique (article 5).

Selon certains auteurs (Akkermans, 1978), le Frankia posséderait une vie saprophytique qui lui permettrait de se développer dans le sol en l'absence de toute plante



FIGURE 8. Observation en microscopie électronique de transmission, d'une coupe de nodule d'Hippophaë rhamnoides. V : vésicule; H : hyphe; VL : vésicule lysée. La barre représente 1 μm .



FIGURE 9. Observation en microscopie électronique à balayage de nodule de Colletia spinosissima. H : hyphe, V : vésicule, Sp : sporange. La barre représente 2 μm .

Tableau 9 . Effet de l'inoculation par Frankia sur l'activité réductrice d'acétylène de la rhizosphère de plants de riz (var. Moroberekan).

| Inoculum ⁽¹⁾ | Activité réductrice d'acétylène ⁽²⁾ nmoles C ₂ H ₄ /h/g de racine (poids sec) |
|---------------------------------------|---|
| Témoin non inoculé | 1560 ± 198 |
| Inoculation par <u>Frankia</u> : | |
| ORSO20602 (syn D11) | 2870 ± 1055 |
| ORSO20604 (syn G2) | 2336 ± 911 |
| Inoculation par <u>Azospirillum</u> : | |
| souche 7000 | 6460 ± 2090 |

(1) Les cultures d'Azospirillum et de Frankia (D11 et G2) ont été centrifugées, resuspendues dans de l'eau distillée stérile et incorporées au sol stérile à raison de 10⁸ bactéries par gramme de sol pour Azospirillum et de 20mg (Poids humide) par gramme de sol pour les Frankia. Les témoins ont reçu un inoculum autoclavé. Nous avons effectué 12 répétitions par traitement.

(2) Mesures de l'ARA rhizosphérique: elles ont été faites sur des systèmes "sol-riz" au stade plantule de 3 semaines (tubes de 14x220mm comprenant environ 20 g de sol). L'incubation sous acétylène a été effectuée au moyen d'un dispositif dans lequel le système racinaire est placé en anaérobiose, et les parties aériennes dans l'air (Raimbault et al., 1977).

hôte. Ceci expliquerait la conservation du pouvoir infectieux noté pour certains sols dépourvus de la plante hôte depuis plusieurs dizaines d'années dans le cas de l'Aulne (Akkermans et Van Dijk, 1981), ou depuis plus de 100 ans dans le cas de Ceanothus (Wollum et al., 1968).

Notre observation de plants de Casuarina equisetifolia nodulés et cultivés sur milieu sans azote, montre que le Frankia de Casuarina peut sortir du nodule et envahir, en partie, le système racinaire de la plante. Une fois sorti du nodule, le Frankia "extra-nodulaire" prolifère sur le nodule et sur les racines adjacentes en les couvrant d'un manchon formé d'hyphes portant des sporanges et des vésicules. Ce Frankia "extra-nodulaire" a gardé tout son pouvoir infectif car il est capable de noduler à nouveau des plants axéniques de Casuarina equisetifolia.

Cette prolifération du Frankia dans la rhizosphère liée à la présence de nombreuses vésicules (sites de la fixation d'azote) conduit à supposer que le Frankia outre son existence d'endophyte, pourrait se comporter comme une bactérie rhizosphérique de type "fixateur libre" d'azote.

Le tableau 9 rapporte l'effet de l'inoculation de plants de riz par deux Frankia de Casuarina ; on peut noter que l'effet de cette inoculation est une augmentation de l'activité réductrice d'acétylène du système, ce qui suggère que le Frankia, dans ces conditions, développe une activité fixatrice d'azote.

Si cette prolifération "extra-nodulaire" se produit dans les conditions naturelles, on peut penser que cela contribue grandement à la dissémination de cet actinomycète dans le sol. Enfin, on peut supposer que le Frankia est susceptible de posséder un cycle lui permettant d'être alternativement symbiote ou fixateur d'azote libre. Cette dernière forme lui permettant de coloniser les milieux naturels en infectant d'autres casuarinas voisins et en dissimulant dans le sol des spores et des SLS qui pourront germer dès que les conditions s'y prêteront.

Tableau 10. Spectres d'hôte du broyat de nodule de Casuarina et des deux types de souches de Frankia isolés de nodules de Casuarina.

| Espèces actinorhiziennes ⁽¹⁾ | Inoculum ⁽²⁾ | | |
|--|--|---------------------------|------------------------|
| | Broyat de nodules de <i>C.equisetifolia</i> | ORS021001 (syn.Cj1-82) | ORS020602 (syn.D11) |
| <i>Casuarina equisetifolia</i> | + | + | - |
| <i>Allocauarina torulosa</i> | + | - | - |
| <i>Allocauarina littoralis</i> | - | - | - |
| <i>Gymnostoma deplanchiana</i> | - | - | - |
| <i>Hippophaë rhamnoides</i> | + | - | + |

(1) Voir Tableau 5.

(2) (+): nodulation; (-): absence de nodulation

7. Discussion et conclusion

7.1. Infection multiple du nodule de Casuarina equisetifolia

Le tableau 10 montre clairement que le spectre d'hôte du broyat de nodules de C. equisetifolia est plus large que ceux réunis des deux types de souches isolées de nodules de C. equisetifolia (ORS020602 et ORS021001). Ceci conduit à formuler l'hypothèse de l'existence d'un troisième type de souches de Frankia de Casuarina capable de noduler Allocasuarina torulosa.

La présence simultanée de plusieurs souches de Frankia au sein de nodules de Casuarina semble être la règle car récemment Zhang Zhongze et al. (1984) ont confirmé nos résultats en isolant de nodules de Casuarina cunninghamiana deux types de souche, l'un nodulant Casuarina uniquement et l'autre ne nodulant que les Rhamnales (Hippophaë et Elaeagnus).

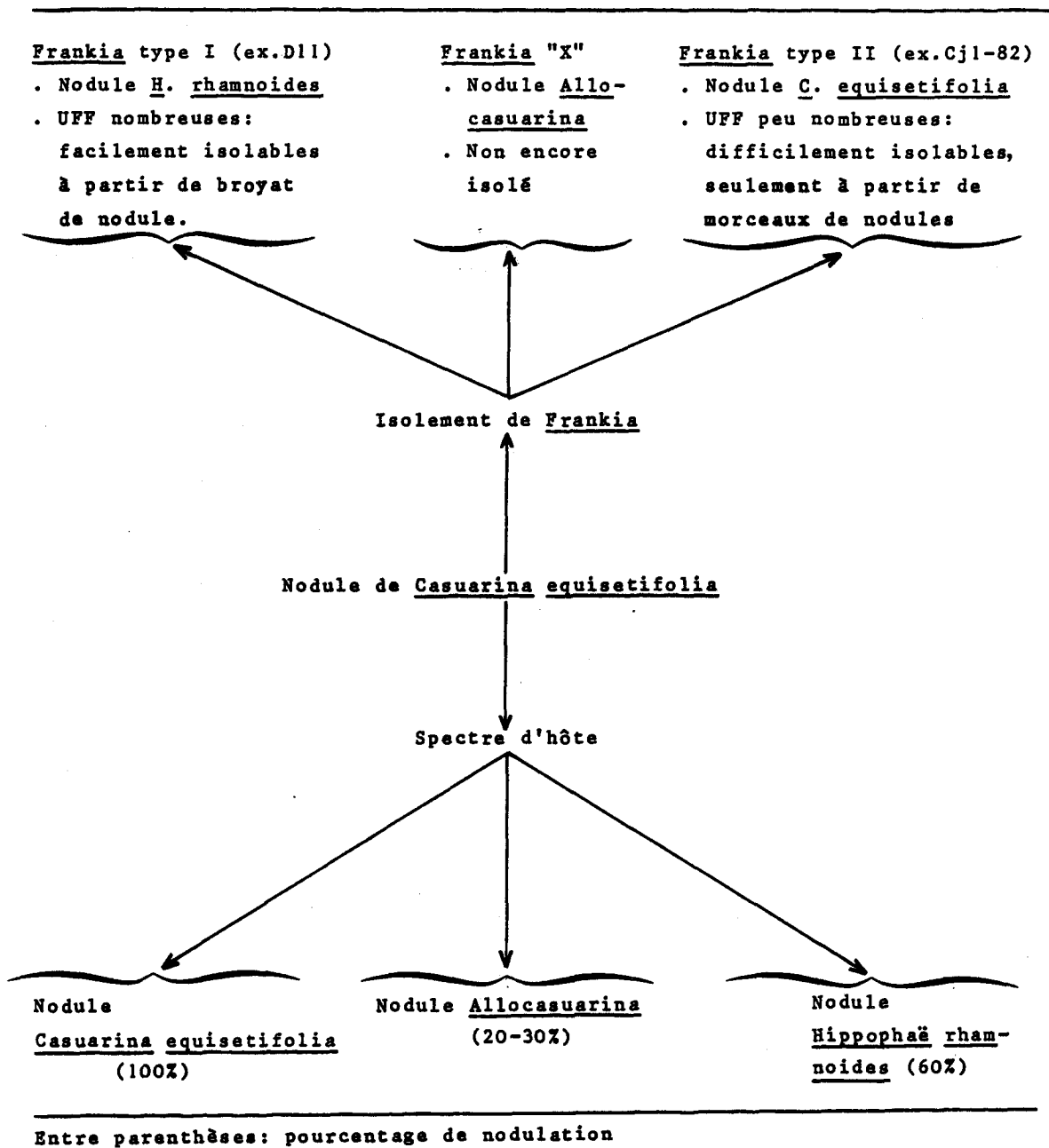
La multiple infection d'un nodule n'est pas une chose surprenante en soit car elle a été observée à la fois chez les non-légumineuses telles qu'Alnus (Lechevalier, 1983) et chez les légumineuses (Van Rensburg, 1972). Ce qui est paradoxal, dans le cas de Casuarina, c'est que des souches non-infectives (ORS020602) vis-à-vis de Casuarina et présentes dans les nodules de cette plante puissent noduler une autre famille de plantes. Une telle situation ne se retrouve pas dans le cas de la symbiose Rhizobium-légumineuse où les diverses souches présentes dans un nodule sont infectives ou non infectives vis-à-vis de leur plante-hôte uniquement.

La figure 10 résume les résultats obtenus concernant : (1) le spectre d'hôte du broyat du nodule de Casuarina equisetifolia, les différents types de souches de Frankia isolées des nodules de C. equisetifolia.

Ces résultats nous conduisent à formuler les hypothèses suivantes :

- les souches de Frankia du type morphologique II

Figure 10. Spectre d'hôte des nodules de Casuarina equisetifolia et souches de Frankia isolables de ces nodules



(ORS021001) sont les endophytes vrais du genre Casuarina.

- les souches de Frankia du type morphologique I (ORS020602, par exemple) ne sont pas les endophytes vrais du genre Casuarina puisqu'elles ne nodulent que certaines espèces appartenant à l'ordre des Rhamnales. On peut se demander, en particulier, quelle est l'origine des souches du type ORS020602 (syn. D11) et qu'elle est la raison qui conduit au maintien de cette population de Frankia dans les nodules de Casuarina.

- il existe dans les nodules de Casuarina, un troisième type de souches ("X") capables de noduler certains Allocasuarina (stricta et torulosa).

Une hypothèse qui, à notre avis, pourrait expliquer cette situation complexe, serait que les souches de type I et "X" seraient des mutants de l'endophyte du Casuarina : souche ORS021001 (type II).

Deux voies de recherche pourront permettre de vérifier cette hypothèse :

- isolement à partir de nodules de Casuarina d'une souche capable de noduler à la fois Casuarina, Allocasuarina (stricta et torulosa) et certaines Rhamnales (Hippophaë, Elaeagnus, Colletia) ;

- sélection, à partir de culture de l'endophyte de Casuarina (ORS021001) in vitro, de mutants capables de noduler Hippophaë rhamnoides, Allocasuarina stricta, ou les deux à la fois.

7.2. Continuum Casuarina-Rhamnales.

La comparaison des spectres d'hôte, de la souche de Frankia ORS020602 (syn. D11) isolée de nodules de Casuarina, et de ceux de souches de Frankia isolées de Colletia spinosissima (ORS060501) et d'Hippophaë rhamnoides (ORS140101) nous a conduit à suggérer l'existence d'un continuum reliant les Frankia typiques des Rhamnales à certains Frankia isolés de nodules de Casuarina.

L'existence de ce continuum montre l'impossibilité de classifier les souches de Frankia en fonction de leur hôte d'origine. Cette classification devra faire appel

à des méthodes telles que la taxonomie, la sérologie ou les hybridations d'ADN par exemple.

On doit cependant noter que les spectres d'hôtes des Frankia de Casuarina de types morphologiques I et II sont complètement différents, ce qui montre que la morphologie des Frankia in vitro n'est pas un caractère à négliger lors de la classification des souches.

7.3. Existence d'une forme de Frankia "extra-nodulaire"

Nous avons montré que, dans certaines conditions, le Frankia pouvait sortir du nodule et se propager dans la rhizosphère de sa plante hôte où il produit des vésicules en abondance. Il est possible que sous sa forme "extra-nodulaire", le Frankia se comporte comme un fixateur d'azote libre. Cette forme saprophytique, du Frankia de Casuarina, contribue probablement à la dissémination de cet actinomyète dans le sol.

Cette capacité de Frankia à se comporter comme un microorganisme rhizosphérique a été observée chez d'autres plantes actinorhiziennes telles que l'Aulne (Rossi, 1964, Lalonde, 1980) et Comptonia (Callaham et al., 1979).

D'autres part, l'utilisation par Frankia in vitro d'acides organiques et d'acides gras comme source de carbone (voir chapitre III) vient encore renforcer les possibilités concernant la vie rhizosphériques des Frankia. En effet, ces composés sont des métabolites présents dans les exudats racinaires (Rovira, 1965 ; Stevenson, 1967) et dans les sols où ils sont le produit du métabolisme d'autres microorganismes (Stevenson, 1967).

Une telle prolifération d'un endophyte dans la rhizosphère de sa plante-hôte a été également décrit dans le cas des symbioses légumineuses-Rhizobium (Schmidt, 1978).

7.4. La morphologie des Frankia est sous la dépendance de la plante hôte

Plusieurs résultats, rapportés dans ce chapitre,

nous on conduit à cette conclusion, à savoir :

- la souche ORS021001 (syn. Cj1-82) ne produit pas de vésicules quand elle est endophyte de Casuarina. Cette même souche produit des vésicules en abondance quand elle est dans la rhizosphère de Casuarina (Diem et al., 1983) ou quand elle est cultivée in vitro en milieu dans azote (voir chapitre III) ;

- la morphologie du Frankia "extra-nodulaire" vient aussi confirmer l'effet de l'hôte sur l'endophyte car dès que le Frankia sort du nodule et va dans la rhizosphère, sa morphologie est profondément modifiée (apparition de vésicules et de sporanges).

Cet effet de la plante-hôte sur la morphologie du Frankia a été d'autre part décrit chez la souche Cp11 isolée de nodule de Comptonia. Ce Frankia forme des vésicules sphériques quand il est en symbiose avec Alnus et des vésicules allongées quand il est en symbiose avec Comptonia ou Myrica (Akkermans et al., 1983).

Ces résultats sont à rapprocher de ceux décrits par Dart (1977) chez les légumineuses où la même souche de Rhizobium forme : (1) des bactéroïdes ronds, au nombre de un par "membrane-péribactéroïde" quand elle est symbiote d'Arachis hypogea, (2) des bactéroïdes de formes allongées, regroupés à plusieurs dans chaque "membrane-péribactéroïde", quand elle est symbiote de Vigna mungo.

CHAPITRE III
PHYSIOLOGIE DES FRANKIA CULTIVES IN VITRO

1. Introduction

L'isolement, depuis 1978, de plus de 100 souches de Frankia provenant d'une grande variété d'hôtes (Torrey et Tjepkema, 1983) a permis d'initier des recherches en vue d'élaborer une taxonomie du genre Frankia.

Les méthodes concernant la classification et l'identification des Frankia connaissent un développement constant. Parmi les nombreux critères de classification utilisées, les caractéristiques physiologiques des Frankia cultivée in vitro ont été largement employées et ont conduit certains auteurs (Lechevalier et al., 1983) à proposer de séparer les Frankia en deux types physiologiques A et B sur la base de leur sensibilité à l'oxygène et de leur capacité à utiliser les hydrates de carbone.

En 1980, quand nous avons commencé notre étude sur la symbiose Frankia-Casuarina, il n'existait que peu d'informations concernant la croissance et la physiologie des Frankia cultivés in vitro. Les milieux de culture utilisés étaient très complexes, le plus souvent à base de peptone et d'extrait de levure supplémenté de lécithine (Lalonde et Calvert, 1979) ou d'extraits alcooliques de racines (Quispel et Tak, 1978).

Afin de se faire une idée plus précise de la physiologie des Frankia in vitro, il nous a paru nécessaire de mettre au point des milieux synthétiques simples qui permettent la croissance de cet endophyte.

Les résultats présentés dans ce chapitre concernent les études que nous avons menées au sujet des propriétés nutritionnelles, des conditions de croissance, de la physiologie de la fixation de l'azote et des voies initiales de l'assimilation de l'azote chez les diverses souches de Frankia isolées au cours de ce travail.

Tableau 11: Effet des différentes composantes du milieu QMOD sur la croissance du Frankia ORS020602 (syn D11).

| Milieu | Poids sec (mg) ⁽¹⁾ |
|--|-------------------------------|
| (1) = base phosphate + Glucose | 57 |
| (2) = (1)+ Extrait de levure | 65 |
| (3) = (2)+ Bactopeptone | 62 |
| (4) = (3)+ Citrate ferrique | 57 |
| (5) = (4)+ Oligo-éléments | 68 |
| (6) = (5)+ CaCO ₃ | 63 |
| (7) = (6)+ Lecithine = QMOD ⁽²⁾ | 70 |

(1) Poids sec: total de 10 tubes contenant 10ml de milieu.

.Remarque: les résultats présentés dans les tableaux suivants étant exprimés soit par rapport au poids de matière sèche, soit par rapport à la quantité de protéine, le lecteur pourra passer de l'un à l'autre en utilisant le rapport suivant :

$$\frac{\text{Poids matière sèche}}{\text{Poids protéine}} = 6 \text{ à } 8.$$

(2) Composition du milieu QMOD (g l⁻¹): K₂HPO₄: 0,3; NaH₂PO₄: 0,2; MgSO₄, 7H₂O: 0,2; KCl: 0,2; extrait de levure: 0,5; Bacto-peptone: 1; Citrate ferrique (à 1%): 1ml; solution d'oligo-éléments ⁽³⁾: 1ml; Glucose: 2; CaCO₃: 0,1; Lécithine: 0,005; pH: 7.

(3) Solution d'oligo-éléments (g l⁻¹): H₃BO₃: 1,5; MnSO₄, 7H₂O: 0,8; ZnSO₄, 7H₂O: 0,6; CuSO₄, 7H₂O: 0,1; (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 4H₂O: 0,2; CoSO₄, 7H₂O: 0,01.

2. Etude in vitro d'une souche de Frankia, de type morphologique I, isolée de nodules de Casuarina : ORSO20602 (syn. D11).

2.1. Propriétés nutritionnelles

2.1.1. Croissance sur milieu complexe (QMOD).

Le milieu QMOD (Lalonde et Calvert, 1979) utilisé pour l'isolement de la plupart des souches de Frankia, étudiées dans ce travail, permet une croissance correcte de la souche ORSO20602. En milieu QMOD liquide, cette souche se présente sous la forme de colonies floconneuses qui précipitent au fond des tubes sans provoquer aucune turbidité du milieu. Les températures comprises entre 12°C et 41°C ainsi que les pH compris entre 6,5 et 8,5 permettent une croissance appréciable. Cependant, les conditions de croissance optimales se situent à 30°C et à un pH proche de la neutralité. En prenant pour base le poids sec, on peut estimer le temps de doublement à 2-3 jours sur milieu QMOD liquide à 30°C. En général, la croissance du Frankia s'arrête après 5 ou 6 générations, il est donc avantageux, de ce fait, de procéder à des inoculations massives du milieu. En étudiant l'effet des différents composants du milieu QMOD, sur la croissance de l'ORSO20602 (Tableau 11), on en déduit aisément que l'utilisation d'un milieu aussi complexe n'est pas justifiée. Il nous a donc paru nécessaire de mener à bien une étude succincte des besoins nutritionnels de la souche ORSO20602.

2.1.2. Etude nutritionnelle

L'assimilation des différentes sources de carbone et d'azote a été étudiée sur milieu gélosé composé de la solution de base suivante : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 3,77g ; KH_2PO_4 , 0,98g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30mg ; du tampon tris-HCl 1M, pH 7,5, 10 ml ; solution d'oligoéléments, 1 ml ; agar Noble (Difco), 15 g ; eau distillée, 1000ml.

Tableau 12. Utilisation des sources de carbone par différentes souches de Frankia

| Source de carbone | Frankia isolés de nodules de | | | | | | | | |
|-------------------|------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|-----------|
| | Casuarina | | | | | | Rhamnales | | |
| | | | | | | | <u>Hippophaë</u> | <u>Colletia</u> | |
| | | | | | | <u>ramnoides</u> | <u>spinosissima</u> | | |
| | ORS020602 (syn. D11) | ORS020601 (syn. D1) | ORS020603 (syn. G1) | ORS020604 (syn. G2) | ORS020605 (syn. P1) | ORS020610 (syn. S1) | ORS021001 (syn. Cj1-82) | ORS140101 (syn. H13) | ORS060501 |
| Malate | ++ | ++ | + | + | ++ | + | + | + | + |
| Lactate | + | + | ++ | + | + | + | 1 | 1 | + |
| Fumarate | + | + | ++ | + | + | + | + | + | + |
| Succinate | ++ | + | + | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ |
| Acetate | ++ | + | + | ++ | + | + | + | + | + |
| Citrate | + | 1 | + | + | + | + | + | + | + |
| Pyruvate | 1 | 1 | 1 | + | + | 1 | 1 | + | 1 |
| Propionate | ++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Galacturonate | + | 1 | + | + | + | 1 | 1 | + | + |
| Amidon | ++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Lactose | + | + | 1 | + | + | + | + | + | + |
| Ribose | 1 | 1 | + | 1 | 1 | 1 | - | + | - |
| Fructose | 1 | + | + | + | + | + | 1 | 1 | 1 |
| Mannose | + | 1 | + | 1 | + | + | + | + | + |
| Galactose | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Glucose | ++ | + | ++ | ++ | + | + | ++ | ++ | + |
| L. Arabinose | + | 1 | 1 | + | + | + | + | + | + |
| Cellobiose | 1 | + | 1 | 1 | - | - | - | 1 | - |
| Tween 80 | ++ | + | + | ++ | + | ++ | + | ++ | 1 |
| Glycérol | + | + | + | - | + | ++ | ++ | + | + |
| Mannitol | ++ | 1 | + | + | + | ++ | + | + | + |

(++): croissance forte; (+): croissance bonne; (1): légère croissance;

(-): croissance nulle.

Les sources de carbone sont ajoutées, au milieu de base, à raison de 2 g l⁻¹.

La source d'azote est NH₄Cl (1 g l⁻¹).

Les sources de carbone et d'azote ont été respectivement ajoutées à raison de 2 g l^{-1} et 1 g l^{-1} . L'ensemencement des boîtes de Pétri a été réalisé au moyen d'un inoculateur multipoint (Lovelace et Colwell, 1968), à partir de cultures de Frankia obtenues en milieu QMOD puis centrifugées et homogénéisées dans l'eau distillée stérile. Après 30 jours d'incubation à 30°C , la présence ou l'absence de croissance a été déterminée par rapport à un témoin sans substrats (témoin négatif) et à un témoin constitué par le milieu QMOD (témoin positif).

2.1.2.1. Sources de carbone utilisables par ORS020602

Les sources de carbone permettant la meilleure croissance du Frankia ORS020602 (Tableau 12) se sont révélées être les acides organiques, tels que le succinate et le malate, les acides gras, tels que le propionate et le Tween 80, certains carbohydrates, tels que l'amidon et le glucose, et certains alcools tels que le glycérol et le mannitol.

2.1.2.2. Sources d'azote utilisables par ORS020602

La souche de Frankia ORS020602 s'est montrée capable d'utiliser une assez large gamme de source d'azote (Tableau 13), les meilleures sources d'azote étant le glutamate, l'aspartate et la glutamine.

2.1.2.3. Effet de l'apport de vitamines sur la croissance de ORS020602

Le tableau 14 rapporte les différentes croissances obtenues, en milieu liquide "succinate-glutamate", en fonction des vitamines ajoutées au milieu. On ne peut observer aucune amélioration significative de croissance liée à l'apport de vitamines après 21 jours de croissance.

2.1.3. Conclusions

La souche de Frankia ORS020602 ne semble pas avoir

Tableau 13. Utilisation des sources d'azote par différentes souches de Frankia.

| Source d'azote | Frankia isolés de nodules de | | | | | | | | |
|--------------------|------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|-----------|
| | Casuarina | | | | Rhamales | | | | |
| | | | | | <u>Hippophaë</u> | <u>Colletia</u> | | | |
| | | | | <u>rhamnoides spinosissima</u> | | | | | |
| | ORS020602 (syn. D11) | ORS020601 (syn. D1) | ORS020603 (syn. G1) | ORS20604 (syn. G2) | ORS020605 (syn. P1) | ORS20610 (syn. S1) | ORS21001 (syn. G1-82) | ORS140101 (syn. H13) | ORS060501 |
| N ₂ | + | + | + | + | + | + | + | ++ | + |
| NH ₄ Cl | + | + | + | ++ | + | ++ | + | + | + |
| KNO ₃ | + | 1 | 1 | + | 1 | 1 | 1 | + | + |
| Glutamate | ++ | + | + | ++ | + | ++ | + | ++ | ++ |
| Aspartate | ++ | + | + | + | + | + | + | + | ++ |
| Casamino-acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Extrait de levure | + | + | ++ | + | + | ++ | + | + | ++ |
| Glutamine | ++ | + | + | ++ | + | + | + | ++ | + |
| Lysine | 1 | - | + | 1 | - | + | 1 | - | 1 |
| Asparagine | + | + | + | ++ | + | + | ++ | + | + |
| Arginine | + | + | + | + | 1 | + | 1 | + | + |

(++): croissance forte; (+) bonne croissance; (1): croissance légère;

(-): croissance nulle.

Les sources d'azote sont ajoutées, en milieu de base, à raison de 1 g l⁻¹.

La source de carbone est le succinate (2 g l⁻¹).

Tableau 14: Effet de l'apport de vitamines sur
la croissance de ORS020602 (syn D11).

| Apport de vitamines ⁽¹⁾ au milieu de référence ⁽²⁾ | Poids sec (mg) ⁽³⁾ |
|---|-------------------------------|
| 0 | 37 |
| Panthothénate de Calcium | 32 |
| Riboflavine | 40 |
| Acide folique | 38 |
| Biotine | 27 |
| Acide nicotinique | 35 |
| Thiamine | 39 |
| Les 6 vitamines réunies | 36 |

(1) 0,1 mg l⁻¹

(2) milieu de référence (g l⁻¹): KH₂PO₄, 1.0; MgSO₄.7H₂O, 0.1; CaCl₂.2H₂O, 0.01; FeSO₄, 0.01; Na succinate, 1.2; glutamate, 1; NaMoO₄.2H₂O, 0.005; MnSO₄.H₂O, 0.025; ZnSO₄.7H₂O, 0.007; CuSO₄.5H₂O, 0.00125; CoSO₄.7H₂O, 0.0014; H₃BO₃, 0.0003; pH 6.8.

(3) Poids sec: total de 5 tubes contenant 10 ml de milieu.

d'exigences nutritionnelles particulières et peut croître sur des milieux synthétiques simples, condition indispensable à l'étude de la physiologie de cet actinomycète.

Comme on peut l'observer sur les Tableaux 12 et 13, les autres souches de Frankia isolées de Casuarina (type I et II) et les souches isolées de nodules de Rhamnales (ORS060501 et ORS140101) ont des besoins nutritionnels similaires à ceux de la souche ORS020602.

Le succinate étant une source de carbone utilisable par tous ces Frankia nous avons adopté, pour les études physiologiques et enzymatiques exposées plus loin, un milieu minimal de composition suivante : (g.l^{-1}) : KH_2PO_4 , 1,0 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01 ; FeSO_4 , 0,01 ; Na succinate, 1,2 ; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,005 ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,025 ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,007 ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,00125 ; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0014 ; H_3BO_3 , 0,0003 ; pH 6.8.

Ce milieu est appelé MM quand il ne contient pas de source d'azote et MMN quand la source d'azote est NH_4Cl (1g l^{-1}).

2.2. Physiologie de la fixation de l'azote in vitro (Articles 6 et 7)

2.2.1. Dérépression de la biosynthèse de la nitrogénase en conditions de non-croissance.

Dans ces conditions expérimentales, une culture de ORS020602 (syn. D11) obtenue sur milieu QMOD liquide est centrifugée, resuspendue dans un milieu minimal (défini en fonction des paramètres à étudier) et incubée sous différentes atmosphères gazeuses composées d'un mélange d'argon et d'oxygène contenant 10 % d'acétylène. La cinétique de la biosynthèse de la nitrogénase est estimée en fonction de la vitesse de production d'éthylène. Cette méthode permet de discriminer l'effet de différents paramètres sur la biosynthèse de la nitrogénase sans que la croissance du Frankia interfère le phénomène.

2.2.1.1. Effet de la tension d'oxygène

Dans le cas du Frankia ORS020602 la dérèpression de la biosynthèse de la nitrogénase n'a lieu qu'en conditions aérobies et se produit à toutes les tensions d'oxygène comprises entre 2 et 20 kPa avec un maximum situé à 10 kPa. Ce comportement vis-à-vis de l'oxygène, qui est partagé par toutes les autres souches de Frankia isolées dans ce travail (Tableau 15), diffère nettement de ce qui a été décrit chez les Rhizobium. En effet, chez les Rhizobium à croissance lente, il a été montré que la tension d'oxygène, dans la phase gazeuse, doit être de l'ordre de 0,1 kPa pour que la dérèpression de la nitrogénase ait lieu (Bergersen et Turner, 1980). Dans le cas du Rhizobium à croissance rapide ORS571, isolée de Sesbania rostrata, Dreyfus et al. (1983) ont montré que la tension d'oxygène optimum, pour la fixation d'azote, se situait à 3 kPa d'oxygène.

Cette aptitude des souches de Frankia à dérèprimer la biosynthèse de la nitrogénase à des tensions d'oxygène élevées, suggère l'existence d'un système de protection de la nitrogénase, envers l'oxygène, très efficace chez ce microorganisme.

L'effet de l'oxygène sur la dérèpression de la biosynthèse de la nitrogénase varie en fonction du moment où il est introduit dans l'atmosphère de dérèpression. La figure 11 montre clairement que 30 kPa d'oxygène mis en début d'expérience inhibe nettement plus la biosynthèse de la nitrogénase que l'ajout, dans le système de trois fois 10 kPa répartis dans le temps. Ce résultat pourrait s'expliquer par un effet plus marqué de l'oxygène sur la biosynthèse de la nitrogénase que sur son activité enzymatique.

Afin de vérifier cette hypothèse nous avons comparé la réduction d'acétylène, à différentes tensions d'oxygène, d'une culture de Frankia, qui doit synthétiser sa nitrogénase, à celle d'une culture possédant déjà la nitrogénase et transférée dans un milieu contenant du chloramphénicol ($100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) ce qui inhibe toute nouvelle synthèse de

Tableau 15. Dérépression de la biosynthèse de la nitrogénase en fonction de la tension d'oxygène chez différentes souches de Frankia ⁽¹⁾

| Souches de <u>Frankia</u> | Activité réductrice d'acétylène (ARA) nmoles C ₂ H ₄ h ⁻¹ (mg protéine) ⁻¹ | | | | | |
|--|---|----|----|----|----|----|
| | Tension d'oxygène (kPa) | | | | | |
| <u>Frankia</u> de type I isolés de <u>Casuarina</u> : | 0 | 2 | 5 | 10 | 15 | 20 |
| ORSO20602 (syn.D11) | 0 | 10 | 15 | 33 | 18 | 15 |
| ORSO20601 (syn.D1) | 0 | 8 | 11 | 17 | 12 | 4 |
| ORSO20603 (syn.G1) | 0 | 12 | 10 | 36 | 30 | 32 |
| ORSO20604 (syn.G2) | 0 | 5 | 20 | 15 | 15 | 12 |
| ORSO20605 (syn.P1) | 0 | 7 | 10 | 15 | 18 | 16 |
| ORSO20610 (syn.S1) | 0 | 12 | 20 | 42 | 37 | 25 |
| <u>Frankia</u> de type II isolés de <u>Casuarina</u> | | | | | | |
| ORSO21001(Cj1-82) ⁽²⁾ | 0 | 2 | 6 | 7 | 8 | 3 |
| <u>Frankia</u> isolés de Rhamnales | | | | | | |
| ORS140101 (H13) | 0 | 25 | 40 | 58 | 29 | 32 |
| ORSO60501 | 0 | 17 | 25 | 27 | 32 | 18 |

(1) Les différentes souches de Frankia ont été cultivées sur milieu QMOD pendant 15 à 30 jours à 30°C, puis centrifugées et resuspendues dans un milieu MM. 25 ml de suspension de Frankia ont été incubés, dans un flacon sérum d'un volume de 145ml, sous divers atmosphères gazeuses constituées de mélange argon-oxygène contenant 10% d'acétylène. L'ARA a été estimée par la production d'éthylène pendant 5 jours par chromatographie en phase gazeuse (voir article 7).

. Remarque: 1 kPa d'O₂ = 1% d'O₂.

(2) Dans le cas de la souche ORSO21001, l'argon a été remplacé par l'N₂ dans les différents mélanges gazeux.

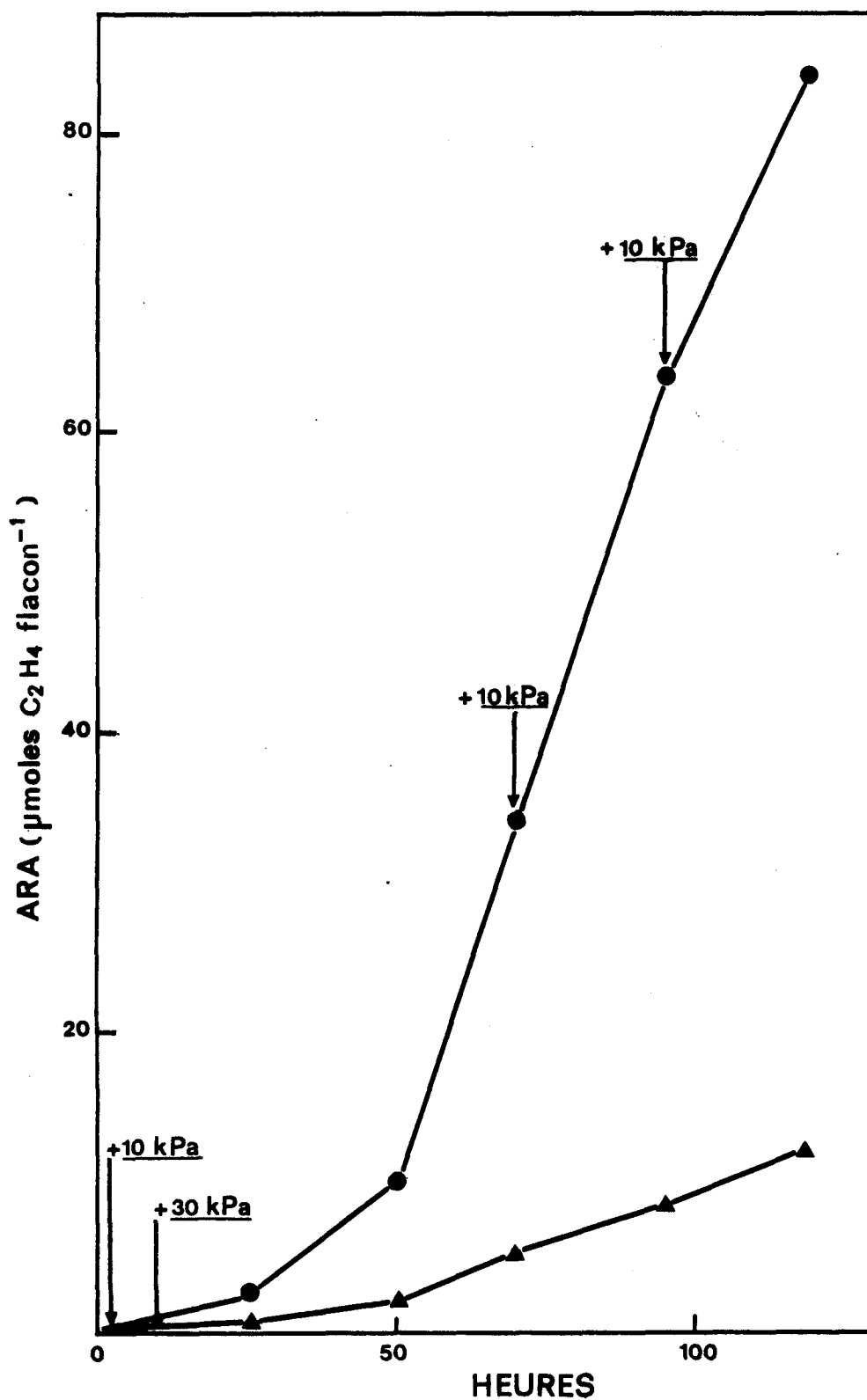


FIGURE 11. Effet de l'oxygène, sur la biosynthèse de la nitro-génase de *Frankia* ORS020602 (syn.D11), en fonction du moment de son introduction dans le mélange gazeux de dérépression.

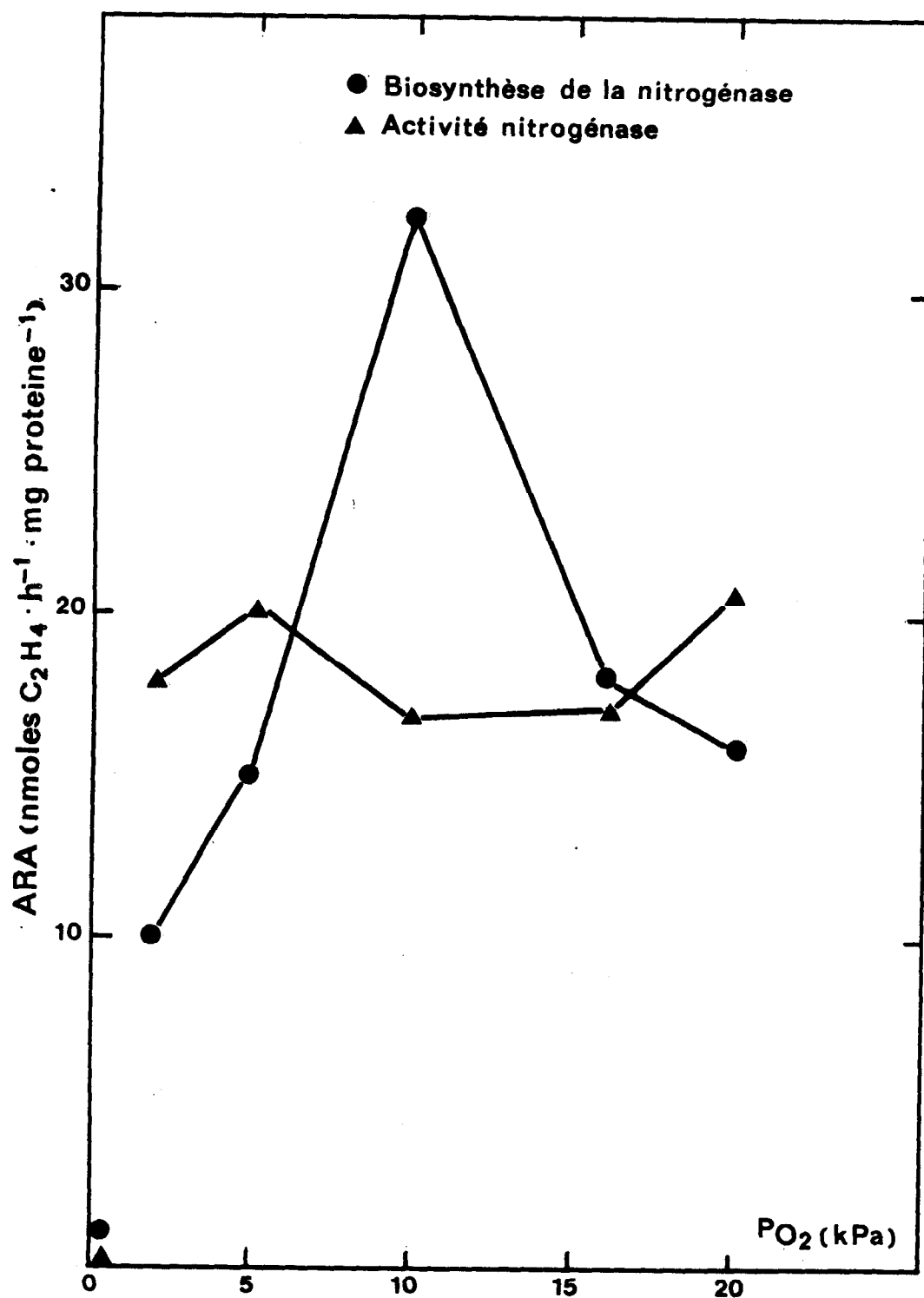


FIGURE 12. Effet de la tension d'oxygène sur la biosynthèse et l'activité de la nitrogénase de Frankia ORS02602 (syn.D11).

protéine. La figure 12 montre que la tension d'oxygène n'a pratiquement pas d'effet sur l'activité de l'enzyme. Tout se passe donc comme si, une fois synthétisée, la nitrogénase se trouvait être moins sensible à l'oxygène ambiant.

2.2.1.2. Effet des sources d'azote

La souche ORS020602 est incapable de déréguler la biosynthèse de sa nitrogénase en présence de NH_4Cl 1mM, de KNO_3 1mM ou de glutamine 1 mM. L'effet de l'extrait de levure en petite quantité ($25 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) peut avoir un effet légèrement positif. (Voir article 6).

La biosynthèse de la nitrogénase chez Frankia apparaît donc plus sensible aux sources d'azote que chez les Rhizobium ou certaines souches sont encore capables de développer une activité nitrogénasique appréciable en présence de NH_4Cl 40 mM (Keister, 1975).

2.2.2. Dérépression de la biosynthèse de la nitrogénase en conditions de croissance :

La souche de Frankia ORS020602 étant capable de déréguler la biosynthèse de sa nitrogénase sous une tension de 20 kPa d'oxygène, les diverses expériences, concernant la croissance aux dépens de l'azote moléculaire, ont été menées sous atmosphère constituée d'air.

2.2.2.1. Croissance de la souche ORS020602 aux dépens de l'azote moléculaire :

En milieu MM à 30°C sous une atmosphère d'air, la souche ORS020602 est capable de croître et de développer une activité réductrice d'acétylène importante (Figure 13). Le taux de croissance sous atmosphère d'air est de 0,20 div. j^{-1} et la quantité de protéine (total de 5 flacons) augmente de 2 mg à 25 mg en 20 jours. Le temps de doublement est donc de 5 jours sur milieu MM comparé à 2-3 jours sur milieu QMOD.

L'activité spécifique de la nitrogénase est maximale après 12 jours de culture puis diminue assez rapidement.

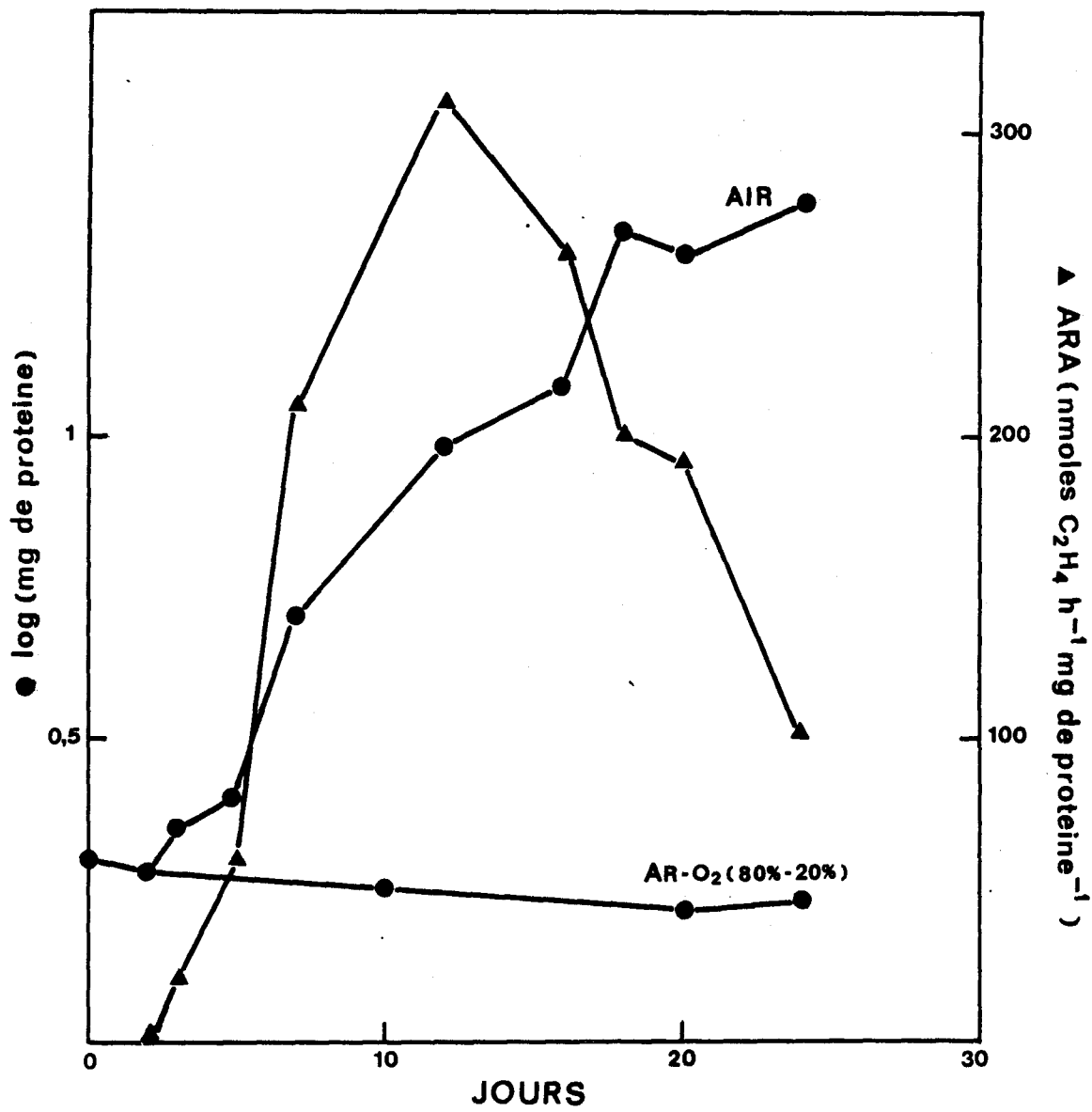


FIGURE 13. Croissance de Frankia ORS020602 (syn.D11) en milieu MM sous air ou atmosphère composé d'un mélange "Ar-O₂".

● Protéine (mg) : total des protéines de 5 flacons. Les cultures de Frankia ont été effectuées dans des flacons sérum de 145 ml contenant 25 ml de milieu MM.

▲ Les ARA représentent la moyenne de production d'éthylène de 5 flacons.

Les ARA spécifiques liées à la croissance de Frankia, en milieu MM, sont nettement plus élevées que celles observées en conditions de dérépression sous mélanges argon-oxygène ($300 \text{ nmoles C}_2\text{H}_2 \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protéine en conditions de croissance contre 10-30 en conditions de dérépression). Dans ces conditions de culture, les vésicules sont très nombreuses et forment des amas. En fin de culture, ces vésicules sont souvent détachées des hyphes et il est probable que, dans ces conditions, elles sont inactives. Ceci pourrait expliquer, en partie, l'arrêt de la croissance observé après 20 jours alors que le milieu nutritif est probablement loin d'être épuisé.

Quand on remplace l'air par un mélange gazeux constitué d'argon et d'oxygène (80 % - 20 %), aucune croissance ne peut être observée (Figure 13). Ceci montre que c'est bien aux dépens de l'azote moléculaire que la croissance a lieu dans ces conditions expérimentales.

2.2.2.2. Effet des sources d'azote

Le tableau 16 rapporte l'effet de diverses sources d'azote sur la croissance et la fixation d'azote chez le Frankia ORS020602. On observe que certaines sources d'azote, telles que l'alanini, le glutamate et l'aspartate, stimulent la fixation d'azote alors que d'autres, telles que la citrulline, l'arginine et le NH_4Cl l'inhibent totalement.

D'autre part, il est clair que les sources d'azote utilisées ont un effet direct sur la production de vésicules par Frankia. En particulier, NH_4Cl inhibe totalement la production de vésicules tandis que la citrulline et l'arginine réduisent fortement leur nombre.

2.2.2.3. Rôle des vésicules

Dans le cas du Frankia ORS020602, toute activité nitrogénasique est toujours liée à la présence de vésicules mais plusieurs cas de figure peuvent exister :

- milieu QMOD : les vésicules sont présentes en assez grand nombre (10^6 vésicules par mg de poids sec) mais

Tableau 16. Influence des sources d'azote sur la croissance et l'activité réductrice d'acétylène de Frankia ORS020602 (syn. D11)

| Source d'azote ⁽¹⁾ | ARA ⁽²⁾ h ⁻¹ (mg Prot) ⁻¹ | C ₂ H ₄ -1 % | ARA | Vésicules ⁽³⁾ | Protéine ⁽⁴⁾ (mg) | Protéine % |
|-------------------------------|---|---------------------------------------|-----|--------------------------|---------------------------------|---------------|
| O | 61,2 | | 100 | + | 3,7 | 100 |
| Citrulline | 0 | | 0 | ± | 4,4 | 119 |
| Arginine | 0 | | 0 | ± | 4,2 | 112 |
| Sérine | 73,3 | | 120 | + | 2,7 | 72 |
| Alanine | 123,6 | | 200 | + | 2,0 | 55 |
| Méthionine | 57,6 | | 96 | + | 2,0 | 55 |
| Glutamate | 67,2 | | 110 | + | 2,9 | 79 |
| Aspartate | 70 | | 114 | + | 3,2 | 86 |
| NH ₄ Cl | 0 | | 0 | - | 2,0 | 55 |
| Extrait de levure | 48 | | 80 | + | 2,7 | 55 |

(1) Les sources d'azote ont été ajoutées à raison de 1 g l⁻¹ au milieu MM.

(2) Les activités réductrices d'acétylène spécifiques ont été mesurées après 15 jours de croissance sous atmosphère d'air; ce sont les moyennes de 3 flacons de 145 ml contenant 25 ml de milieu MM.

(3) (+): présence de vésicules; (±): vésicules peu nombreuses; (-): absence de vésicules.

(4) Quantité cumulée de 3 flacons de 145ml contenant 25ml de milieu de culture. Inoculum estimé à 0,2mg protéine.

aucune activité réductrice d'acétylène ne leur est associée.

- milieu contenant du NH_4Cl (1 g l^{-1}) : aucune vésicule présente dans la culture et aucune activité nitrogénasique n'est décelable même en conditions microaérophiles (0,1 à 0,5 kPa d'oxygène). Cependant si l'on transfère une telle culture en milieu sans azote, l'apparition des vésicules est concomitante avec l'apparition de l'activité nitrogénasique.

- milieu sans azote : les vésicules sont plus nombreuses que dans le cas du milieu QMOD ($22 \cdot 10^6$ vésicules par mg de poids sec) et ont un diamètre plus important (5 à 6 μm contre 2 à 3 μm en milieu QMOD). Dans un tel milieu dans azote, l'activité nitrogénasique est toujours élevée.

On peut conclure de ces observations que les vésicules peuvent se trouver dans trois situations : (1) absentes de la culture ; (2) présentes mais sans activité nitrogénasique ; (3) présentes et capables de fixer l'azote.

Il est donc clair que production et fonction des vésicules sont deux phénomènes dissociables mais que tous deux sont dépendants de la source d'azote disponible dans le milieu de culture du Frankia. Les enzymes qui sont impliquées dans l'assimilation de ces sources d'azote sont donc probablement impliquées dans la régulation de la production et du fonctionnement des vésicules. Cette hypothèse se trouve confortée par le fait que la méthionine sulfoximine (MSX), qui est un inhibiteur de la glutamine synthétase et de la glutamate synthase, permet la production de vésicules et leur activité nitrogénasique en présence de NH_4Cl (1 g l^{-1}) (voir article 7).

2.3. Voies initiales du métabolisme de l'ammoniaque chez Frankia ORS020602 (syn. D11)

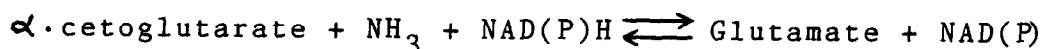
Le produit de l'activité enzymatique de la nitrogénase étant l'ammoniaque, nous avons cherché à caractériser les différentes enzymes impliquées dans les voies initiales du métabolisme de l'ammoniaque.

Quatre voies d'incorporation de l'azote ammoniacal sous forme organique peuvent être envisagées :

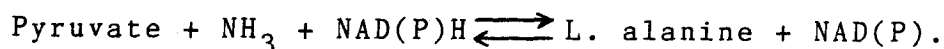
(1) assimilation sous forme de L. glutamine par la glutamine synthétase (GS).



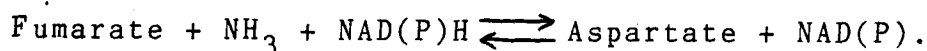
(2) assimilation sous forme de L. glutamate par la glutamate déshydrogénase (GDH).



(3) assimilation sous forme de L. alanine par l'alanine déshydrogénase (Ala.DH).

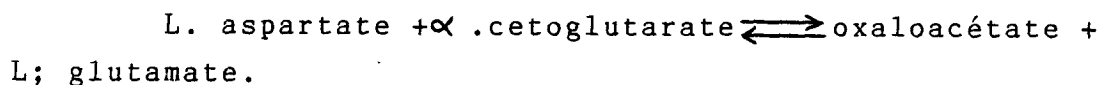


(4) assimilation sous forme de L. aspartate par l'aspartase (Asp. DH).



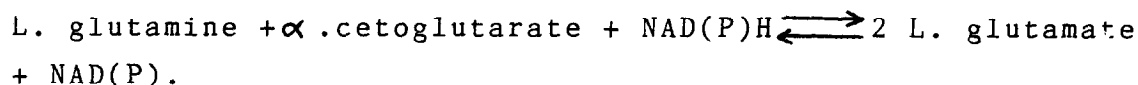
D'autre part, le L. glutamate peut être synthétisé par l'action d'une transaminase telle que la glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT) :

(5) : GOT



Enfin, l'action de la glutamate synthase (GOGAT) permet la synthèse de 2 molécules de glutamate à partir de L. glutamine et d' α .cetoglutarate.

(6) : GOGAT



Chez les microorganismes fixateurs d'azote, c'est généralement l'action couplée de la GS et de la GOGAT qui permet l'incorporation de l'ammoniac produit de la nitrogénase (Nagatani et al., 1971).

Afin d'élucider les voies initiales du métabolisme de l'azote chez Frankia, nous avons tenté de caractériser ces six différentes enzymes dans les extraits bruts de Frankia cultivés sur divers milieux.

2.3.1. La Glutamine synthétase

La glutamine synthétase (GS) est une enzyme clé chez la

plupart des microorganismes car elle permet la synthèse de la glutamine qui est un précurseur d'un grand nombre de métabolites azotés essentiels tels que les nucléotides puriques et pyrimidiques, le carbamyl phosphate, l'histidine, le tryptophane, la glucosamine, l'acide p. amino-benzoïque. De plus, de nombreux travaux tendent à démontrer que la GS joue un rôle régulateur sur les enzymes impliquées dans le métabolisme azoté tels que l'histidase, la proline-oxydase, la nitrate-réductase et la nitrogénase (Magasanik et al., 1974 ; Magasanik, 1977 ; Gauthier et Elmerich, 1977).

Chez les bactéries gram⁻ fixatrices d'azote ou non, telles que Azospirillum (Okon et al., 1976) et E. Coli (Wulf et al., 1977), la GS peut exister sous 2 formes : adénylée et non-adénylée. Chez ce type de microorganisme, la dosage de la GS en présence et en absence de MgCl₂ (60 mM) permet de connaître le rapport existant entre les deux formes de l'enzyme. Plus le rapport (+ Mg/-Mg) est petit et plus l'enzyme est adénylée ; de plus, ce rapport est modifiable par traitement de l'enzyme par la phosphodiesterase de venin de serpent (S.V.D.) (Bishop et al., 1975).

Chez les bactéries fixatrices d'azote, telles que Klebsiella pneumoniae (Tubb, 1974) ou Azospirillum brasiliense (Okon et al., 1976), il a été constaté que les conditions de culture qui favorisent l'adénylation de la GS ne sont pas compatibles avec la dérégulation de la biosynthèse de la nitrogénase.

Il a été possible de doser une activité glutamine synthétase dans les extraits bruts de la souche ORSO20602 cultivée sur milieu QMOD, sur milieu minimal sans azote (MM) et sur milieu minimal supplémenté par du NH₄ Cl 1 g par litre (MMN) (Tableau 17). Cependant, le rapport (+ Mg/-Mg) ne varie pas significativement en fonction de la source d'azote fournie au Frankia et le traitement à la phosphodiesterase ne parvient pas à modifier ce rapport. Ces résultats suggèrent que la GS de Frankia ORSO20602 n'est probablement pas régulée par un système d'adénylation comparable à celui de E.Coli.

Tableau 17. Activité spécifique de la Glutamine synthétase (Réaction de Transfert) dans les extraits bruts de Frankia ORS020602 cultivé sur différents milieux.

| Milieux de culture | Activité Glutamine synthétase (Réaction de Transfert) (1) $\mu\text{mn}^{-1}\text{mg}^{-1}$ protéine | | | |
|--------------------|--|-------------------|-----------------------------------|--|
| | $-\text{Mg}^{2+}$ | $+\text{Mg}^{2+}$ | $+\text{Mg}^{2+}/-\text{Mg}^{2+}$ | $(+\text{Mg}^{2+}/-\text{Mg}^{2+})+\text{SVD}$ |
| QMOD | 0,79 | 0,17 | 0,21 | 0,19 |
| MM | 5,61 | 1,15 | 0,20 | 0,24 |
| MMN | 8,00 | 2,50 | 0,31 | 0,27 |

(1) Après 1 mois de culture à 30°C dans différents milieux, le Frankia est centrifugé et suspendu dans un tampon Imidazol-HCl (10mM, pH 7,1) contenant du MnCl_2 (10 mM) et du 2-mercaptoéthanol (1 mM). Les extraits bruts sont obtenus par passage dans une presse de French à 18000 psi. L'activité GS, dosée par la réaction de transfert (Shapiro, B.M et Stadtman, E.R., 1970), est exprimée en μmoles de glutamylhydroxamate formés par minute et par mg. de protéine (voir article 7).

$-\text{Mg}^{2+}$: dosage en absence de MgCl_2 60 mM

$+\text{Mg}^{2+}$: dosage en présence de MgCl_2 60 mM

$+\text{Mg}^{2+}/-\text{Mg}^{2+}$: taux d'adénylation estimé

$(+\text{Mg}^{2+}/-\text{Mg}^{2+}) + \text{SVD}$: taux d'adénylation estimé de la GS après 3 heures d'incubation avec de la phosphodiesterase de venin de serpent (SVD) à $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ à 37°C.

Les résultats concernant la glutamine synthétase (GS) du Frankia ORS020602 sont proches de ceux rapportés chez Anabaena cylindrica, où la GS n'a pas de système d'adénylation (Dharmawardene et al., 1973 ; Rowell et al., 1979) mais différent nettement de ce qui est connu chez Rhizobium japonicum où Darrow et Knotts (1977) ont démontré l'existence de deux glutamines synthétases (GSI et GSII) qui seraient toutes deux fonctionnelles en conditions aérobies mais dont une seule fonctionnerait (GSI) en conditions microaérophiles compatibles avec la fixation de l'azote.

2.3.2. Les autres enzymes de l'assimilation de l'azote

Dans les extraits bruts de la souche ORS020602 cultivée en milieu minimum sans azote (MM) ou en milieu minimum supplémenté en NH_4Cl nous avons pu mettre en évidence, en plus de l'activité glutamine synthétase, les activités enzymatiques suivantes (Tableau 18) :

- une activité glutamate synthase (GOGAT) NADH dépendante.
- une activité alanine déshydrogénase (Ala.DH) NADH dépendante .
- une activité glutamate-oxoacétate transaminase (GOT).

Il n'a pas été possible de mettre en évidence d'activité glutamate déshydrogénase (GDH) ni d'activité aspartase (Asp.DH).

2.3.3. Conclusion

Chez la souche de Frankia ORS020602, l'assimilation de l'ammoniaque semble pouvoir se faire à la fois par l'alanine déshydrogénase et par la glutamine synthétase.

Quant au glutamate, nécessaire à l'activité GS, il peut être fourni de 2 façons : (1) par l'activité GOGAT comme chez les autres bactéries fixatrices d'azote, (2) par transamination grâce à l'activité de la GOT.

Tableau 18. Activités spécifiques des diverses enzymes recherchées dans les extraits bruts de *Frankia* ORS020602 cultivé en présence ou en absence de NH_4Cl (1 g l^{-1}).

| Milieu de culture | Activités enzymatiques $\mu \text{mn}^{-1} \text{mg}^{-1}$ | | | | | Protéine |
|-------------------------|--|---------------------|----------------------|---------|--------------------|-----------------------|
| | GS(transfert) (1) | GOGAT (2) (NADH) | ALa.DH (3) (NADH) | GOT (4) | GDH (5) NAD(P)H | Asp.DH (6) NAD(P)H |
| MM | 5,61 | 0,045 | 0,190 | 0,092 | 0 | 0 |
| MMN | 8 | 0,031 | 0,385 | 0,195 | 0 | 0 |

(1) Voir Tableau 17 et Article 7.

(2) L'activité de la GOGAT (Meers, J.L. et al, 1970) est exprimée en μmoles NADH oxydé par minute et par mg de protéine.

(3) L'activité Alanine deshydrogénase (Yoshida, A et E. Freese, 1970) est exprimée en μmoles de NADH oxydé par minute et par mg de protéine.

(4) L'activité GOT est estimée en μmoles de NADH oxydé par minute et par mg de protéine en se servant de la réaction couplée, avec la malate déshydrogénase (MDH, sigma), suivante: (Williamsons, J.R and Corkey, B.E. 1969)
 $\text{L. Aspartate} + \text{aceto} \xrightarrow{\text{GOT}} \text{glutarate} \rightarrow \text{oxaloacetate} + \text{L. glutamate}.$
 $\text{Oxaloacetate} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{MDH}} \text{L. malate} + \text{NAD}.$

(5) L'activité GDH est estimée en μmoles de NAD(P)H oxydé par minute et mg de protéine. (Fahien, L.A. et P.P. Cohen, 1970).

(6) L'Asp. DH est mesurée en fonction de l'apparition du fumarate suivi à 240nm (Williams, R. V. and Lartigue, D.J. 1969).

3. Etude in vitro d'une souche de Frankia, de type morphologique II, isolée de nodule de Casuarina : ORS021001 (syn. CJ-1-82).

3.1. Propriétés nutritionnelles

Comme indiqué dans les tableaux 12 et 13, les propriétés nutritionnelles de la souche ORS021001 sont similaires à celles des souches du type I. Cependant, la croissance de cette souche est très lente et la masse bactérienne produite peu abondante. Ceci a limité les possibilités d'investigation concernant la physiologie de cette souche.

3.2. Physiologie de la fixation d'azote

Le Frankia ORS021001 est capable de déréguler la biosynthèse de sa nitrogénase in vitro. Les faibles activités réductrices d'acétylène mesurées chez ORS021001, en conditions de dérégulation sous différentes atmosphères constituées de mélange d' N_2 et d'oxygène (Tableau 15), sont dues au fait que cette souche ne forme pas de vésicules en milieu QMOD. Après le transfert de ORS021001 du milieu QMOD au milieu MM, cette souche doit d'abord former des vésicules avant de pouvoir synthétiser sa nitrogénase.

En milieu minimal sans azote (MM), cette souche est capable de croître aux dépens de l'azote moléculaire (tableau 19) en développant une activité nitrogénasique assez élevée. Dans ces conditions de croissance, la morphologie de ORS021001 est profondément transformée par l'apparition de vésicules typiques. La présence de vésicules chez cette souche est strictement liée à l'activité nitrogénase : toutes les sources d'azote qui inhibent la biosynthèse de la nitrogénase, inhibent aussi la formation des vésicules (tableau 20). Il semble donc que la régulation de la formation des vésicules chez ce type de Frankia soit nettement plus stricte que dans le cas des souches du type morphologique I où des vésicules dans activité nitrogénasique peuvent être présentes.

Tableau 19. Croissance et activité réductrice d'acétylène (ARA) de Frankia ORS021001 (syn. Cj1-82), en milieu minimum sans azote (MM), sous différentes atmosphères gazeuses.

| Atmosphère gazeuse | Poids sec (mg) ⁽¹⁾ après 30 jours | Activité réductrice d'acétylène ⁽²⁾ nmoles C ₂ H ₄ h ⁻¹ mg ⁻¹ de poids sec |
|---|---|--|
| Air | 9,8 | 54 |
| 80 % N ₂ - 20 % O ₂ | 11,7 | 68 |
| 80 % Argon - 20 % O ₂ | 0,8 | 5 |

(1) Total de 10 flacons sérum de 145ml contenant 10ml de milieu MM. Inoculum estimé à 1,3 mg Poids sec pour 10 flacons.

(2) Après 30 jours de croissance, 10% d'acétylène sont introduits dans les flacons et la production d'éthylène est suivie pendant 3 jours.

L'ARA est la moyenne des ARA de 10 flacons sérum.

Tableau 20. Effets de différentes sources d'azote sur la croissance, l'activité réductrice d'acétylène (ARA) et la production de vésicules chez le Frankia ORS021001 (syn.Cj1-82)

| <u>Source d'azote</u> (1) | <u>Croissance</u> (2) | <u>Vésicules</u> (3) | <u>ARA</u> (4) |
|---------------------------|-----------------------|----------------------|----------------|
| N ₂ | + | + | + |
| Aspartate | + | + | + |
| Glutamate | + | + | + |
| NH ₄ Cl | + | - | - |
| Casamino-acid | + | - | - |
| Arginine | ± | - | - |
| Extrait de levure | + | - | - |

(1) Les différentes sources d'azote ont été aportées au milieu minimum MM à raison de 1 g l⁻¹.

(2) Après 30 jours, la croissance a été estimée visuellement par rapport à un témoin constitué par le milieu QMOD.

(3) La présence de vésicules a été recherchée par observation au microscope optique. (+): présence de vésicules; (-): absence de vésicules.

(4) L'activité réductrice d'acétylène (ARA) a été estimée par injection, en fin d'expérience, de 10% d'acétylène dans les flacons sérum et la production d'éthylène a été suivie pendant 3 jours; (+) production d'éthylène ;(-): absence de production d'éthylène.

Tableau 21. Contenu enzymatique des extraits bruts de Frankia de Rhamnales (ORS060501 et ORS140101) et de Frankia de Casuarina (ORS020602) cultivés sur milieu minimum sans azote (MM).

| Enzymes de l'assimilation de l'azote ⁽¹⁾ | Frankia | | |
|--|-----------|-----------|-----------|
| | Rhamnales | | Casuarina |
| | ORS060501 | ORS140101 | ORS020602 |
| GS | + | + | + |
| G.O.T | + | + | + |
| GOGAT | - | - | + |
| Ala.DH | + | - | + |
| GDH | - | - | - |
| Asp.DH | - | - | - |

(1) (+): activité enzymatique décelable.

(-): activité enzymatique non décelable

Voir Tableau 18.

4. Etude in vitro de deux souches de Frankia isolées de nodules de Rhamnales : Hippophaë rhamnoides (ORS140101) et Colletia spinosissima (ORS060501)

Les souches de Frankia ORS060501 et ORS140101 (syn. H13) ont des propriétés nutritionnelles très semblables à celles des souches de Frankia de Casuarina étudiées dans ce travail (tableaux 12 et 13).

Leur comportement, en ce qui concerne la fixation de l'azote (tableau 15) et la régulation de la production des vésicules, est comparable à ce qui a été décrit pour les Frankia de Casuarina de type I (exemple : ORS020602).

En ce qui concerne les voies initiales de l'assimilation de l'azote chez ces souches, il a été possible de mettre en évidence, en milieu minimal sans azote (MM), les activités enzymatiques suivantes (tableau 21) :

- des activités glutamine synthétase (GS) et glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT) dans le cas des 2 souches.

- une activité alanine déshydrogénase (Ala.DH) seulement chez ORS060501.

Contrairement à la souche de Frankia ORS020602 (syn. D11), aucune activité glutamate synthase (GOGAT) n'a pu être mise en évidence dans les extraits bruts de Frankia ORS140101 et ORS060501 cultivés en milieu MM.

5. Conclusions et discussion

Les résultats rapportés dans ce chapitre nous conduisent à formuler les conclusions suivantes :

5.1. Les souches de Frankia, isolées dans ce travail, diffèrent peu en ce qui concerne leurs caractères physiologiques

Nous n'avons pas pu établir de différences nutritionnelles nettes permettant de séparer les souches de Frankia isolées de nodules de Casuarina et de nodules de

Rhamnales (tableaux 12 et 13).

La seule différence que l'on peut noter consiste en l'absence d'activité GOGAT constatée dans les extraits bruts des souches de Frankia isolées de nodules de Rhamnales (tableau 21).

Récemment M.P. Lechevalier et al. (1983) ont proposé de classer les différents isolats de Frankia en deux groupes physiologiques distincts A et B en se basant sur des critères concernant la sensibilité à l'oxygène, la production de protéase, la pigmentation et l'utilisation de carbohydrates à 0,5 %. Parmi les souches classées dans le groupe A figurent un de nos isolats (ORS020604, syn. G2) et les souches isolées d'Elaeagnus. On peut donc penser que le peu de différences observées entre nos souches, en ce qui concerne les propriétés nutritionnelles, proviennent du fait qu'elles appartiennent toutes au même groupe A défini par M.P. Lechevalier.

5.2. Aptitude des Frankia à fixer l'azote in vitro et à croître aux dépens de l'azote moléculaire : rôle des vésicules

Il est maintenant bien établi que les Frankia peuvent fixer l'azote in vitro (Gauthier et al., 1981 ; Tjepkema et al., 1981 ; Tisa et al., 1983 ; Burggraaf et al., 1983) à des tensions d'oxygène comprises entre 5 et 20 kPa (Gauthier et al., 1981a ; Tjepkema et al., 1981).

Les sites de l'activité nitrogénasique sont les vésicules. Ceci est particulièrement net pour le cas des Frankia Cp11 (Tjepkema et al., 1981) et ORS021001 (syn. CJ-1-82) (Gauthier et al., 1984a) qui forment des vésicules seulement lorsqu'ils sont placés dans des conditions qui permettent la fixation de l'azote. Chez d'autres souches de Frankia, les vésicules peuvent être présentés dans le milieu sans qu'une activité nitrogénasique leur soit obligatoirement associée (Gauthier, 1983 ; Shipton et Burggraaf, 1983 ; Tisa et al., 1983). La formation de vésicules paraît dépendante de la source d'azote présente dans le milieu de

culture, en particulier le chlorure d'ammonium inhibe totalement ou en partie leur production.

Une régulation de la formation et du fonctionnement des vésicules par les enzymes impliquées dans l'assimilation de l'azote peut être envisagée dans le cas des Frankia de Casuarina. En effet, nous avons montré, dans le cas du Frankia ORS020602 (syn. D11), que la méthionine sulfoximine (MSX), qui est un inhibiteur de la glutamine synthétase et de la glutamate synthase, pouvait permettre la production des vésicules et leurs activités nitrogénasiques associées en présence de 1 g l^{-1} de $\text{NH}_4 \text{Cl}$ (Gauthier, 1983). Une telle régulation devrait intervenir à 2 niveaux : (1) formation des vésicules en tant que structure morphologique, (2) biosynthèse de la nitrogénase à l'intérieur de ces structures.

Cependant, la formation des vésicules ne semble pas être uniquement sous la dépendance des sources d'azote utilisées par les Frankia pour leur croissance. En effet, chez certaines souches de Frankia, il a été montré que des températures supérieures à 33°C (Tisa et al., 1983) ainsi que certaines sources de carbone, tel que le cellobiose (Tjepkema et al., 1980), pouvaient inhiber ou réduire fortement la formation des vésicules in vitro.

Il est probable que les vésicules des Frankia jouent un rôle équivalent à celui tenu par les hétérocystes chez les cyanophycées (W.D.P. Stewart, 1977). Dans cette optique, les vésicules dépourvues d'activité nitrogénase seraient l'équivalent des pré-hétérocystes des cyanobactéries.

L'aptitude des Frankia à fixer l'azote en présence de fortes tensions d'oxygène suggère que le rôle des vésicules serait de protéger la nitrogénase contre l'oxygène. On peut penser que cette protection se fait de deux façons :

1) protection physique : Torrey et Callaham (1982) ont montré, chez la souche Cp11 cultivée in vitro, que les vésicules possèdent une enveloppe spécialisée constituée d'un certain nombre de couches fines (12 à 15) d'environ 35 à 40 nm d'épaisseur. Ces feuillettes multiples rempliraient le rôle d'une barrière physique freinant la diffusion de

l'oxygène vers l'intérieur des vésicules.

2) protection respiratoire : récemment, M.A. Murry et al., (1983) ont confirmé cette hypothèse en comparant les vitesses de consommation de l'oxygène chez la souche de Frankia Ar 13 (isolée d'Alnus rubra) cultivée en milieu sans azote et en milieu contenant du chlorure d'ammonium. Le Frankia Ar 13 en milieu sans azote prosuit des vésicules et réduit l'acétylène tandis qu'en présence de $\text{NH}_4 \text{Cl}$ il n'y a que production d'hyphe. Dans ces conditions, la culture qui possède des vésicules a une vitesse de consommation de l'oxygène 6 à 7 fois plus élevée que celle dépourvue de vésicules.

La similitude entre les vésicules des Frankia et les hétérocystes des cyanobactéries est évidente et constitue un exemple de convergence évolutive entre deux micro-organismes d'origine très différente.

5.3. Voies initiales du métabolisme de l'azote chez Frankia cultivé in vitro

Dans le cas du Frankia ORS020602, nous avons pu doser, dans les extraits bruts provenant de divers milieux de culture, des activités glutamine synthétase (GS), glutamate synthase (GOGAT) NADH dépendante, glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT) ainsi qu'une alanine déshydrogénase (Ala.DH) NADH dépendante. Il n'a pas été possible de mettre en évidence la présence, chez Frankia, d'un système d'adénylation de la GS comparable à celui existant chez les bactéries gram⁻ (Wuff et al., 1977). Le Frankia étant classé comme organisme gram⁺ à gram variable, c'est probablement un système de régulation de la GS de type "Bacillus" qui doit exister chez Frankia.

Il est probable que chez Frankia ORS020602, l'assimilation de l'ammoniaque se fasse par l'action couplée GS-GOGAT comme chez la plupart des autres fixateurs d'azote (Nagatani et al., 1971).

En ce qui concerne les souches de Frankia isolées

de Colletia spinosissima (ORS060501) et d'Hippophaë rhamnoides (ORS140101), nous avons dosé dans leur extraits bruts, une activité GS et une activité GOT. L'alanine déshydrogénase n'a été trouvée que chez ORS060501. Quant à la GOGAT, aucune activité n'a pu être mise en évidence dans les extraits bruts de ces deux souches.

La seule étude comparable, concernant les enzymes de l'assimilation de l'azote des Frankia cultivés in vitro, a été effectuée sur la souche Avc11 (isolée d'Alnus crispa). Blom (1981) et Akkermans et al. (1983) n'ont pu caractériser que les activités GS et GOT dans les extraits bruts de ce Frankia cultivé sur différents milieux.

Ce n'est qu'une étude systématique et approfondie des enzymes de l'assimilation de l'azote chez des Frankia de diverses origines qui permettra de définir clairement les voies de l'assimilation de l'azote existantes chez ce micro-organisme cultivé in vitro.

En conclusion, on notera que la possibilité récente d'étudier les Frankia cultivés in vitro a conduit à des résultats très surprenants étant donné les difficultés rencontrées pour isoler cet endophyte, à savoir : (1) l'absence d'exigence nutritionnelle, (2) leur aptitude à fixer l'azote in vitro à des tensions élevées d'oxygène, (3) leur capacité à assimiler l'azote fixé par leur nitrogénase et donc à croître aux dépens de l'azote moléculaire.

CHAPITRE IV

ESTIMATION DU POTENTIEL FIXATEUR D'AZOTE
DE CASUARINA EQUISETIFOLIA

1. Introduction

La surface de la forêt mondiale a été estimée à 41×10^8 hectares et l'on suppose qu'elle fixe 40×10^6 tonnes d'azote par an (Burns et Hardy, 1975). Cette fixation d'azote représenterait 28 % du total de l'azote fixé au niveau de la planète. Cependant, les résultats concernant l'évaluation de la fixation de l'azote par les écosystèmes forestiers sont peu nombreux (Paul, 1978) et très disparates quant à la quantité d'azote réellement fixé.

Chez les légumineuses arborescentes, les estimations concernant les quantités d'azote fixé sont très variables : 13 kg N₂ hectare⁻¹ an⁻¹ pour Acacia pennatula (J.P. Roskoski et al., 1982), 34 kg N₂ hectare⁻¹ an⁻¹ pour Gliricidia sepium (J.P. Roskoski et al., 1982), 200 kg N₂ hectare⁻¹ an⁻¹ pour Acacia mearnsii (Orchard et Darby, 1956), 500 kg N₂ hectare⁻¹ an⁻¹ pour Leucaena leucocephala (N.A.S., 1977).

Chez les non-légumineuses, c'est le genre Alnus qui a été le plus étudié du fait de l'intérêt économique qui lui est reconnu en Europe et en Amérique du Nord. On estime que son potentiel fixateur d'azote se situe entre 60 et 300 kg N₂ hectare⁻¹ an⁻¹ (Silvester, 1977 ; Chatarpaul et Carlisle, 1983 ; Coté et Camiré, 1984).

En ce qui concerne Casuarina, la fixation d'azote est comprise entre 58 kg N₂ hectare⁻¹ an⁻¹ (Dommergues, 1963) pour C. equisetifolia et 218 kg N₂ hectare⁻¹ an⁻¹ pour Allocasuarina littoralis (Silvester, 1977).

La grande variabilité constatée au niveau de l'estimation de la fixation de l'azote par les arbres, symbiotiquement associés à Frankia ou à Rhizobium, est due à deux types de problèmes liés à l'évaluation de la fixation de l'azote au champ, à savoir :

1) les problèmes relatifs aux méthodologies employées : certaines méthodes conduisent à une surestimation de la fixation de l'azote, c'est le cas de la méthode de l'équivalent engrais (Larue et Patterson, 1981) et de la méthode basée sur le dosage de l'azote total accumulé dans les

feuilles (exemple : la fixation de 500 kg N₂ hectare⁻¹ an⁻¹ attribuée à leucaena leucocéphala ; NAS, 1977).

Les méthodes d'estimation de la fixation de l'azote telles que la méthode de la réduction de l'acétylène, la méthode par "différence", la méthode basée sur les bilans d'azote et les méthodes isotopiques ¹⁵N sont plus fiables mais présentent toutes des inconvénients (Knowles, 1980 ; Larue et Patterson, 1981 ; Vose et al., 1982).

2) les problèmes relatifs aux plantes pérennes, à savoir :

- le grand volume de sol exploré par les racines ;
- le recyclage des éléments nutritifs par l'intermédiaire de la litière ;
- la variabilité notée dans la croissance des plantes (ceci étant lié à l'utilisation de graines et à l'absence de sélection végétale.)
- l'augmentation de la teneur en azote du sol dans les vieux peuplements.

Afin de définir le plus précisément possible le potentiel fixateur d'azote de Causarina equisetifolia, nous avons mené 3 expériences en microparcelles en tentant de réduire au maximum les facteurs limitants la fixation d'azote (apport de phosphore et d'oligo-éléments, utilisation de sols stériles déficients en azote, arrosage quotidien).

Nous avons estimé la fixation d'azote par C. equisetifolia, inoculé par une souche pure de Frankia (ORS021001), sur des périodes de 5,5 mois et 6,5 mois, en utilisant diverses méthodes dont les méthodes isotopiques ¹⁵N.

A notre connaissance, il s'agit de la seule étude de ce type effectué sur les arbres fixateurs d'azote.

2. Estimation de la fixation potentielle d'azote par Casuarina equisetifolia cultivé en microparcelles expérimentales.

De 1982 à 1984, trois expériences en microparcelles

ont été effectuées afin de déterminer le potentiel fixateur d'azote de C. equisetifolia inoculé par une souche pure de Frankia (ORSO21001).

Nous nous sommes efforcés à résoudre au maximum l'effet des facteurs limitants la fixation d'azote en faisant des apports de phosphore et d'oligo-éléments et en arrosant quotidiennement les parcelles expérimentales.

Les potentialités fixatrices d'azote de C. equisetifolia ont été estimées par les 6 méthodes suivantes :

- méthode "par différence"
- méthode de "l'équivalent engrais"
- méthode de la réduction de l'acétylène
- méthode de la dilution isotopique (^{15}N)
- méthode de la valeur "A" (^{15}N)
- méthode de "l'abondance naturelle" en ^{15}N .

2.1. Les méthodes d'estimation

2.1.1. Méthode "par différence" (William et al., 1977)

Le principe de cette méthode consiste à estimer que la quantité d'azote fixé est égale à la différence entre la quantité totale d'azote contenue dans la biomasse d'une plante fixatrice d'azote et la quantité totale d'azote contenu dans une plante non-fixatrice d'azote (c'est une plante dont l'azote provient uniquement du sol). Dans le cadre de notre étude, nous avons comparé la quantité d'azote contenue dans des Casuarina inoculés par Frankia (souche ORSO210-01) ou non inoculés et cultivés dans les mêmes conditions. La difficulté majeure que soulève cette méthode est d'éviter la contamination des parcelles témoins. On notera en outre que la méthode n'est valable que si la nodulation n'altère ni la structure des racines ni l'absorption d'azote du sol, ce qui n'est pas prouvé.

2.1.2. Méthodes de "l'équivalent engrais"

Cette méthode consiste à comparer le contenu en azote de Casuarina inoculés par Frankia (souche ORSO21001) à celui de Casuarina ayant reçu diverses quantités d'engrais

azoté.

Cette méthode est en fait une variante de la méthode "par différence". Elle présente l'avantage sur cette dernière de permettre la comparaison de plantes ayant pratiquement le même développement racinaire, donc ayant exploité pratiquement les mêmes horizons et le même sol.

La méthode de "l'équivalent engrais" présente l'inconvénient de surestimer la fixation de N_2 car, dans le sol, l'engrais azoté est soumis au lessivage et à la dénitrification (son rendement est souvent méconnu).

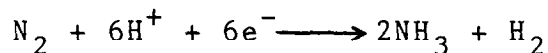
Un autre inconvénient de cette méthode réside dans le fait qu'elle ne permet pas de connaître le % de N fixé par rapport à l'azote total de la plante. En fait, cette méthode présente l'intérêt de fournir une indication de la valeur économique de la fixation de N_2 .

2.1.3. Méthode de la réduction d'acétylène (Postgate, 1972)

Cette méthode est basée sur le fait que la nitrogénase, contenue dans les nodules des plantes fixatrices d'azote, peut utiliser l'acétylène, comme substrat, et le réduire en éthylène. Cette méthode conduit à une estimation indirecte de la fixation d'azote.

Pratiquement, on met l'échantillon à incuber (nodule dans le cas de Casuarina) dans une enceinte renfermant 10 % d'acétylène pendant 30-60 mn. On prélève un échantillon de gaz et la quantité d'éthylène formé est déterminé par chromatographie en phase gazeuse.

La nitrogénase réduit l'acétylène en éthylène suivant la réaction : $3C_2H_2 + 6H^+ + 6e^- \longrightarrow 3C_2H_4$, alors que la réduction de N_2 (fixation de N_2) se fait suivant la réaction :



La principale hypothèse sur laquelle est fondée la méthode à l'acétylène concerne le rapport (dit facteur de conversion) C_2H_4/N_2 fixé. Pendant longtemps, on a admis

qu'à 1 mole de N_2 réduit correspondait 3 moles d'éthylène, le rapport de conversion étant de 3 : 1.

On pense actuellement que la réaction globale se rapproche de la suivante : $N_2 + 8H_2^+ + 8e^- \longrightarrow 2NH_3 + H_2$

En fait, protons (H^+) et acétylène rentrent en compétition pour les électrons. Cependant, dans le cas de l'incubation sous acétylène, la production de H_2 est faible.

Dans les nodules intacts, l'hydrogène produit par la nitrogénase est recyclé par l'hydrogénase ($H_2 \longrightarrow 2H^+ + 2e^-$) ce qui contribue à augmenter le rendement énergétique du système.

De ce fait, le rapport C_2H_4/N_2 varie grandement suivant les systèmes et les conditions d'incubation (Bergersen, 1970).

La méthode de réduction de l'acétylène à l'avantage d'être simple, économique et très sensible. Cependant, son inconvénient majeur est que l'on estime la fixation de l'azote par extrapolation d'une mesure instantanée.

2.1.4. Méthodes isotopiques

L'azote étant un mélange de 2 isotopes stables ^{14}N et ^{15}N , plusieurs méthodes d'estimation de la fixation de l'azote se sont développées en utilisant l'isotope ^{15}N comme traceur. "L'abondance" en ^{15}N , exprimée en atome $^{15}N\%$ est définie par :

$$A = \frac{\text{nombre d'atomes } ^{15}N}{\text{nombre d'atome } ^{14}N + \text{nombre d'atome } ^{15}N} \times 100$$

L'abondance isotopique de l'azote de l'air est de $0,3663 \pm 0,0004$ atome $^{15}N\%$.

Les techniques du marquage isotopique artificiel par ^{15}N conduisent à l'expression des compositions isotopiques en abondance absolue ou en excès isotopique, cet excès se définissant comme la différence entre l'azote isotopique de l'échantillon mesuré et celle de l'azote de l'air :

$$e\% = A \text{ échantillon} - A \text{ air}$$

Le spectromètre de masse mesure le rapport des intensités de courants d'ions produit par les deux faisceaux d'ions correspondants aux deux isotopes : il mesure donc

un rapport isotopique R qui est celui de $M/e = 29$ ($^{14}\text{N}^{15}\text{N}^+$) à $M/e = 28$ ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}^+$).

$$R = \frac{(^{14}\text{N}^{15}\text{N})}{(^{14}\text{N}^{14}\text{N})}$$

L'inconvénient majeur des méthodes isotopiques réside dans le fait que le dosage de l'azote isotopique (^{15}N) exige le recours à un appareillage coûteux : le spectromètre de masse. Toutefois, l'apparition récente sur le marché de spectromètres à émission permet d'espérer une diffusion plus grande de certaines méthodes isotopiques. Rappelons que, dans le spectromètre à émission, l'azote gazeux est excité par un oscillateur à haute fréquence et que les longueurs d'onde de la lumière émise dépend de la composition isotopique du gaz. Les spectromètres à émission sont moins précis que les spectromètres de masse mais ils sont moins coûteux et plus faciles à manipuler.

Deux types de méthodes, utilisant le ^{15}N comme traceur, ont été développés : (1) le ^{15}N traceur provient d'un apport d'engrais marqué au ^{15}N ; (2) le ^{15}N traceur est constitué par l'abondance naturelle ^{15}N de la plante.

2.1.4.1. Méthodes basées sur l'apport d'engrais marqué au ^{15}N

2.1.4.1.1. Dilution isotopique (Bremner, 1975)

En enrichissant l'azote du sol en ^{15}N par ajout d'un engrais marqué au ^{15}N , on provoque une dilution isotopique au sein de la plante étudiée. La détermination du rapport du contenu en ^{15}N d'une plante fixatrice à une plante référence non fixatrice permet l'estimation de l'azote du sol et par conséquent celle de la fixation de l'azote. Ceci du fait que l'enrichissement en ^{15}N est moindre chez la plante fixatrice d' N_2 , qui utilise l'azote de l'air, que chez la plante non fixatrice.

On cultive simultanément dans deux parcelles distinctes des plantes fixatrices (Casuarina nodulés) et des plantes témoins (Casuarina non nodulés), le sol ayant reçu dans

les deux cas une même quantité d'engrais azoté ^{15}N .

Le postulat de base de cette méthode est que la plante témoin et la plante fixatrice d' N_2 utilisent dans les mêmes proportions l'azote du sol et l'azote de l'engrais azoté. Si l'on désigne par s_o le pourcentage de l'azote du sol et f_o le pourcentage de l'azote dérivé de l'engrais chez la plante non fixatrice de N_2 et par s_n le pourcentage de l'azote dérivé du sol et f_n le pourcentage de l'azote dérivé de l'engrais chez la plante fixatrice de N_2 , on peut écrire :

$$\frac{f_o}{s_o} = \frac{f_n}{s_n} \quad (1)$$

En outre, si l'on désigne par y le pourcentage d'azote fixé dans la plante fixatrice d'azote, on peut écrire :

- pour la plante non fixatrice d' N_2 :

$$s_o + f_o = 100 \quad (2)$$

- pour la plante fixatrice d' N_2 :

$$s_n + f_n + y = 100 \quad (3)$$

On tire des trois équation :

$$y = \left(1 - \frac{f_n}{f_o} \right) \times 100$$

Si l'on désigne par e_o l'excès isotopique dans les plantes non fixatrices d'azote et par e_n l'excès isotopique dans les plantes fixatrices d'azote, on peut écrire (étant donné que les mêmes quantités d'engrais marqué de façon identique ont été appliquées dans les deux cas) :

$$\frac{f_n}{f_o} = \frac{e_n}{e_o}$$

Si l'on connaît la teneur en azote total des plantes (N) fixatrices de N_2 , la fixation d'azote Y se calcule comme suit : $Y = y + N$

L'inconvénient de la méthode réside dans le fait que la plante non fixatrice peut croître beaucoup moins bien que la plante fixatrice de N_2 et ne pas constituer un bon témoin.

2.1.4.1.2. Valeur "A" (Fried et al., 1975-1977)

Cette méthode est en fait une variante de la méthode de dilution isotopique ; elle consiste à appliquer des petites doses d'engrais marqués au ^{15}N aux plantes fixatrices d'azote et des doses d'engrais marqués plus importantes aux plantes non-fixatrices d'azote. 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 d'azote.

Nous adopterons, pour le raisonnement qui va suivre, les définitions suivantes :

s_o = pourcentage de l'azote dérivé du sol chez les plantes non-fixatrices d'azote ;

f_o = pourcentage de l'azote dérivé de l'engrais chez les plantes non-fixatrices d'azote ;

e_o = excès isotopique dans les plantes non-fixatrice d'azote ;

e_{fo} = excès isotopique de l'engrais marqué au ^{15}N appliqué aux plantes non-fixatrices d'azote ;

Dans le cas des plantes non-fixatrices d'azote, on peut écrire :

$$f_o = \left(\frac{e_o}{e_{fo}} \right) \times 100$$

$$s_o + f_o = 100$$

Dans le cas des plantes nodulées, fixatrices d'azote, on adoptera les définitions suivantes :

s_n = pourcentage de l'azote dérivé du sol chez les plantes nodulées fixatrices d'azote ;

f_n = pourcentage de l'azote dérivé de l'engrais chez les plantes nodulées fixatrices d'azote ;

e_n = excès isotopique dans les plantes nodulées

fixatrices d'azote ;

e_n = excès isotopique de l'engrais marqué au ^{15}N appliqué aux plantes nodulées fixatrices d'azote ;

y = pourcentage de l'azote dérivé de la fixation d'azote chez les plantes nodulées fixatrices d'azote.

On peut écrire les deux équations suivantes :

$$f_n = \left(\frac{e_n}{e_{fn}} \right) \times 100$$

$$f_n + s_n + y = 100$$

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 de l'air, N de l'engrais) est directement proportionnelle à la quantité d'azote disponible dans chaque source, cette quantité étant mesurée avec la même unité : la valeur A.

Il découle de cette hypothèse de base que l'on peut écrire l'équation suivante :

$$\frac{\% \text{ N dérivé de l'engrais}}{\text{Valeur "A" de l'engrais}} = \frac{\% \text{ N dérivé de fixation de } \text{N}_2}{\text{Valeur "A" de fixation de } \text{N}_2} = \frac{\% \text{ N dérivé sol}}{\text{Valeur "A" sol}}$$

La valeur "A" de l'engrais est la quantité d'engrais apporté.

Dans le cas des plantes non-fixatrices, on définira les valeurs suivantes :

A 'fert.O' = quantité d'azote appliqué aux plantes non-fixatrices d'azote ;

A 'sol' = quantité d'azote disponible dans le sol.

On en déduit :

$$A \text{ 'sol'} = \frac{100 - f_o}{f_o} \times A \text{ 'fert.O'}$$

Dans le cas des plantes nodulées fixatrices d'azote, on définira les valeurs suivantes :

A 'fert.n' = quantité d'azote appliqué aux plantes nodulées fixatrices d'azote ;

A 'sol + fix.' = quantité d'azote, venant du sol et de la fixation d' N_2 , exprimée en équivalent engrais.

On en déduit :

$$A \text{ 'sol + fix.'} = \frac{100 - f_n}{f_n} \times A \text{ 'fert.n'}$$

Si A 'fix.' est la quantité d'azote fixée, (exprimée en équivalent engrais) et en supposant que le A 'sol' est le même pour les plantes fixatrices et non-fixatrices, on peut écrire :

$$A \text{ 'fix.'} = A \text{ 'sol + fix.'} - A \text{ 'sol'}$$

D'autre part, le postulat de base de la valeur A nous permet d'écrire :

$$\frac{s_n}{A \text{ 'sol'}} = \frac{f_n}{A \text{ 'fert.n'}} = \frac{y}{A \text{ 'fix.'}}$$

$$\text{et donc : } y = \frac{A \text{ 'fix.'}}{A \text{ 'fert.n'}} \times f_n$$

Si N est l'azote total contenu dans les plantes fixatrices d'azote, la quantité d' N_2 fixé est donc de :

$$Y = y \times N$$

2.1.4.2. Méthode de l'abondance isotopique ^{15}N naturelle

En 1970, Delwiche et Steyn observèrent des différences, dans les abondances isotopiques naturelle en ^{15}N , entre plantes fixatrices et non-fixatrices d'azote. Ils suggérèrent la possibilité d'utiliser ces différences pour mesurer la fixation symbiotique.

Depuis lors, cette méthode a été employée pour mesurer la fixation de l'azote chez certaines légumineuses (Amarger et al., 1977 et 1979 ; Kohl et al., 1980 ; Mariotti et al., 1983).

La précision requise pour mesurer les faibles variations d'abondance naturelle ^{15}N a rendu nécessaire la mise

au point de techniques analytiques, faisant appel à une mesure relative de ces abondances isotopiques. On est ainsi conduit à l'utilisation d'une unité relative d'expression de la composition isotopique : l'unité δ .

Cette unité, s'écrit, pour l'azote :

$$\delta^{15}\text{N} = \frac{R_{\text{échantillon}} - R_{\text{air}}}{R_{\text{air}}}$$

Compte tenu des faibles variations d'abondance isotopique δ sera petit, ce qui conduit à l'utilisation pratique d'une expression en parts pour mille :

$$\delta^{15}\text{N}\text{‰} = \left(\frac{R_{\text{échantillon}}}{R_{\text{air}}} - 1 \right) \cdot 1000$$

Comme dans la plupart des réactions biochimiques, il y a, dans le processus de fixation de N_2 , discrimination entre les isotopes ^{14}N et ^{15}N , le plus léger circulant plus vite dans les chaînes métaboliques : il y a enrichissement en ^{14}N . Il résulte de ces deux phénomènes que le $\delta^{15}\text{N}$ de la plante fixatrice de N_2 est plus faible que le $\delta^{15}\text{N}$ d'une plante non-fixatrice d' N_2 .

On définit :

δ inoc = composition isotopique de la plante, inoculée par Frankia, fixatrice d' N_2 .

δ témoin = composition isotopique de la plante non-fixatrice d' N_2 ;

ϵ fix = facteur d'enrichissement isotopique associé à la fixation de l'azote.

D'après Mariotti (1982), le pourcentage d'azote fixé par la plante fixatrice est égal à :

$$y = \frac{\delta \text{ inoc} - \delta \text{ témoin}}{\epsilon \text{ fix} - \delta \text{ témoin}} \times 100$$

Si N est la teneur d'azote total de la plante fixatrice, la fixation totale de N_2 est :

$$Y = y \times N$$

La valeur ϵ fix. varie selon les plantes et doit être déterminée cas par cas. En ce qui concerne le Casuarina, elle est en cours de détermination. Pour les résultats rapportés dans ce travail, nous avons fait les calculs en faisant l'hypothèse d'un $\epsilon = -1 \%$, ce qui est une valeur moyenne chez les légumineuses (Mariotti ; 1982).

La méthode de l'abondance naturelle en ^{15}N peut être d'une grande utilité lors de la recherche de nouvelles plantes fixatrices d'azote. En particulier, c'est à la suite d'une étude générale sur l'abondance naturelle en ^{15}N des plantes de Californie que Heisy et al. (1980) ont été conduits à s'intéresser à Chamaebatia foliosa et ont démontré que cette plante, de la famille des Rasacées, est nodulée par Frankia.

2.2. Expérience n°1 (article 8)

2.2.1. Dispositif expérimental

Cette expérience a été menée en 1982-83 dans 12 microparcelles étanches (1 m^2 de surface x 1 m de profondeur) contenant 1 m^3 de sol de Bel Air (C = 0,3 % ; N = 0,025 % ; pH = 7) préalablement homogénéisé et stérilisé au bromure de méthyle.

Après germination des graines sur sol de Bel Air stérile, les plantules de Casuarina equisetifolia âgées de 1 mois ont été transplantées dans des sacs de polyéthylène contenant un mélange de vermiculite et de sol stérile (1:5). Avant transfert dans les sacs, une partie des plantules ont été inoculées par Frankia en trempant leurs racines dans une suspension de la souche ORS021001 (syn. Cj1-82). Les plants de C. equisetifolia ont été ensuite cultivés 3,5 mois dans ces sacs de polyéthylène.

A l'âge de 4,5 mois, les Casuarina ont été transplantés dans les microparcelles à raison de 4 par m^2 . A ce stade de leur croissance, les plants inoculés mesuraient en moyenne 30 cm contre 25 cm pour les plants non inoculés.

Le contenu en azote des plants était en moyenne de 30 mg N plant⁻¹.

Nous avons effectué les 3 traitements suivants :

(1) Arbres non inoculés ayant reçu un apport de 2 g ¹⁵N m⁻² :

Lors de la transplantation, l'engrais azoté a été appliqué à raison de 2 g N.m⁻² (0,5 g N arbre⁻¹) en utilisant une solution de (¹⁵NH₄)₂ SO₄ ayant un excès isotopique de 10,05%.

(2) Arbres non inoculés ayant reçu un apport de 10 g ¹⁵N m⁻² :

Lors de la transplantation, l'engrais azoté a été appliqué à raison de 10 g N m⁻² (2,5 g N arbre⁻¹) en utilisant une solution de (¹⁵NH₄)₂ SO₄ ayant un excès isotopique de 1,90%.

(3) Arbres inoculés par Frankia (souche ORSO21001) ayant reçu un apport de 2 g ¹⁵N.m⁻² : Lors de la transplantation, l'engrais azoté a été appliqué à la même concentration que dans le traitement (1).

Lors de la transplantation, chaque microparcelle a reçu 17 g m⁻² de K₂ HPO₄. Tout au long de l'expérience, les plants ont été quotidiennement arrosés. A partir du huitième mois, nous avons apporté des oligo-éléments, sous forme de solution Hewitt sans azote, ajoutée tous les 15 jours aux microparcelles (1 l m⁻²).

Les Casuarina ont été coupés à l'âge de 11 mois, soit après 6,5 mois de croissance en microparcelles (Figure 14). Les plants témoins contaminés (c'est-à-dire nodulés) ont été éliminés. De ce fait, les calculs ont été effectués sur 13 arbres pour le traitement (1), 13 arbres pour le traitement (2) et 16 arbres pour le traitement (3).

Chaque arbre a été divisé en 3 fractions : Cladodes (rameaux photosynthétiques), Petits bois (diamètre < 4 mm) et Gros bois (diamètre > 4 mm). Après séchage à 60-70°C, la totalité de chaque fraction a été réduite en poudre (100µm). Chaque poudre a été analysée en ce qui concerne l'azote total par la méthode de Kjeldhal (Mc Kenzie et Wallace 1954) et l'excès isotopique ¹⁵N. Les analyses concernant la ¹⁵N ont été effectuées par l'AIEA de Vienne (Autriche).



FIGURE 14. Dispositif expérimental de l'expérience n°1. Effet de l'inoculation par Frankia ORS021001 sur la croissance de Casuarina equisetifolia âgés de 11 mois.

2.2.2. Résultats

Le tableau 22 rapporte l'effet de l'inoculation par Frankia de Casuarina equisetifolia. Les augmentations dues à l'inoculation par Frankia sont 27 % pour la hauteur des arbres, 78 % pour le poids sec et de 170 % pour l'azote total.

2.2.2.1. Estimation de la fixation d'azote

2.2.2.1.1. Estimation par la méthode "par différence"

Nous avons estimé la fixation d'azote en comparant le traitement (3) (inoculé par Frankia) au traitement (1) qui a reçu le même apport d'engrais azoté ($0,5 \text{ g N. arbre}^{-1}$) (tableau 22). Si on désigne : n = azote total par arbre inoculé au moment de la transplantation dans les microparcelles ($n = 0,03 \text{ g N arbre}^{-1}$) ; N_1 = azote total moyen par arbre dans le traitement (1) ($N_1 = 1,77 \text{ g N. arbre}^{-1}$) ; x = azote total de chaque arbre du traitement (3) ; $D = N_2$ fixé par arbre du traitement(3).

On peut écrire :

$$D = x - N_1 - n$$

$$D = x - 1,77 - 0,03$$

La moyenne de 16 répétitions D du traitement (1) est de $3,09 \pm 1,86 \text{ g N}_2$ fixé par arbre en 6,5 mois. Ceci représente $49 \pm 14,8 \%$ de l'azote de chaque arbre.

2.2.2.1.2. Estimation par la méthode de "l'équivalent engrais"

Si N_1 et N_2 sont les quantités moyennes en azote des arbres des traitements (1) et (2) (tableau 22), on peut estimer que l'augmentation due à une application plus importante d'engrais ($2,5 \text{ g N} - 0,5 \text{ g N} = 2 \text{ g N. arbre}^{-1}$) est égale à :

$$N_2 - N_1 - n = 2,71 - 1,77 - 0,03 = 0,91 \text{ g N.}$$

Tableau 22. Influence de l'inoculation par Frankia (souche ORS021001) sur la croissance de Casuarina equisetifolia âgés de 11 mois (expérience n°1)

| Traitements ⁽¹⁾ | Hauteur (cm arbre ⁻¹) | Poids sec (g arbre ⁻¹) | N (%) | N total (g N arbre ⁻¹) | Poids sec de nodule (g. arbre ⁻¹) |
|----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------|---------------------------------------|--|
| 1 | 170 (100) a | 295 (100) a | 0,60 (100) a | 1,77 (100) a | 0 |
| 2 | 192 (112) ab | 409 (138) ab | 0,65 (108) a | 2,71 (153) ab | 0 |
| 3 | 216 (127) b | 525 (178) b | 0,86 (143) b | 4,78 (270) b | 17,4 |

(1) traitements: (1) arbres non inoculés ayant reçus un apport d'azote de 0,5 g N arbre⁻¹;
(2) arbres non-inoculés ayant reçu un apport d'azote de 2,5 g N arbre⁻¹; (3) arbres inoculés par Frankia ORS021001, ayant reçu un apport d'azote de 0,5 g N arbre⁻¹.

. Entre parenthèses: augmentation par rapport au traitement (1) considéré comme base 100.

. Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05, test de Duncan).

Tableau 23. Evaluation de l'azote dérivé de l'engrais marqué au ^{15}N chez les arbres non-inoculés ayant reçu un apport d'azote de 0,5 g N arbre $^{-1}$ (traitement (1), expérience n°1).

| Arbre N° | Poids sec (g arbre $^{-1}$) | N total N (%) (g arbre $^{-1}$) | N dérivé de l'engrais (f) % | N dérivé de l'engrais (f) (g arbre $^{-1}$) | Taux d'uti- lisation de l'en- grais % | |
|----------------|---------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|--|--|--------------|
| 1 | 162.4 | 0.66 | 1.08 | 8.75 | 0.094 | 18.8 |
| 2 | 220.8 | 0.55 | 1.21 | 14.32 | 0.173 | 34.6 |
| 3 | 417.9 | 0.63 | 2.65 | 4.85 | 0.128 | 25.6 |
| 4 | 82.2 | 0.64 | 0.53 | 17.69 | 0.094 | 18.8 |
| 5 | 243.0 | 0.58 | 1.42 | 9.84 | 0.140 | 28 |
| 6 | 424.8 | 0.65 | 2.77 | 5.88 | 0.163 | 32.6 |
| 7 | 301.4 | 0.65 | 1.97 | 5.46 | 0.107 | 21.4 |
| 8 | 248.6 | 0.58 | 1.45 | 9.03 | 0.131 | 26.2 |
| 9 | 465.7 | 0.60 | 2.78 | 5.13 | 0.142 | 28.4 |
| 10 | 329.1 | 0.49 | 1.61 | 9.29 | 0.149 | 29.8 |
| 11 | 382.8 | 0.61 | 2.35 | 6.94 | 0.163 | 32.6 |
| 12 | 331.3 | 0.60 | 1.98 | 8.59 | 0.170 | 34 |
| 13 | 224.5 | 0.54 | 1.21 | 8.99 | 0.109 | 21.8 |
| Moyenne | 295 | 0.60 | 1.77 | 8.83 | 0.135 | 27.12 |
| | ±70 | ±0.03 | ±0.45 | ±2.32 | ±0.017 | ±3.52 |

(±): intervalle de confiance.

Tableau 24. Evaluation de l'azote dérivé de l'engrais marqué au ^{15}N et calcul de la valeur A 'sol' chez les arbres non-inoculés ayant reçu un apport d'azote de 2,5 g N arbre $^{-1}$ (traitement (2), expérience n°1)

| Arbre N° | Poids sec (g arbre $^{-1}$) | N (%) | N total (g arbre $^{-1}$) | N dérivé de l'engrais (f) % | N dérivé de l'engrais (f) (g.arbre $^{-1}$) | Taux d'utili- sation de l'engrais(%) | A 'sol' (g arbre $^{-1}$) |
|----------|---------------------------------|-------|-------------------------------|-----------------------------------|--|--|-------------------------------|
| 1 | 346.2 | 0.70 | 2.41 | 23.92 | 0.576 | 23.05 | 7.95 |
| 2 | 619.3 | 0.76 | 4.73 | 21.45 | 1.014 | 40.58 | 9.15 |
| 3 | 498.2 | 0.60 | 2.97 | 24.48 | 0.727 | 29.00 | 7.71 |
| 4 | 172.3 | 0.56 | 0.98 | 31.30 | 0.306 | 12.26 | 5.49 |
| 5 | 753.2 | 0.62 | 4.70 | 20.67 | 0.971 | 38.86 | 9.59 |
| 6 | 457.7 | 0.56 | 2.55 | 14.50 | 0.370 | 14.79 | 14.74 |
| 7 | 322.8 | 0.67 | 2.18 | 33.23 | 0.724 | 28.97 | 5.02 |
| 8 | 237.8 | 0.61 | 1.46 | 27.63 | 0.403 | 16.13 | 6.55 |
| 9 | 521.9 | 0.71 | 3.72 | 23.10 | 0.859 | 34.37 | 8.32 |
| 10 | 328.5 | 0.58 | 1.92 | 35.33 | 0.678 | 27.13 | 4.57 |
| 11 | 504.9 | 0.74 | 3.75 | 29.92 | 1.122 | 44.88 | 5.85 |
| 12 | 303 | 0.64 | 1.94 | 29.73 | 0.576 | 23.07 | 5.91 |
| 13 | 254.5 | 0.75 | 1.92 | 24.08 | 0.462 | 18.49 | 7.88 |
| Moyenne | 409 | 0.65 | 2.71 | 26.10 | 0.676 | 27.04 | 7.59 |
| | ±105 | ±0.04 | ±0.75 | ±3.63 | ±0.163 | ± 6.54 | ±1.68 |

(±) : Intervalle de confiance.

L'augmentation dûe à l'inoculation par Frankia est de : $4,78 - 1,77 - 0,03 = 2,98$ g N.

On peut donc estimer que l'inoculation par Frankia correspond à l'application de $2 \times \frac{2,98}{0,91} = 6,55$ g N d'engrais en 6,5 mois.

2.2.2.1.3. Estimation par la méthode de dilution isotopique ^{15}N

Nous avons calcul e la moyenne des pourcentages de l'azote total dérivé de l'engrais azoté (f_o) dans le cas du traitement (1) : $f_o = 8,83$ % (tableau 23)

Pour chaque arbre du traitement (3), nous avons calcul e le pourcentage d'azote provenant de la fixation d' N_2 (y), en utilisant les valeurs individuelles de pourcentage de l'azote total dérivé de l'engrais azoté (f_n) des plants de Casuarina nodul es (tableau 25) :

$$y = \left(1 - \frac{f_n}{8,83}\right) \times 100$$

Pour chaque arbre nodul e (traitement (3)), l'azote, total fixé (g arbre^{-1}) a  e calcul e de la façon suivante : $Y = y \times N$ (ou N est l'azote total de chaque arbre).

Par cette p eriod e on peut estimer que 55 ± 11 % de l'azote des arbres nodul es par Frankia, provient de la fixation d'azote. Ceci représente $3,27 \pm 1,6$ g N_2 fix e par arbre en 6,5 mois.

2.2.2.1.4. Estimation par la méthode de la "valeur A"

Nous avons calcul e la valeur A 'sol' à partir des résultats obtenus dans le traitement (2). Nous considérons cette valeur A 'sol' (7,59) comme une constante dans notre expérience (tableau 24).

Pour chaque arbre du traitement (3) (inocul e par Frankia), nous avons calcul e les valeurs A 'sol' + fix.' puis les valeurs A 'fix.' par différence (Tableau 25) :

$$A \text{ 'fix.'} = A \text{ 'sol + fix.'} - 7,59.$$

Tableau 25. Calcul de la valeur A'fix.' et estimation de la fixation d'azote chez les arbres inoculés par Frankia ORS021001 et ayant reçu un apport d'azote de 0,5 g N arbre⁻¹ (traitement 3, expérience n°1)

| Arbre n° | Poids sec (g arbre ⁻¹) | Nodules (g arbre ⁻¹) | N % | N total (g.arbre ⁻¹) | f (%) | f (g arbre ⁻¹) | T (%) | A'sol+fix _l ' (g arbre ⁻¹) | A'fix.' (g arbre ⁻¹) | N ₂ fixé (y) % | N ₂ fixé(Y) (g arbre ⁻¹) |
|-----------|------------------------------------|----------------------------------|-------|----------------------------------|-------|----------------------------|-------|---|----------------------------------|---------------------------|---|
| 1 | 806,2 | 20,2 | 0,80 | 6,47 | 3,8 | 0,249 | 49,8 | 12,48 | 4,89 | 37,65 | 2,43 |
| 2 | 424,9 | 12,1 | 0,65 | 2,77 | 4,78 | 0,132 | 26,4 | 9,96 | 2,37 | 22,65 | 0,63 |
| 3 | 190,0 | 4,0 | 0,61 | 1,165 | 10,98 | 0,128 | 25,6 | 4,05 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 532,0 | 20,6 | 0,88 | 4,70 | 4,01 | 0,188 | 37,6 | 11,97 | 4,38 | 35,13 | 1,65 |
| 5 | 392,4 | 26,0 | 0,83 | 3,26 | 3,56 | 0,116 | 23,2 | 13,54 | 5,95 | 42,36 | 1,38 |
| 6 | 872,6 | 25,5 | 0,97 | 8,47 | 1,93 | 0,163 | 32,6 | 25,40 | 17,81 | 68,74 | 5,82 |
| 7 | 749,9 | 24,0 | 0,89 | 6,69 | 2,20 | 0,147 | 29,4 | 22,23 | 14,64 | 64,41 | 4,31 |
| 8 | 420,8 | 27,5 | 0,98 | 4,15 | 3,58 | 0,148 | 29,6 | 13,46 | 5,87 | 42,00 | 1,74 |
| 9 | 765,1 | 6,0 | 0,92 | 7,02 | 3,90 | 0,273 | 54,6 | 12,32 | 4,73 | 36,89 | 2,59 |
| 10 | 340,1 | 6,3 | 0,60 | 2,03 | 6,31 | 0,128 | 25,6 | 7,44 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 313,1 | 6,0 | 1,04 | 3,26 | 2,45 | 0,080 | 16,0 | 19,91 | 12,32 | 60,37 | 1,97 |
| 12 | 175,2 | 8,2 | 0,63 | 1,10 | 3,20 | 0,035 | 7,0 | 15,12 | 7,53 | 48,19 | 0,53 |
| 13 | 1280,7 | 69,5 | 1,18 | 15,10 | 1,85 | 0,279 | 55,8 | 26,52 | 18,93 | 70,04 | 10,57 |
| 14 | 337,8 | 8,2 | 0,94 | 3,18 | 4,97 | 0,158 | 31,6 | 9,56 | 1,97 | 19,58 | 0,62 |
| 15 | 443,4 | 8,0 | 0,87 | 3,85 | 4,50 | 0,173 | 34,6 | 10,61 | 3,02 | 27,18 | 1,05 |
| 16 | 350,2 | 6,8 | 0,96 | 3,36 | 3,10 | 0,104 | 20,8 | 15,63 | 8,04 | 49,85 | 1,67 |
| Moyen-524 | | 17,43 | 0,86 | 4,78 | 4,07 | 0,156 | 31,26 | 14,36 | 7,02 | 39,06 | 2,31 |
| ne | ±162 | ± 8,96 | ±0,09 | ±1,9 | ±1,2 | ±0,036 | ±7,29 | ±3,42 | ±3,26 | ±11,89 | ±1,47 |

(±): Intervalle de confiance; f = N dérivé de l'engrais; T = Taux d'utilisation de l'engrais

Nous avons également calculé pour chaque arbre du traitement (3) le pourcentage de l'azote total provenant de la fixation d'azote (tableau 25) :

$$y = \frac{A \text{ 'fix.' } \times f_n}{0,5}$$

Enfin, l'azote total provenant de la fixation d'azote (g. arbre⁻¹) a été calculé par l'équation suivante :

$$Y = y \times N \text{ (où } N \text{ est l'azote total de chaque arbre).}$$

Par cette méthode on peut estimer que 39[±] 11,89 % de l'azote des arbres, nodulés par Frankia, provient de la fixation de l'azote. Ceci représente 2,31[±] 1,47 g N₂ fixé par arbre en 6,5 mois.

2.2.2.2. Variabilité du potentiel fixateur d'azote des arbres nodulés par Frankia (traitement 3).

La fixation d'azote estimée des 16 arbres du traitement (3) varie de 0 à 10,57 g.N arbre⁻¹ (tableau 25). Cette grande variabilité ne peut pas être attribuée ni à l'endophyte de Casuarina, ni à l'hétérogénéité du sol, car les arbres ont été inoculés par une souche pure de Frankia (ORS021001) tandis que le sol a été homogénéisé avant d'être introduit dans les microparcelles expérimentales.

Il nous semble plus probable que la variabilité, rencontrée au niveau de l'azote fixé par les arbres nodulés, soit liée au stade de développement de chaque arbre. En effet, si nous groupons les arbres du traitement (3) en 5 classes, basées sur leur contenu en azote total (classes 1-2,5 g N ; 2,5-5 g N ; 5-7,5 g N ; 7,5-10 g N ; 10-15 g N), on constate que ce sont les arbres les plus petits qui ont le pourcentage d'azote provenant de la fixation d'N₂ (y) le plus faible (Fig. 15). Le pourcentage d'azote provenant de la fixation d'N₂ (y) est de 16% dans la classe "1-2,5 g N" et augmente jusqu'à 70 % chez les arbres les plus développés. Quant à l'azote provenant du sol et de l'engrais, leurs pourcentages respectifs suivent le chemin inverse (Fig. 15). Des résultats similaires ont été observés, chez le soja et

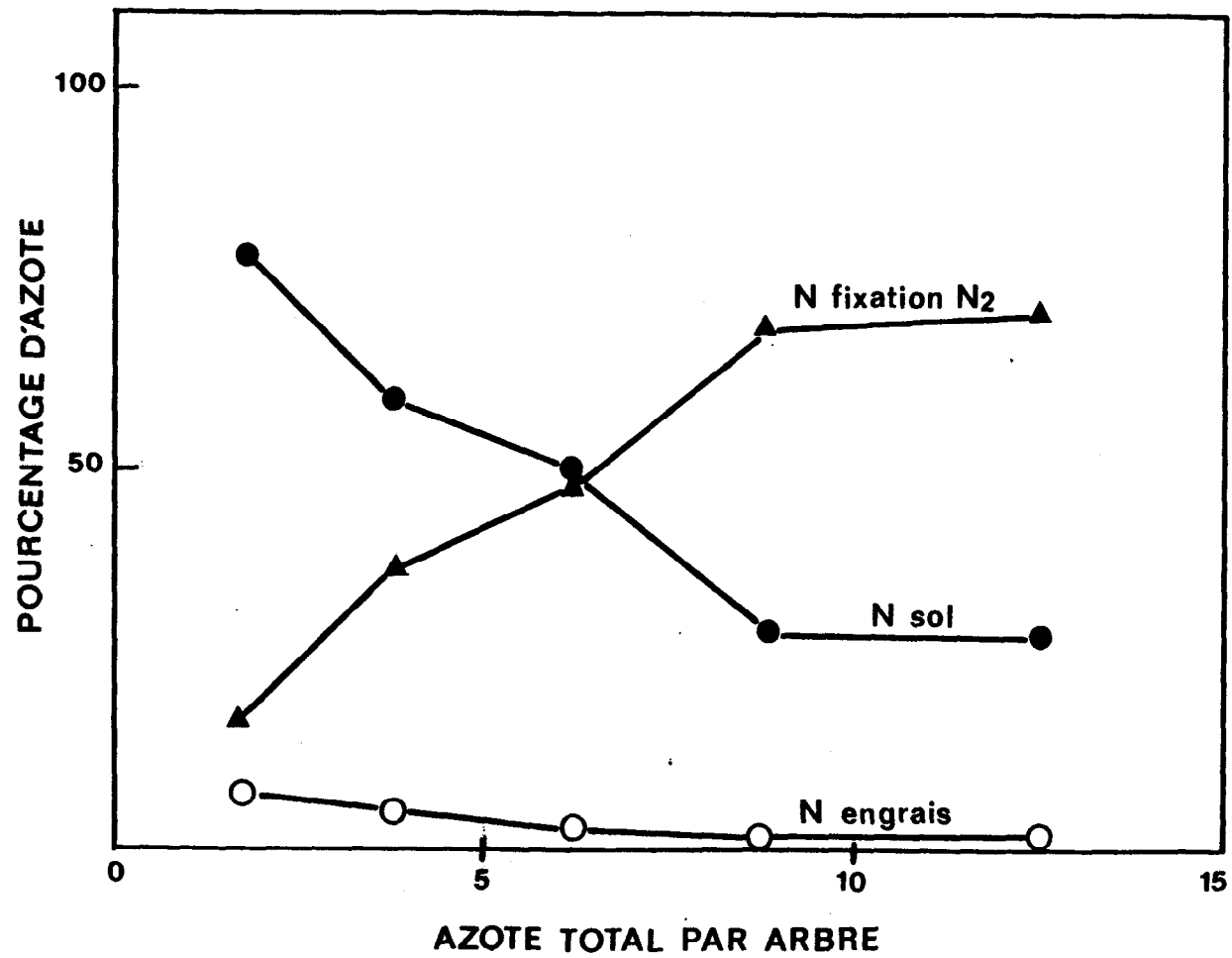


FIGURE 15. Provenance de l'azote chez *Casuarina equisetifolia*, nodulé par *Frankia* (ORS021001), en fonction de l'azote total de l'arbre.

la fève, par Zapata et al., (communication personnelle).

Il est intéressant de noter que la courbe, représentant le pourcentage d'azote fixé (y) en fonction de l'azote total de l'arbre (N), est de type exponentielle avec une asymptote qui, manifestement, se trouve autour de $y = 70 \%$ (Fig. 15). Ceci suggère que, tout au moins pour un type de sol et une espèce végétale fixatrice d' N_2 donnés, nous pourrions modéliser le système en utilisant des arbres marqués au ^{15}N représentant un grand nombre de tailles distinctes afin d'obtenir une courbe de référence (y) fonction de (N). Une fois cette courbe étalon établie, il suffirait de doser l'azote total d'un arbre pour avoir une estimation de sa fixation d'azote.

2.3. Expérience n° 2

2.3.1. Dispositif expérimental

Cette expérience a été effectuée dans les cylindres de plastique sans fonds (30 cm de diamètre et 1 m de longueur) enfoncés dans le sol et remplis de sol de Bel Air préalablement homogénéisé et stérilisé au bromure de méthyle.

Des plants de Casuarina equisetifolia, inoculés par Frankia (souche ORS021001) ou non inoculés, ont été cultivés pendant 3 mois en tubes de Gibson (1963). Les plants inoculés ont été cultivés sur milieu Hoagland sans azote (Hoagland et Arnon, 1950) tandis que les plants non-inoculés ont été cultivés sur milieu Hoagland supplémenté en azote.

Lors de la transplantation dans les cylindres, chaque arbre a reçu 4,25 g de K_2HPO_4 . Tout au long de l'expérience, les casuarinas ont été quotidiennement arrosés. Tous les 15 jours, des oligo-éléments ont été apportés sous forme de solution Hewitt sans azote à raison de 0,25 l arbre⁻¹. Il n'y a pas eu d'apport d'engrais azoté.

Après 6,5 mois de croissance, les arbres ont été coupés et réduits en poudre par fractions comme décrit pour l'expérience n°1. Chaque poudre a été analysée en ce qui

Tableau 26. Estimation de la fixation d'azote chez Casuarina equisetifolia âgés de 9,5 mois et inoculés par Frankia (souche ORSO21001), par la mesure de l'abondance isotopique ¹⁵N naturelle (expérience n°2)

| Traitements | Echan- ⁽¹⁾ tillons | N total g | Σ N total (g.arbre ⁻¹) | δ ‰ | δ pondéré ‰ | N fixé ‰ | N fixé (g.arbre ⁻¹) |
|--------------------------------|----------------------------------|--------------|---------------------------------------|--------|----------------|-------------|------------------------------------|
| Inoculation par Frankia | | | | | | | |
| . Arbre 1 | C | 1,81 | | 3,8 | | | |
| | PB | 0,22 | 2,27 | 5,0 | 4,15 | 39,8 | 0,90 |
| | GB | 0,19 | | 5,9 | | | |
| | Nod | 0,056 | | 5,8 | | | |
| . Arbre 2 | C | 1,56 | | 4,1 | | | |
| | PB | 0,25 | 2,10 | 4,8 | 4,51 | 35,6 | 0,75 |
| | GB | 0,24 | | 7,6 | | | |
| | Nod | 0,05 | | 1,1 | | | |
| . Arbre 3 | C | 1,50 | | 3,8 | | | |
| | PB | 0,27 | 2,14 | 5,1 | 3,95 | 42,1 | 0,90 |
| | GB | 0,27 | | 4,8 | | | |
| | Nod | 0,10 | | 0,8 | | | |
| Témoins non inoculés | | | | | | | |
| . Arbre 4 | C | 0,79 | | 7,6 | | | |
| | PB | 0,18 | 1,14 | 10,2 | 8,9 | | |
| | GB | 0,17 | | 8,1 | | | |
| . Arbre 5 | C | 1,22 | | 6,1 | | | |
| | PB | 0,23 | 1,61 | 8,9 | 7,0 | | |
| | GB | 0,16 | | 11,1 | | | |

(1) C = Cladodes; PB = Petit bois; GB = Gros bois; Nod = Nodules

concerne l'azote total (méthode de Kjeldhal) et l'abondance isotopique naturelle de ^{15}N . Les analyses ^{15}N ont été effectuées par le Dr Mariotti de l'Université de Paris VI.

2.3.2. Estimation de la fixation de l'azote

Le tableau 26 rapporte les résultats concernant trois casuarinas inoculés par Frankia (moyenne de nodulation : 3,85 g de poids sec de nodule arbre⁻¹) et deux casuarinas témoins non nodulés.

2.3.2.1. Estimation par la méthode par différence

La moyenne de l'azote total par arbre non-inoculé étant de 1,37 g N, la quantité d'azote fixé par arbre nodulé est estimé à $0,81 \pm 0,32$ g N fixé ce qui représente $37,3 \pm 14,8$ % de l'azote total de ces arbres.

2.3.2.2. Estimation par la méthode de l'abondance naturelle en ^{15}N

En prenant le δ moyen des témoins (7,55) et en faisant l'hypothèse que ϵ fix = -1, nous pouvons calculer le pourcentage d'azote fixé dans chaque arbre nodulé :

$$\text{N fixé \%} = \frac{\delta \text{ inoc} - 7,55}{- 8,55}$$

Le pourcentage d'azote fixé est de $39,2 \pm 6,45$ % ce qui représente $0,85 \pm 0,14$ g N fixé arbre⁻¹ en 6,5 mois.

2.4. Expérience n°3

L'expérience n° 3 a été menée en 1983-84 dans le but de diminuer au maximum la variabilité observée, au niveau du potentiel fixateur d'azote des casuarinas, dans l'expérience n°1. Pour ce faire, nous sommes intervenus sur les paramètres suivants :

- l'arbre : l'expérience a été menée à partir de boutures d'un même arbre. Ceci revient à utiliser un clone.

- la nodulation : afin d'avoir une nodulation homogène, nous avons procédé à une inoculation massive, des

plants de Casuarina, par la souche de Frankia ORS021001.

- le dispositif expérimental : afin de supprimer les problèmes liés à la compétition entre les différents arbres, nous avons planté les Casuarina dans des cylindres séparés.

- le sol : nous avons utilisé le sol de Cambérène qui est un sol dunaire très pauvre (C = 0,012 % ; N = 0,001% pH = 5). Ce sol, ne contenant pas de Frankia, n'a pas été stérilisé.

2.4.1. Dispositif expérimental

2.4.1.1. Obtention des plants bouturés de Casuarina

Les explants prélevés sur un même arbre ont été traités au Rootone (mélange de phytohormones) et repiqués en sacs de 1 kg de sol de Bel Air stérile. Au bout de 15 jours, 90 % des boutures avaient formé des racines.

Une partie de ces boutures ont été inoculées massivement par Frankia (souche ORS021001) une fois par semaine à 3 reprises.

2.4.1.2. Les différents traitements

Les Casuarina âgés de 3,5 mois (22 mg N arbre⁻¹ en moyenne) ont été planté individuellement dans des cylindres de plastique (1 m de profondeur et 30 cm de diamètre) sans fond et remplis de sol de Cambérène non-stérile. Chaque cylindre a reçu en début d'expérience un apport de 4,25 g de K₂HPO₄.

Nous avons effectué 7 traitements et 6 répétitions par traitement :

- traitement 1 : casuarinas inoculés par Frankia ORS021001 sans apport d'azote.

- traitement 2 : casuarinas inoculés par Frankia ORS021001 avec un apport de 0,5 g N arbre⁻¹.

- traitement 3 : casuarinas non inoculés sans apport d'azote.

- traitements 4, 5, 6 et 7 : casuarinas non inoculés

avec apports d'azote respectivement de 0,5 ; 1 ; 1,5 ; et 3 g N arbre⁻¹.

Les arbres ont été arrosés quotidiennement tout au long de l'expérience et des apports d'oligo-éléments ont été effectués tous les 15 jours (0,25 l de solution Hewitt sans N par arbre).

Les arbres ont été coupés, à l'âge de 9 mois, après 5,5 mois de croissance dans les cylindre (Figure 16). Les arbres ont été séparés en différentes fractions (Cladodes, Petit bois, Gros bois, Racines, nodules) et réduits en poudre de 100 µm. La teneur en azote de chaque poudre a été déterminée par la méthode de Kjeldhal.

2.4.2. Résultats

Le tableau 27 rapporte l'effet de l'inoculation par Frankia (ORSO21001) sur la croissance de Casuarina equisetifolia. Si l'on compare les traitements (1) et (3), on constate que l'effet de l'inoculation par Frankia se traduit par une augmentation en hauteur de 96 %, en diamètre de 73 %, en poids sec total de 484 %, en pourcentage d'azote de 43 % et en azote total de 737 %.

En comparant les traitements (2) et (4), on trouve une augmentation en hauteur de 89 %, en diamètre de 67 %, en poids sec de 378 %, en pourcentage d'azote de 57 % et en azote total de 655 %.

Il est donc clair que l'inoculation par Frankia se traduit par une augmentation spectaculaire de la croissance des casuarinas.

Par contre, l'effet des différentes doses d'engrais azoté est nul. Ceci s'explique par le fait que les cylindres n'étant pas pourvus de fond, les arrosages quotidiens ont lessivé totalement l'engrais. Ce lessivage a été encore aggravé par les pluies qui ont eu lieu pendant le déroulement de l'expérience. Ce résultat conduit à penser que dans les conditions de cette expérience, qui sont très proches des conditions existantes dans une plantation de Casuarina,



FIGURE 16. Dispositif expérimental de l'expérience n°3. Casuarina equisetifolia âgés de 9 mois. A droite : inoculés par Frankia ORS021001; à gauche : témoins non-inoculés.

Tableau 27: Influence de l'inoculation par Frankia (souche ORSO21001) sur la croissance de Casuarina equisetifolia âgés de 9 mois (expérience n°3)

| Traitements | Hauteur (cm arbre ⁻¹) | Diamètre (mm arbre ⁻¹) | N (%) | Poids sec (g arbre ⁻¹) | N total (g arbre ⁻¹) | Nodules (g arbre ⁻¹) | A R A ⁽¹⁾ |
|----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| (1): <u>Frankia</u> | 182 a ±27 | 19 a ±3 | 1,37 a ±0,13 | 578 a ±82 | 7,95 a ±1,30 | 27 a ±5 | 276 a ±36 |
| (2): <u>Frankia</u> +0,5gN | 170 a ±40 | 20 a ±0,6 | 1,38 a ±0,19 | 547 a ±61 | 7,55 a ±0,90 | 26 a ±13 | 253 a ±68 |
| (3): 0 g N | 93 b ±19 | 11 b ±2 | 0,96 b ±0,2 | 99 b ±30 | 0,95 b ±0,50 | 0 | - |
| (4): 0,5 g N | 90 b ±12 | 12 b ±1,7 | 0,88 b ±0,08 | 114 b ±26 | 1,00 b ±0,23 | 0 | - |
| (5): 1 g N | 85 b ±13 | 12 b ±3 | 0,95 b ±0,19 | 99 b ±63 | 0,94 b ±0,52 | 0 | - |
| (6): 1,5 g N | 85 b ±16 | 10 b ±3 | 0,80 b ±0,17 | 100 b ±50 | 0,80 b ±0,32 | 0 | - |
| (7): 3 g N | 94 b ±23 | 11 b ±3 | 0,82 b ±0,17 | 109 b ±48 | 0,89 b ±0,41 | 0 | - |

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05; test de Duncan). (±): intervalle de confiance.

(1) Activité réductrice d'acétylène: exprimée en nmoles C₂H₄ mn⁻¹ g⁻¹ (de poids sec de nodules).

Tableau 28. Influence de l'inoculation par Frankia (souche ORSO21001) sur le poids sec de Casuarina equisetifolia âgés de 9 mois (expérience n°3)

| Traitements | Poids sec (g arbre ⁻¹) | | | | | |
|----------------------------|------------------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------|-------------|--------------|
| | Cladodes | Petit bois (diam.<4mm) | Gros bois (diam.>4mm) | Racines | Nodules | Total |
| (1): <u>Frankia</u> | 284 a ±33 | 99 a ±28 | 82 a ±22 | 86 a ±12 | 27 a ±5 | 578 a ±82 |
| (2): <u>Frankia</u> +0,5gN | 264 a ±35 | 94 a ±20 | 78 a ±16 | 85 a ±9 | 26 a ±13 | 547 a ±61 |
| (3): 0 g N | 48 b ±31 | 19 b ±14 | 11 b ±6 | 21 b ±9 | 0 | 99 b ±30 |
| (4): 0,5 g N | 66 b ±15 | 15 b ±2 | 12 b ±7 | 21 b ±6 | 0 | 114 b ±26 |
| (5): 1 g N | 57 b ±37 | 15 b ±10 | 9 b ±6 | 13 b ±10 | 0 | 99 b ±63 |
| (6): 1,5 g N | 55 b ±28 | 13 b ±6 | 11 b ±6 | 21 b ±11 | 0 | 100 b ±50 |
| (7): 3 g N | 61 b ±28 | 16 b ±10 | 9 b ±6 | 23 b ±9 | 0 | 109 b ±48 |

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05, test de Duncan).

(±) : intervalle de confiance.

il n'est pas possible d'évaluer la fixation de l'azote par la méthode de "l'équivalent engrais".

L'utilisation conjuguée d'un clone de Casuarina et d'une inoculation massive par Frankia (souche ORSO21001) a conduit à une grande homogénéité des résultats concernant les différentes fractions des arbres nodulés ; ceci tant au niveau des poids secs (tableau 28), des pourcentages d'azotes (tableau 29), qu'à celui de l'azote total des arbres (tableau 30).

En ce qui concerne le rapport entre les différentes fractions de la plante, on peut observer que le système racinaire représente à peu près 20 % du poids sec total de la plante que celle-ci soit nodulée ou non. Chez les casuarinas nodulés, les nodules représentent près de 5 % du poids total de la plante et 23 % du poids du système racinaire (tableau 31). Ces mêmes nodules représentent 6 % de l'azote total de la plante et 45 % de l'azote total du système racinaire (tableau 32).

2.4.2.1. Estimation de la fixation de l'azote par Casuarina equisetifolia

2.4.2.1.1. Estimation par la méthode "par différence"

En comparant les traitements (1) et (3) et les traitements (2) et (4) entre eux (tableau 27) on peut estimer la fixation de l'azote par Casuarina respectivement à $7 \pm 1,3$ g N fixé arbre⁻¹ et $6,55 \pm 0,91$ g N en 5,5 mois. Ceci représente 88 % de l'azote total des casuarinas nodulés.

2.4.2.1.2. Estimation par la méthode de réduction de l'acétylène

Si l'on fait les trois hypothèses suivantes : (1) le rapport $C_2H_4/N_2 = 3$, (2) la fixation d' N_2 , étant fonction de la photosynthèse, n'est efficace que 12 heures par jour, (3) la cinétique de la fixation de l'azote est linéaire (ceci revient à dire que la vitesse moyenne de la fixation

Tableau 29. Influence de l'inoculation par Frankia (souche ORS21001) sur la teneur en azote (N%) de Casuarina equisetifolia âgés de 9 mois (expérience n°3)

| | Azote (%) | | | | | |
|----------------------------|-----------------|----------------------------|---------------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| | Cladodes | Petit bois (diam. <4mm) | Gros bois (diam. >4mm) | Racines | Nodules | Total |
| (1): <u>Frankia</u> | 2,05 a ±0,15 | 0,69 a ±0,05 | 0,50 a ±0,03 | 0,63 a ±0,04 | 1,71 a ±0,17 | 1,37a ±0,13 |
| (2): <u>Frankia</u> +0,5gN | 2,10 a ±0,24 | 0,67 a ±0,04 | 0,51 a ±0,03 | 0,66 a ±0,03 | 1,86 a ±0,28 | 1,38a ±0,19 |
| (3): 0 g N | 1,39 b ±0,26 | 0,55 a ±0,07 | 0,41 a ±0,06 | 0,53 a ±0,04 | 0 | 0,96b ±0,21 |
| (4): 0,5 g N | 1,26 b ±0,10 | 0,57 a ±0,05 | 0,34 a ±0,05 | 0,46 a ±0,03 | 0 | 0,88b ±0,08 |
| (5): 1 g N | 1,41 b ±0,23 | 0,55 a ±0,09 | 0,39 a ±0,03 | 0,49 a ±0,06 | 0 | 0,95b ±0,18 |
| (6): 1,5 g N | 1,20 b ±0,20 | 0,54 a ±0,04 | 0,37 a ±0,04 | 0,50 a ±0,08 | 0 | 0,80b ±0,17 |
| (7): 3 g N | 1,17 b ±0,21 | 0,55 a ±0,08 | 0,39 a ±0,06 | 0,54 a ±0,06 | 0 | 0,82b ±0,18 |

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes. (P = 0,05, test de Duncan).

(±): intervalle de confiance.

Tableau 30. Influence de l'inoculation par Frankia (souche ORS021001) sur la teneur en azote (N g arbre⁻¹) de Casuarina equisetifolia âgés de 9 mois (expérience n°3)

| Traitements | Azote total (g arbre ⁻¹) | | | | | |
|----------------------------|--------------------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Cladodes | Petit bois (diam.<4mm) | Gros bois (diam.>4mm) | Racines | Nodules | Total |
| (1): <u>Frankia</u> | 5,9 a ±1 | 0,68 a ±0,20 | 0,41 a ±0,10 | 0,54 a ±0,10 | 0,46 a ±0,10 | 7,95 a ±1,30 |
| (2): <u>Frankia</u> +0,5gN | 5,5 a ±0,7 | 0,62 a ±0,10 | 0,39 a ±0,10 | 0,56 a ±0,10 | 0,45 a ±0,20 | 7,55 a ±0,90 |
| (3): 0 g N | 0,70 b ±0,43 | 0,11 b ±0,10 | 0,05 b ±0,03 | 0,11 b ±0,05 | 0 | 0,95 b ±0,50 |
| (4): 0,5 g N | 0,82 b ±0,19 | 0,08 b ±0,01 | 0,04 b ±0,02 | 0,10 b ±0,03 | 0 | 1,00 b ±0,23 |
| (5): 1 g N | 0,78 b ±0,49 | 0,08 b ±0,05 | 0,03 b ±0,02 | 0,09 b ±0,05 | 0 | 0,94 b ±0,52 |
| (6): 1,5 g N | 0,63 b ±0,28 | 0,07 b ±0,03 | 0,04 b ±0,02 | 0,10 b ±0,05 | 0 | 0,80 b ±0,32 |
| (7): 3 g N. | 0,72 b ±0,37 | 0,08 b ±0,05 | 0,03 b ±0,01 | 0,12 b ±0,04 | 0 | 0,89 b ±0,41 |

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05, test de Duncan) . (±): intervalle de confiance.

Tableau 31. Effet de l'inoculation par Frankia (souche ORS021001) sur le rapport (%) en poids sec des différentes parties de Casuarina equisetifolia âgés de 9 mois (expérience n°3).

| Traitements | Rapport entre les différentes parties de la plante (%) ⁽¹⁾ | | | | |
|----------------------------|---|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| | $\left(\frac{R}{C+PB+GB}\right)$ | $\left(\frac{R}{Total}\right)$ | $\left(\frac{Nod}{Total}\right)$ | $\left(\frac{R + Nod}{Total}\right)$ | $\left(\frac{Nod}{R + Nod}\right)$ |
| (1): <u>Frankia</u> | 18,5 | 14,9 | 4,7 | 19,5 | 23,9 |
| (2): <u>Frankia</u> +0,5gN | 19,5 | 15,5 | 4,8 | 20,3 | 23,4 |
| Témoins ⁽²⁾ | 25 | 20 | - | - | - |

(1) C = Cladodes; PB = Petit bois; GB = Gros bois; R = Racines; Nod = Nodules.

(2) Moyenne des témoins ayant reçu un apport d'azote de (en g arbre⁻¹): 0; 0,5; 1; 1,5 et 3.

Tableau 32. Effet de l'inoculation par Frankia (souche ORS021001) sur le rapport (%) en azote des différentes parties de Casuarina equisetifolia âgés de 9 mois (expérience n°3).

| Traitements | Rapport entre les différentes parties de la plante (%) ⁽¹⁾ | | | | |
|----------------------------|---|---------------------------------------|--|--|--|
| | $\left(\frac{R}{C+PB+GB}\right)$ | $\left(\frac{R}{\text{total}}\right)$ | $\left(\frac{\text{Nod}}{\text{total}}\right)$ | $\left(\frac{R + \text{Nod}}{\text{total}}\right)$ | $\left(\frac{\text{Nod}}{R + \text{Nod}}\right)$ |
| (1): <u>Frankia</u> | 7,7 | 6,8 | 5,8 | 12,6 | 46 |
| (2): <u>Frankia</u> +0,5gN | 8,6 | 7,4 | 6,0 | 13,4 | 44,5 |
| Témoins ⁽²⁾ | 12,3 | 11,5 | - | - | - |

(1) C = Cladodes; PB = Petit bois; GB = Gros bois; R = Racines;
Nod = Nodules.

(2) Moyenne des témoins ayant reçu un apport d'azote de (en g arbre⁻¹):
0; 0,5; 1; 1,5; 3.

de l'azote est égale à la moitié de la vitesse instantannée mesurée par la méthode à l'acétylène), on peut écrire :

$$\begin{aligned} 1 \text{ nmoles } C_2H_4 \cdot h^{-1} &= \frac{1}{3} \times 12 \times \frac{1}{2} \times 28 \text{ ng } N_2 \text{ jour}^{-1} = \\ &= 56 \text{ ng } N_2 \text{ jour}^{-1} \end{aligned}$$

Les activités réductrices d'acétylène des traitements (1) et (2) (tableau 27) correspondent respectivement à des fixation d'azote de $4,1 \pm 0,5$ g N_2 fixé par arbre et de $3,6 \pm 0,9$ g N_2 fixé par arbre pendant les 165 jours (5,5 mois) de durée de l'expérience N°3.

3. Exemple d'un facteur influençant la nodulation et la croissance de *Casuarina equisetifolia* dans un sol déficient en phosphore : les endomycorhizes (Article 9)

Dans les trois expériences décrites précédemment, nous avons intentionnellement réduit au maximum l'effet des facteurs limitants la croissance et la fixation d'azote de *Casuarina equisetifolia*. Dans les plantations de casuarinas, des conditions de croissance aussi favorables sont rarement réunies et l'effet des différents facteurs limitants, tels que le pH du sol (Coyne, 1973) ou la déficience en phosphore, peut se traduire par une diminution drastique de la croissance des arbres.

Les sols tropicaux étant souvent déficients en phosphore, nous avons porté notre attention sur l'effet de l'infection indomycorhizienne sur la nodulation et la croissance de *C. equisetifolia*.

En effet, les Casuarinacées, comme beaucoup d'autres espèces actinorhiziennes (Rose et Trappe, 1980), sont susceptibles de s'associer symbiotiquement avec les endomycorhizes. En particulier, il a été montré que *Casuarina equisetifolia* et *Casuarina cunninghamiana* pouvaient être infectés par des champignons endomycorhiziens à arbuscules et à vésicules (V.A.M.) tels que *Gigaspora* sp et *Glomus* sp (Rose, 1980). Huguenin (1969) a rapporté l'existence de "nodules mycorhiziens" chez l'espèce *Gymnostoma deplancheana* de nouvelle Calédonie.

D'autres part, les Casuarinacées peuvent s'associer à des ectomycorhizes comme l'a montré Bamber, et al. (1980), en ce qui concerne Allocauarina distyla et Pisolithus tinctorius.

Dans l'expérience rapportée dans l'article 9, nous avons étudié l'effet de l'endomycorhization de C. equisetifolia par Glomus mosseae.

Pour ce faire, des plants de Casuarina equisetifolia ont été cultivés sur un sol stérile déficient en azote et contenant seulement 10 ppm de phosphore assimilable. Ces plants ont été inoculés soit par le broyat de nodules de C. equisetifolia (apport de Frankia), soit par le champignon endomycorhizien Glomus mosseae, soit simultanément par les deux endophytes.

Après 6 mois, l'effet de l'inoculation par le broyat de nodule seul se traduit, chez les plants inoculés, par une augmentation de 57 % pour le poids sec et de 130 % pour la teneur en azote totale par rapport aux plants témoins. En ce qui concerne l'effet de la double inoculation "broyat de nodules - Glomus mosseae", les accroissements en poids sec et en teneur d'azote total sont respectivement de 186 % et de 337 %. L'apport complémentaire de 90 ppm de phosphore combiné à l'inoculation par le broyat de nodules seul donne pratiquement les mêmes résultats, ce qui suggère que l'inoculation par Glomus mosseae équivaut à un apport de phosphore. Enfin, la double inoculation a pour effet de doubler le poids sec de nodules par plant.

Ces résultats montrent l'existence d'une synergie certaine, entre l'action des deux endophytes (Frankia et Glomus mosseae) qui se traduit par une fixation d'azote plus élevée et une meilleure exploitation du phosphore du sol conséquence de la mycorhization. Tout ceci concourt à faire de C. equisetifolia une espèce végétale capable de prospérer sur des sols à la fois déficients en azote et en phosphore, sols qui sont très répandus sous les tropiques.

Tableau 33. Comparaison des différentes méthodes d'estimation de la fixation de l'azote.

| Expérience | Durée de l'expérience (1) | Méthodes de mesure | N ₂ fixé (g N ₂ arbre ⁻¹) | Poids sec de nodules (g arbre ⁻¹) | Fixation spécifique de N ₂ (mg N ₂ mois ⁻¹ g nodule ⁻¹) |
|------------------------|---------------------------|-------------------------------------|---|---|--|
| N°1 (sol de Bel Air) | 4,5 - 11 mois | Valeur 'A' | 2,31 | | 20,4 (100) (2) |
| | | Dilution isotopique ¹⁵ N | 3,27 | 17,4 | 28,9 (142) |
| | | Différence | 3,09 | | <u>27,3</u> (134) |
| | | Equivalent engrais | 6,55 | | 57,9 (283) |
| N°2 (sol de Bel Air) | 3-9,5 mois | Abondance ¹⁵ N naturelle | 0,85 | 3,85 | 34 |
| | | Différence | 0,81 | | <u>32,4</u> |
| | | Différence | 7 | 27 | <u>47,1</u> |
| N°3 (sol de Cambérène) | 3,5 - 9 mois | Différence | 6,55 | 26 | <u>45,8</u> |
| | | Réduction de l'acétylène | 4,10 | 27 | 28 |
| | | | 3,60 | 26 | 25,3 |
| | | | | | |

(1) Le 1er chiffre indique l'âge des arbres lors de leur transplantation au champ. Le 2ème chiffre indique l'âge des arbres au moment de l'arrêt de l'expérience.

(2) Augmentation par rapport à l'estimation de la fixation de N₂ par la méthode de la valeur 'A' considérée comme base 100.

. Remarque: les valeurs soulignées représentent les fixation spécifiques de N₂ estimées par la méthode "par différence" dans les trois expériences.

4. Conclusions et discussion

Les résultats présentés dans ce chapitre nous conduisent à discuter les points suivants :

4.1. Comparaison entre les différentes méthodes d'estimation de la fixation de l'azote

Les fixations d'azote spécifiques, rapportées dans le tableau 33, sont du même ordre de grandeur quelque soit la méthode d'estimation employée. Ceci montre que dans les conditions de croissance contrôlée que nous avons utilisées, les méthodes d'estimation de la fixation de N_2 sont fiables et reproductibles. Si l'on considère la valeur "A" comme étant la méthode de référence, la surestimation de la fixation de l'azote est de 42 % pour la méthode de la "dilution isotopique ^{15}N ", 34 % pour la méthode par "différence" et de 40 % pour la méthode de "l'abondance naturelle ^{15}N ".

En ce qui concerne la méthode de l'équivalent d'engrais, l'expérience N° 3 a montré qu'elle n'était pas applicable dans les conditions d'une plantation au champ (tableau 27).

Quant à la méthode de la réduction de l'acétylène, elle permet une estimation de la fixation de l'azote très proche de celle obtenue par la valeur "A". Ceci est assez surprenant étant donné qu'il s'agit d'une estimation ne reposant que sur une mesure ponctuelle. L'explication la plus probable, concernant la précision de cette méthode, consiste à estimer que les hypothèses que nous avons formulées pour calculer la correspondance " $C_2H_4 - N_2$ " sont justes. La connaissance des rythmes de la fixation de N_2 (en fonction du moment de la journée et de la saison) et de la cinétique de la fixation de N_2 , pendant la croissance de Casuarina, permettrait d'utiliser cette méthode avec plus de fiabilité.

L'utilisation de la méthode de "l'abondance naturelle en ^{15}N " pourrait être utilisée pour estimer la fixation d'azote dans des peuplements naturels. Cela permettrait de se faire une idée de l'impact des conditions de croissance

(sol, climat) sur le potentiel fixateur d'azote d'une espèce donnée.

Il est clair que les méthodes isotopiques ^{15}N ("valeur A" et dilution isotopique) sont les méthodes d'estimation de la fixation de l'azote les plus fines car elles permettent de discriminer les trois sources d'azote disponibles pour la plante : azote du sol, azote de l'engrais, azote moléculaire. (voir figure 1, article 8). Cependant, ces méthodes ont deux inconvénients qui sont leur coût et l'impossibilité d'utilisation sur de grandes surfaces. Une alternative consisterait à faire une étude cinétique de la fixation de l'azote par Casuarina, sur une période de 2 à 3 ans en utilisant en parallèle la méthode de la "valeur A" et la méthode "par différence", ce qui permettrait l'étalonnage de cette dernière méthode dont l'utilisation sur de grandes surfaces est envisageable.

Le résultat qui nous paraît être le plus important au point de vue appliquée consiste dans le fait que les estimations de la fixation spécifique d' N_2 , obtenues par les méthodes isotopiques ^{15}N (dilution isotopique, valeur A) et par la méthode "par différence", sont comparables. Il s'agit là d'un résultat très important sur le plan appliqué car il montre qu'il est possible d'utiliser la méthode "par différence" lors d'expériences in situ. Le seul problème pratique consiste en l'obtention de témoins non fixateurs d' N_2 . Deux solutions sont envisageables :

- obtention de plantes non nodulantes par sélection végétale ou par mutagenèse ;

- obtention de souches de Frankia infectives mais non effectives en isolant directement de tels mutants à partir de nodules ou en modifiant génétiquement des souches de Frankia cultivées in vitro.

4.2. Quantité d'azote fixé par Casuarina equisetifolia cultivé en microparcelles expérimentales

4.2.1. Fixation spécifique d'azote

Si l'on compare les résultats obtenus par la méthode

"par différence" dans les trois expériences effectuées (valeurs soulignées, tableau 33), on peut observer que les fixations spécifiques de N_2 des nodules ($mg N_2$ fixé mois⁻¹ g nodule⁻¹) sont de 27,3 - 32,4 sur le sol de Bel Air et de 45,8 - 47,1 sur le sol de Cambérène.

La différence, observée dans les fixations spécifiques de N_2 des nodules des expériences N° 1 et N° 2 et celles de l'expérience n° 3, est imputable à 2 facteurs : (1) les sols utilisés (sol de Bel Air pour expérience n° 1 et n° 2 ; sol de Cambérène pour expérience n° 3), (2) utilisation d'un clone dans l'expérience n° 3. L'impact des facteurs sol et plante est un point qu'il faudra éclaircir lors d'expériences ultérieures.

4.2.2. Fixation d' N_2 par arbre

Le tableau 33 rapporte les estimations de la quantité d'azote fixé ($g N_2$ arbre⁻¹) par C. equisetifolia lors de 3 expériences conduites pendant des laps de temps similaires (6,5 mois pour les expériences n° 1 et n° 2 et 5,5 mois pour l'expérience n° 3). On peut observer que les estimations de la fixation de l'azote, obtenues par les six méthodes différentes employées, varient de 0,81 à 7 $g N_2$ arbre⁻¹.

La variabilité remontrée au niveau de la quantité d'azote fixé par arbre est probablement liée aux facteurs suivants :

- a) stade de développement de l'arbre : ceci a été clairement montré dans l'expérience n° 1 (fig. 15) où ce sont les arbres ayant les plus grandes tailles (donc des activités photosynthétiques élevées) qui ont les pourcentages d'azote dérivés de la fixation de l'azote les plus forts;

- b) poids sec de nodules par arbre : si l'on compare les résultats des expériences n° 1 et n° 2, il est clair que la différence dans l'estimation de la fixation de l'azote (tableau 33) est due à la faible nodulation observée dans l'expérience n° 2. Cependant, les nodules ont des fixations spécifiques de N_2 similaires (27,33 et 32,4 $mg N_2$ mois⁻¹ g de nodule⁻¹).

Il est probable qu'il existe un optimum dans le rapport entre la nodulation et la fixation de l'azote (c'est à dire, en fait, la croissance de la plante cultivée sur un sol pauvre en azote). A notre avis, cet optimum a été atteint lors de l'expérience n° 3 dans laquelle nous avons utilisé à la fois un sol très pauvre (0,001 % N), un clone (bouturage d'un même individu) et une inoculation massive et répétée par Frankia. Tout ceci a conduit à une nodulation très homogène des casuarinas. Dans cette expérience, les nodules représentaient presque 5 % du poids sec de la plante et 23 % du poids sec du système racinaire (tableau 31). Ces mêmes nodules représentaient 6 % de l'azote total de la plante et 45 % de l'azote du système racinaire (tableau 32).

Si l'on étudie l'arbre qui a montré la meilleure croissance dans l'expérience n° 1 (arbre n° 13, tableau 25), on peut observer que les 69,5 g de nodules (d'une teneur en azote de 1,8 %) représentaient 5,4 % du poids sec de la plante et 10 % de l'azote de la plante.

On peut donc penser que chez Casuarina equisetifolia, l'optimum de nodulation se trouve autour de 5 % du poids sec total de la plante. Dans le cas du genre Alnus, les nodules représentent 1 à 3 % du poids sec de la plante selon son âge (Akkermans, 1971 ; Akkermans et Van Dijk, 1975).

Cet ensemble de résultats nous conduisent à penser qu'il faudra, dans l'avenir, améliorer les techniques d'inoculation par Frankia, ce qui suppose la mise au point de techniques permettant la culture massive (fermenteur) de ce microorganisme.

- c) le type de sol : les fixations d'azote estimées sur le sol de Cambérène sont plus élevées que celle obtenues sur sol de Bel Air. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le sol de Cambérène est un sol très pauvre ce qui entraînerait une diminution de l'incidence des facteurs limitants la fixation d' N_2 .

4.2.3. Extrapolation sur un hectare et un an

Si l'on considère la fixation d'azote estimée par la

méthode isotopique de la "valeur A" comme étant la valeur référence (2,31 g N₂ fixé par arbre en 6,5 mois), on en déduit que la méthode "par différence" surestime de 34 % la fixation réelle de N₂ (tableau 33). Si on applique ce terme correcteur à l'expérience n° 3, on obtient une fixation d'azote égale à :

$$\frac{6,77 \times 100}{134} = 5,05 \text{ g N}_2 \text{ fixé par arbre en 5,5 mois.}$$

En extrapolant ces valeurs sur un an et 1 hectare de plantation (5 000 arbres), on obtient une fixation potentielle d'azote située entre 21 et 55 kg N₂ fixé an⁻¹ hectare⁻¹

Il faut noter que ces valeurs représentent une estimation de la potentialité fixatrice de N₂ moyenne de C. equisetifolia. En fait, la potentialité fixatrice de N₂ optimale doit être beaucoup plus élevée comme le montre les résultats concernant l'arbre n° 13 de l'expérience n° 1 (tableau 25). Cet arbre a fixé 10,57 g N₂ en 6,5 mois ce qui représente une fixation de N₂ potentielle de 98 kg N₂ an⁻¹ hectare⁻¹. On voit ici le rôle majeur que pourrait jouer la sélection végétale dans l'optimisation de l'efficacité des systèmes fixateurs symbiotiques.

Il est probable que lors de l'utilisation des arbres fixateurs d'azote pour le reboisement de grandes surfaces de sols dégradés, le potentiel fixateur d'azote de ces espèces ne s'exprime pas dans sa totalité à cause de l'interaction de facteurs limitants tels que les pathogènes, la déficience en phosphore, l'aridité, la salinité, et l'absence de l'endophyte spécifique.

Dans le cas de Casuarina equisetifolia, l'effet des facteurs limitants peut être diminué de façon significative en suivant les règles culturales suivantes :

- stérilisation du sol des pépinières, ce qui diminue significativement le pourcentage de mortalité lors de la transplantation au champ (Cornet, communication personnelle).

- double inoculation "Frankia-endomycorhize" des pépinières ; cette pratique conduisant à un effet synergique

des deux endophytes (voir article 9). L'endomycorhization de Casuarina lui permet à la fois de mieux explorer le phosphore du sol et de résister mieux à la sécheresse (V. Gianinazzi-Pearson et H.G. Diem, 1982) ;

En ce qui concerne la salinité, il faudra faire appel aux méthodes de culture de tissus in vitro afin d'obtenir des lignées génétiquement plus tolérantes au sel.

CONCLUSION GENERALE

Tableau 34. Comparaison entre les symbioses Légumineuses-
Rhizobium et les symbioses actinorhiziennes

| | <u>Légumineuses</u> | <u>Non-Légumineuses</u> |
|--|--|---|
| <u>Endophyte</u> | <u>Rhizobium</u> | <u>Frankia</u> |
| <u>Plante-hôte</u> | 2 familles - légumineuses - Ulmacée: <u>Parasponia</u> | 8 familles 170 espèces |
| <u>Infection</u> | | |
| - site d'infection | - Poils absorbants - Inter-cellulaire - Site spécialisé (légumineuses à nodules caulinaires) | - Poils absorbants - Inter-cellulaire (pas à exclure) |
| - Etape de la nodulogénèse | - une seule étape | - Deux étapes: (1) pré-nodule; (2) primordium racinaires et lobes |
| - Localisation des cellules | - entre les faisceaux vasculaires | - A l'extérieur des faisceaux vasculaires |
| <u>Fonctionnement de la symbiose</u> | | |
| - Hémoglobine | - Présente chez les légumineuses et chez <u>Parasponia</u> | - Présente chez certaines espèces |
| - Protection contre l'oxygène | - Enzymatique: Hydrogénase et Super-oxyde dismutase | - Enzymatique (Hydrogénase) et physique (vésicules). |
| - Facteurs limitants | - Déficience en phosphore; excès d'azote combiné | - Déficience en phosphore; excès d'azote combiné |
| <u>Association avec les mycorhizes</u> | - Endomycorhizes (VAM) | - Endomycorhizes (VAM) - Ectomycorhizes |

1. Introduction

Contrairement aux forêts Européennes et Nord-Américaines qui ont commencé à être reconstituées il y a plus d'un siècle, les forêts tropicales et équatoriales disparaissent à un rythme rapide (7,5 à 20 millions d'hectares an⁻¹) alors que, dans beaucoup de pays en développement, le bois constitue la source d'énergie la plus importante (NAS, 1980).

Cette déforestation rapide liée à la surexploitation des sols agricoles conduisent à une crise énergétique et alimentaire d'une gravité sans précédent. L'utilisation des plantes fixatrices d'azote à grande échelle constitue un moyen d'enrayer cette crise.

Au même titre que les espèces appartenant à la famille des légumineuses, les plantes actinorhiziennes sont aptes à jouer un rôle prépondérant dans la production de bois et la régénération des sols dégradés.

Bien que connues depuis fort longtemps (Woronin, 1866), les symbioses Frankia non-légumineuses ont été pendant longtemps peu étudiées du fait de l'impossibilité à isoler l'endophyte Frankia.

Il faudra attendre les années cinquante pour que les plantes actinorhiziennes voient un regain d'intérêt en leur faveur étant donné leur potentiel forestier.

Ce n'est qu'en 1978 que Callaham et al. isolèrent pour la première fois l'endophyte d'une plante actinorhizienne (Comptonia peregrina). Ce succès a été le point de départ de l'isolement de Frankia de diverses espèces dont Alnus (Baker et al., 1978) et Casuarina (Gauthier et al., 1981a ; Diem et al., 1982a, 1982b, et 1983).

La possibilité d'étudier le Frankia in vitro a donné un essor considérable à l'étude des symbioses actinorhiziennes et a permis de comparer ces symbioses à la symbiose Rhizobium-légumineuse (tableau 34). En fait, nous assistons depuis quelques années à la naissance d'une nouvelle branche de la microbiologie : la "Frankialogie".

2. Notre contribution au développement de la "Frankialogie"

Notre contribution au développement de ce qui nous pourrions appeler la "Frankialogie" a concerné à la fois les recherches fondamentales et les recherches appliquées.

2.1. Recherches fondamentales

- Nous avons isolé l'endophyte de Casuarina equisetifolia qui est sans nul doute l'espèce actinorhizienne ayant la plus grande importance économique en régions tropicales et sub-tropicales (articles 1 et 2 ; chapitre I).

- Nous avons montré la possibilité d'isoler de nodules de Casuarina, des souches de Frankia appartenant à deux types morphologiques bien distincts, ce qui suggère fortement l'existence d'une population mixte de Frankia au sein des nodules de Casuarina (articles 1 et 2 ; chapitre I).

- Nous avons démontré l'existence de barrière d'incompatibilité d'hôtes au sein de la famille des Casuarinacées (chapitre II).

- Nous avons montré que certaines souches de Frankia isolées de Casuarina, et non-infectives vis-à-vis de leur plante d'origine, pouvaient noduler certaines Rhamnales. Ceci nous a conduit à proposer l'existence d'un continuum de souches reliant les Frankia typiques des Rhamnales à certains Frankia des Casuarinacées (articles 3 et 4 ; chapitre II). Cette situation paradoxale, qui n'a pas d'équivalent dans la symbiose Rhizobium-légumineuses, vient d'être récemment confirmée par Zang Zhongze et al. (1984) chez Casuarina cunninghamiana.

- Nous avons montré que l'endophyte de Casuarina pouvait avoir une existence extra-nodulaire (article 5), ce qui renforce les probabilités concernant une vie saprophytique des Frankia dans la rhizosphère et le sol.

- Nous avons montré que les Frankia de Casuarina et de certaines Rhamnales, n'avaient pas d'exigences nutritionnelles particulières lors de leur culture in vitro (chapitre III).

- Nous avons démontré, en même temps que Tjepkema et

ses collaborateurs, que certaines souches de Frankia pouvaient réduire l'acétylène in vitro et croître en utilisant l'azote moléculaire comme source d'azote (article 6 ; chapitre III). Ce qui a ajouté les actinomycètes à la liste, déjà longue, des procaryotes fixateurs d'azote.

- Nous avons caractérisé dans les extraits bruts de Frankia cultivés in vitro une activité Glutamine synthétase (GS) et montré que l'activité de la GS n'était pas régulée par un système d'adénylation chez Frankia (article 7 ; chapitre III).

- Nous avons montré que chez les Frankia de Casuarina, la production des vésicules et leur capacité à réduire l'acétylène étaient liés à la nature du composé azoté dont disposait le Frankia pour sa croissance. D'autre part, le fait que la méthionine sulfoximine (MSX) permette la production de vésicules et leur activité nitrogénasique en présence de $\text{NH}_4 \text{Cl}$ (1 g l^{-1}) chez la souche ORS020602 (syn. D11) suggère une possible implication de certains enzymes de l'assimilation de l'azote (GS, GOGAT) dans la régulation de la formation et de l'activité nitrogénasique des vésicules chez Frankia (article 7 ; chapitre III).

2.2. Recherches appliquées

- Nous avons montré que la double inoculation Frankia-endomycorhize (Glomus mosseae) permet à Casuarina equisetifolia de croître sur des sols à la fois déficient en azote et en phosphore (article 9 ; chapitre IV).

- nous avons effectué la première estimation concernant les potentialités fixatrices d'azote de Casuarina inoculé par une souche pure de Frankia. Trois expériences utilisant six méthodes d'estimation de la fixation de l'azote (dont les méthodes isotopiques ^{15}N) nous permettent de penser qu'une plantation de 5 000 casuarinas par hectare fixe entre 21 et 55 $\text{kg N}_2 \text{ hectare}^{-1} \text{ an}^{-1}$ dans la première année suivant la transplantation au champ (article 8 ; chapitre IV).

3. Les connaissances actuelles concernant les symbioses actinorhiziennes

3.1. Recherches sur les Frankia cultivés in vitro

3.1.1. Isolement des endophytes

Après avoir été considérés comme des endophytes "obligatoires" (Becking, 1970) pendant de nombreuses années, il est apparu que les Frankia pouvaient être isolés des nodules de leurs plantes hôtes et cultivés in vitro. A la suite de Callaham et al. (1978), de nombreux auteurs ont isolé et cultivé les Frankia provenant d'une grande variété d'espèces actinorhiziennes. Actuellement, plus d'une centaine de souches de Frankia sont couramment cultivées et étudiées in vitro dans les différents laboratoires concernés par ce sujet (Torrey et Tjepkema, 1983). En particulier, nous disposons désormais des endophytes de deux genres d'une grande importance économique, en milieu tempéré et tropical respectivement, à savoir : Alnus spp (Quispel et Tak, 1978 ; Baker et al., 1979 ; Lalonde et al., 1981 ; Benson, 1982) et Casuarina spp (Gauthier et al., 1981a ; Diem et al., 1982a, 1982b 1983 ; Zhang Zhongze et al., 1984).

Une nette tendance à la simplification des méthodes et des milieux d'isolement se dessine depuis quelques temps. En ce qui concerne les méthodes d'isolement, la stérilisation par le tétrioxide d'Osmium (Lalonde et al., 1981) ou le passage de broyats de nodules sur filtre de 20 μm et 50 μm (Benson, 1982) semblent être des méthodes efficaces et simples d'emploi. D'autre part, il a été montré qu'il était possible d'utiliser, pour l'isolement des Frankia, des milieux simples à base de succinate et de casamino-acid (Benson, 1982), des milieux pour fixateurs d'azote (Gauthier et al., 1981b, 1983) et même de l'eau gélosée (Diem et Domergues, 1983).

Malgré ces récentes améliorations, l'isolement des Frankia demeure une entreprise fastidieuse et délicate pour maintes raisons dont les plus importantes nous semblent être :

- la faible vitesse de croissance des Frankia in vitro ;
- la faible proportion d'unités capables de conduire à la formation des colonies de Frankia (UFF) présentés dans les nodules. Cette notion d'UFF nous paraît tout à fait fondamentale. Il semble en effet, que le nombre des UFF soit très variable en fonction des espèces actinorhiziennes, de l'état physiologique du nodule et de son âge ;
- l'existence de multiples infections, dans un nodule donné (Lechevalier, 1983 ; Gauthier et al., 1984a), qui peut-être responsable de l'obtention de co-cultures de Frankia.

3.1.2. Propriétés nutritionnelles

Les différentes études menées aux sujets des besoins nutritionnels des Frankia in vitro, au cours de ces dernières années, nous conduisent à formuler les constatations suivantes :

- les Frankia, cultivés in vitro peuvent assimiler une gamme assez étendue de composés carbonés tels que des acides gras (Tween, propionate), des carbohydrates (glucose, arabinose, amidon), des acides organiques (succinate, fumarate, malate) et certains alcools (mannitol, glycérol) (Blom, 1982 ; Shipton et Burggraaf, 1982 ; Gauthier et al., 1983 ; Lechevalier et al., 1983 ; Tisa et al., 1983).
- les Frankia ne présentent pas de besoins nutritionnels spécifiques pour leur culture in vitro. En particulier, aucune exigence nette en besoin en vitamines n'a pu être mise en évidence (Shipton et Burggraaf, 1982 ; Gauthier et al., 1983).
- l'utilisation des divers substrats carbonés est assez variable d'une souche à l'autre et ceci même parmi les Frankia isolés d'une même plante-hôte (Faure-Raynaud et Moiroud, 1983 ; Lechevalier et al., 1983).
- les Frankia utilisent in vitro de nombreuses sources d'azote telles que le $\text{NH}_4 \text{Cl}$ (Blom, 1982 ; Akkermans, 1983) certains acides aminés comme le glutamate et l'aspartate (Blom 1982 ; Akkermans et al., 1983) et l'azote moléculaire (Tjepkema et al., 1981 ; Gauthier et al., 1983 ; Tisa et al., 1983).

3.1.3. Taxonomie des Frankia

Lechevalier et al., (1982) ont montré que les Frankia étudiés possèdent tous une composition de paroi cellulaire de type III (type le plus commun chez les actinomycètes) caractérisé par la présence d'acide meso-diaminopimélique, d'acide glutamique, d'alanine, d'acide muramique et de glucosamine comme composants principaux du peptidoglycane (Lechevalier et Lechevalier, 1979).

Sur la base de la composition en sucre des extraits cellulaires, Lechevalier et Lechevalier (1979) ont séparé les Frankia en différents types : (1) type D qui possède du xylose et de l'arabinose, (2) type B qui est caractérisé par une prédominance du madurose, (3) type indéterminé avec prédominance de glucose.

Mort et al (1983) ont montré que toutes les souches de Frankia contiennent du 2-O-méthyl-D-mannose. D'après ces auteurs ce sucre serait un composant spécifique au Frankia et pourrait être utilisé comme critère d'appartenance au genre Frankia lors de l'étude de souches non identifiées.

D'autre part, Baker et al (1981) ont proposé de diviser les Frankia en deux groupes sérologiques.

Enfin, Lechevalier et al (1983) ont proposé de classer les différents isolats de Frankia, actuellement disponibles, en 2 groupes A et B sur la base de leurs propriétés in vitro.

- Groupe A : ce groupe comprend les Frankia qui peuvent utiliser des hydrates de carbone à une concentration de 0,5 %. Ces souches sont généralement plus aérobies que celles du groupe B, produisent des protéases et des pigments, et ont des compositions en sucre, des parois cellulaires, variées ce qui fait qu'il est impossible de les classer dans un séro-groupe précis (Baker et al., 1981).

Les souches isolées d'Elaeagnus, d'Hippophaë, de Ceanothus et de Casuarina feraient parties de ce groupe. Ceci pourrait expliquer le peu de différence observées dans les propriétés nutritionnelles des souches de Frankia

isolées et étudiées dans cette thèse.

- Groupe B : les Frankia de ce groupe ne peuvent pas utiliser les hydrates de carbone à la concentration de 0,5 %, sont microaérophiles, non pigmentés et ne produisent pas de Protéases. La composition de leur paroi cellulaire en sucre est très homogène ce qui permet de les classer dans un séro-groupe bien précis. Ce groupe B comprend les souches de Frankia isolées de Comptonia, Myrica et Alnus.

Lechevalier et al (1983), ont émis l'hypothèse que les souches du groupe B, contrairement à celles du groupe A, n'auraient pas de système de transport actif des carbohydrates et ne pourraient absorber ceux-ci qu'à des concentrations élevées.

Cependant, ce type de classification a ses limites car des souches de Frankia isolées d'Alnus incana spp, Air I1 et Air I2 (Lechevalier et al. 1983), bien qu'ayant la même origine et appartenant au même séro-groupe ont été classées respectivement dans le groupe A et B.

3.1.4. Pléomorphisme des Frankia

Le Frankia est un micro-organisme très pléomorphe présentant plusieurs types de structures : hyphes plus ou moins larges et ramifiées, sporanges de diverses formes, spores polyédriques et vésicules. De plus les Frankia présentent des pigmentations très variables.

3.1.4.1. Régulation de la sporulation

Plusieurs paramètres peuvent influencer la formation des sporanges et des spores chez les Frankia cultivés in vitro, à savoir :

- la température : d'après Tisa et al (1983), la souche Cp11 (isolée de Comptonia peregrina) ne sporule pas au dessus de 33°C ;

- la source d'azote : d'après Simonet (1983), la cystéine aurait pour effet de retarder la sporulation chez les Frankia isolés d'Alnus spp. ;

- les composés phénoliques : les acides cinnamiques réduisent fortement la sporulation chez les Frankia isolés d'Alnus spp (Perradin et al., 1983)

3.1.4.2. Régulation de la formation des vésicules

Il est maintenant bien établi que les vésicules sont les sites de la fixation de l'azote dans les nodules des plantes actinorhiziennes (Mian et al., 1976 ; Benson et al., 1979 ; Baker et al., 1980 ; Lechevalier et al., 1982) ainsi que chez les Frankia cultivés in vitro (Tjepkema et al, 1980 ; Gauthier et al., 1981a ; Torrey et al., 1981).

Chez les Frankia cultivés in vitro la formation des vésicules peut être influencée par les paramètres suivants :

- la température : d'après Tisa et al, (1983), le Frankia ACN1 ^{Ac} ne produit aucune vésicule, dans aucun milieu de culture, au dessus de 33 °C ;

- la source d'azote : si l'on prend le cas de NH₄Cl, l'effet obtenu sur la production des vésicules est très variable selon les souches de Frankia. Certaines souches telles que Cp11 (isolée de Comptonia peregrina) ou ORS021001 et ORS020602 (isolées de Casuarina) ne forment pas de vésicules en présence de NH₄Cl (Tisa et al, 1983 ; Gauthier et al., 1983 et 1984a) alors que chez d'autres souches le NH₄Cl réduit par dix le nombre des vésicules (souche ACN1 ^{AG}) ou n'a aucun effet (souche EAN1 pec) (Tisa et al., 1983).

- les composés phénoliques : d'après Perradin et al. (1983), les acides benzoïques et p-hydroxybenzoïque ont un effet stimulant sur la production des vésicules chez les Frankia isolés d'Alnus spp. La présence de composés phénoliques ayant été rapportée par Mendez et al (1968) et Li (1974), dans les nodules d'Alnus spp, on peut penser que ces substances pourraient jouer un rôle de "médiateur chimique" dans les nodules, en contrôlant le pléomorphisme de l'endophyte.

- la méthionine sulfoximine (MSX) : chez le Frankia ORS020602 la MSX, qui est un inhibiteur de la Glutamine synthétase (GS) et de la Glutamate synthase (GOGAT), permet la formation des vésicules, et la biosynthèse de la

nitrogénase en présence de NH_4Cl (1 g l^{-1}) (Gauthier, 1983). Ceci suggère une possible régulation de la formation et de l'activité des vésicules, par les enzymes de l'assimilation de l'azote.

Dans les nodules de diverses plantes actinorhizien- nes (Blom, 1982 ; Akkermans et al., 1983), il a été montré que la quasi totalité des enzymes de l'assimilation de l'a- zote étaient localisées dans la plante et non dans l'endo- phyte. On peut donc supposer que dans le nodule, la produc- tion de vésicules par l'endophyte serait sous la dépendance : (1) des enzymes d'assimilation de l'azote de la plante, (2) de la source d'azote fournie par la plante au Frankia.

3.1.5. Fixation d'azote par les Frankia in vitro

Certaines souches de Frankia peuvent déréguler la biosynthèse de leur nitrogénase et croître aux dépens de l'azote moléculaire quand elles sont cultivées sur des milieux synthétiques adéquats ceci même sous des tensions d'oxygène atmosphériques (Tjepkema et al., 1980 et 1981 ; Gauthier et al., 1981a et 1984a ; Torrey et al., 1981 ; Tisa et al., 1983).

Il est désormais bien établi que ce sont les vési- cules qui sont le site de la fixation de l'azote chez Frankia (voir paragraphe 3.1.3.1. et chapitre III). Certains auteurs (Tjepkema et al., 1981 ; Torrey et Callaham, 1982) ont suggéré que les vésicules de Frankia pourraient jouer un rôle identique à celui des hétérocystes des cyanobacté- ries en ce qui concerne la protection de la nitrogénase contre l'oxygène. Cette protection, contre l'oxygène, se ferait de deux manières : (1) limitation des échanges gazeux à travers la paroi des vésicules (Torrey et Callaham, 1982), (2) respiration intense au niveau des vésicules (Murry et al., 1983).

3.1.6. Assimilation de l'azote chez Frankia cultivé in vitro

Les résultats publiés concernant ce sujet sont trop

peu nombreux pour que l'on puisse tenter d'appréhender les voies initiales du métabolisme de l'azote chez Frankia cultivé in vitro. Cependant, des activités glutamine synthétase (GS) et glutamate-oxoacétate-transaminase (GOT) ont été caractérisées dans les extraits bruts des 4 souches de Frankia étudiées à ce jour (AvcIl étudiée par Blom en 1981 et par Akkermans et al en 1983 ; ORS020602, ORS060501 et ORS140101 étudiées dans cette thèse). Dans le cas de la souche ORS020602 (syn. D11), isolée de Casuarina equisetifolia, il a été montré que la GS n'était pas régulée par un système d'adénylation comparable à celui de E. Coli (Gauthier, 1983) et que l'on pouvait déceler une activité glutamate synthase (GOGAT) chez cette souche. Il semble donc que dans le cas du Frankia ORS020602, l'assimilation de l'ammoniaque, produit de la nitrégénase, se fasse par l'action couplée GS-GOGAT comme chez les autres fixateurs d'azote (Nagatani et al., 1971).

3.1.7. Génétique de Frankia

La génétique de Frankia n'est qu'à son tout début mais pourrait prendre une expansion rapide par l'application des méthodes mises au point sur Streptomyces spp par Hopwood et Chater (1982).

Actuellement les seules études génétiques concernant Frankia se sont limitées à la recherche de plasmide. Normand et al. (1982) ont montré la présence de plasmides chez 4 souches de Frankia parmi 39 étudiées. La taille de ces plasmides se situe entre 7 et 32 Kb ce qui est insuffisant pour porter les gènes nif. Enfin, An et al (1983) n'ont pas pu différencier les différentes souches de Frankia, qu'ils ont étudiées sur la base de leur GC %.

3.2. Interactions Frankia-plante-hôte

3.2.1. Infection de la plante-hôte

Il a été montré, chez diverses plantes actinorhizien-nes telles que Myrica, Alnus, Comptonia (Callaham et al., 1979) et Casuarina equisetifolia (Diem et al., 1983), que

l'infection, comme chez la plupart des légumineuses (Bauer, W.D., 1981) se fait par l'intermédiaire des poils absorbants racinaires.

Après courbure en crosse des poils absorbants, le Frankia pénètre dans le poil et forme une ou plusieurs hyphes infectieuses qui envahissent des cellules corticales en s'y ramifiant. La formation du nodule se fait en deux étapes : (1) invasion des cellules du cortex racinaire situées à la base du site d'infection, ce qui conduit à la formation d'un pré-nodule non-fixateur d'azote, (2) formation sur la racine, au niveau du site d'infection, de primordiums racinaires latéraux qui sont par la suite infectés par Frankia et s'hypertrophient pour donner naissance à un amas de lobes nodulaires appelé rhizothamnion.

En ce qui concerne les mécanismes de reconnaissance qui permettent l'infection, ils sont totalement méconnus. Certains auteurs ont suggéré l'existence de lectines comme c'est le cas chez la symbiose Rhizobium-légumineuses. En particulier, Chaboud et Lalonde (1983) ont localisé certains sucres spécifiques sur les parois cellulaires de Frankia cultivés in vitro sans cependant prouver leur utilité lors de l'infection de leur plante hôte.

3.2.2. Spécificité d'hôte

Les expériences menées avec des souches pures de Frankia, afin de tenter de définir des groupes d'inoculation croisée comparables à ceux décrit chez la symbiose Rhizobium-légumineuses, n'ont pas encore permis de se faire une idée claire de la situation chez les plantes actinorhiziennes. Jusqu'à présent, trois types de Frankia peuvent être définis à la lumière des résultats récents :

- Frankia à spectre d'hôte large : c'est le cas de la souche Cp11, isolée de Comptonia peregrina, qui peut noduler Myrica et Alnus (Torrey et al., 1980).

- Frankia à spectre d'hôte très restreint : c'est le cas de la souche ORS021001 (syn. Cj1-82), isolée de Casuarina junghuhniana, qui nodule uniquement les espèces appartenant au genre Casuarina sensu stricto (Diem et al., 1983 ; Gauthier et al., 1984a) ;

- Frankia à spectre d'hôte aberrant : c'est le cas de certaines souches isolées de Casuarina equisetifolia (Gauthier et al., 1981b et 1984b) ou de Casuarina cunningghamiana (Zhang Zhongze et al., 1984) qui ne peuvent pas noduler leur plante d'origine mais qui nodulent certaines espèces appartenant à l'ordre des Rhamnales (Hippophaë, Elaeagnus, Colletia). L'existence de ce type de souches, qui n'a pas son équivalent dans la symbiose Rhizobium-légumineuse, nous conduit à poser les questions suivantes :

(1) qu'elle est l'origine de ces souches ? (2) pourquoi, bien que non-infectives vis-à-vis de leur hôte, se maintiennent-elles dans les nodules ? (3) sont-elles des mutants de l'endophyte vrai ou des Frankia "parasites" ; dans ce cas, comment pénètrent-elles dans la plante ? (4) Pourquoi nodulent-elles que le groupe des Rhamnales ?

Nous ne pourrons donner des réponses à ces questions que lorsque nous connaîtrons de façon précise les mécanismes de reconnaissance mis en jeu dans les symbioses actinorhiziennes.

3.2.3. Structure des nodules

Dans le nodule mature, le Frankia occupe un certain nombre de cellules du cortex du nodule situées à l'extérieur du cylindre vasculaire central. Cette localisation de l'endophyte pourrait s'expliquer par le fait que Frankia exige une tension assez élevée d'oxygène.

On distingue dans les nodules actinorhiziens les structures suivantes : hyphes septées, vésicules fixatrices d'azote dont la forme varie selon la plante hôte, sporange présentes ou non selon les espèces (voir chapitre II).

Contrairement aux nodules des autres plantes actinorhiziennes, les nodules sauvages de Casuarina ne possèdent pas de structures comparables aux vésicules (Newcomb et al., 1981). Ces observations ont été confirmées par l'étude de la structure de nodules de Casuarina provoqués par inoculation par une souche pure de Frankia (ORS021001 ; chapitre II). Cette absence de vésicules dans les nodules de

Casuarina pourrait être compensée de deux façons : (1) l'infection par l'endophyte provoque la subérisation des parois des cellules de la plante hôte (R.H. Berg, 1983), (2) présence d'une hémoglobine (J.D. Tjepkema, 1983).

3.2.4. Hémoglobines

Alors que les hémoglobines sont toujours présentes dans les nodules des légumineuses (Appleby, 1981), où elles jouent le rôle de transporteurs d'oxygène, on a pensé pendant longtemps que les nodules actinorhiziens en étaient démunis.

Certains auteurs, tels que Egle et Munding (1951) et Davenport (1960), avaient observé des hémoglobines dans les nodules de certaines plantes actinorhiziennes mais ces résultats étaient contestés en particulier à cause de la présence d'anthocyanines, dans les nodules actinorhiziens, qui pouvaient être confondues avec des hémoglobines (Bond, 1951).

En 1983, Tjepkema a démontré la présence d'hémoglobine en concentration élevée dans les nodules de Casuarina cunninghamiana et de Myrica gale. Dans les extraits bruts de nodules de C. cunninghamiana, il a démontré que l'hémoglobine se trouve sous forme soluble.

La fonction de l'hémoglobine, chez les légumineuses, étant de transporter l'oxygène à des tensions basses, on voit mal à quoi pourrait servir une hémoglobine dans les nodules de non-légumineuses dont l'endophyte est capable de fixer l'azote en présence de 20 % d'oxygène (Gauthier et al., 1981a ; Tjepkema et al., 1981).

Cependant, étant donné que Myrica gale et Casuarina cunninghamiana poussent sur des sols inondés où les tensions d'oxygène sont basses, on peut penser que la présence d'une hémoglobine chez ces plantes, serait une adaptation due aux conditions de croissance sur sol gorgé d'eau (Tjepkema, 1983).

3.2.5. Fonctionnement de la symbiose

3.2.5.1. Source de carbone fourni à l'endophyte

Akkermans et al., (1981,1983) ont étudié le contenu enzymatique des vésicules, de nodules d'Alnus glutinosa et d'Hippophaë rhamnoides, séparées des cellules de la plante hôte par filtration de broyat de nodules sur filtre de 20 μm . Les enzymes du cycle des acides tricarboxyliques ont été détectées dans les vésicules des nodules de ces deux plantes. On peut donc penser que la source de carbone et d'énergie, fournie par la plante à l'endophyte, est un acide dicarboxylique (probablement le succinate).

D'autre part, Maudinas et al., (1982) ont montré que les nodules d'Alnus spp sont riches en lipides et acides gras qui pourraient servir de source de carbone à Frankia.

3.2.5.2. Métabolisme de l'azote

Les études concernant les voies de l'assimilation de l'azote dans les nodules des plantes actinorhiziennes sont peu nombreuses et assez contradictoires. Nous pouvons cependant tenter de faire une comparaison avec ce qui est connu pour les nodules des légumineuses.

Chez la symbiose Rhizobium-légumineuses le NH_4^+ , produit par la nitrogénase dans les bactéroïdes, est excrété dans le cytoplasme de la cellule de la plante hôte puis assimilé par l'action couplée de la GS et de la GOGAT (Mac Parland et al., 1976 ; Brown et Dilworth, 1975). Dans les nodules de légumineuses, c'est généralement la glutamine et l'asparagine qui sont les acides aminés les plus représentés (Pate, 1977).

Chez les plantes actinorhiziennes, ce sont les nodules d'Alnus glutinosa qui ont été le plus étudiés. Dans ces nodules, c'est la citrulline qui est l'acide aminé le plus représenté (jusqu'à 50 % du total des acides aminés) (Leaf et al., 1958). Par contre, dans les nodules d'autres plantes

actinorhiziennes (Myrica, Hippophaë, Elaeagnus, Ceanothus et Casuarina), c'est l'arginine qui est l'acide aminé majeur (Wheeler et Bond, 1970).

Dans les nodules broyés d'Alnus glutinosa, il a été mis en évidence les activités enzymatiques suivantes : nitrogénase, glutamine synthétase (GS), glutamine-oxoglutarate aminotransférase (GOGAT), glutamate déshydrogénase (GDH) et ornithine carbamyl-transférase (OCT) (Akkermans et al., 1979). D'après ces auteurs, la GDH et la GOGAT seraient fonctionnelles dans les vésicules de l'endophyte alors que la GS et l'OCT seraient fonctionnelles dans les cellules de la plante hôte.

Von Staten et al. (1977) ont montré que 60 % de l'activité nitrogénase était associée à la "fraction vésicule" des nodules d'Alnus glutinosa. La présence d'activité nitrogénasique dans les autres fractions des nodules serait due à la contamination par des fragments de vésicules lors du broyage.

Par la suite, certains auteurs ont suggéré que dans les nodules d'Alnus glutinosa, tous les enzymes de l'assimilation de l'azote se trouvaient dans les cellules de l'hôte (Blom, 1982 ; Blom et Harkink 1981 ; Akkermans et al., 1983). Cependant, d'après Hirel et al. (1982), on ne peut pas exclure complètement la présence d'une GS dans l'endophyte des nodules d'aulne.

Enfin, Blom et al. (1981) ont réfuté la présence de la GOGAT dans les nodules broyés d'Alnus glutinosa. D'autre part, il a été montré que les extraits de nodules d'Alnus glutinosa pouvaient inhiber l'activité GOGAT des bactéroïdes de nodules de lupin (Blom, 1982). Ceci suggère l'existence, dans les extraits de nodules d'Alnus glutinosa, de composés pouvant masquer l'activité GOGAT.

On peut donc constater que les voies d'assimilation de l'azote, dans les nodules des plantes actinorhiziennes, ne sont pas clairement définies.

Une étude systématique des voies d'assimilation de

Tableau 35. Potentiel fixateur d'azote de diverses légumineuses et non-légumineuses pérennes

| Espèces | Fixation d'azote (kg N.hectare ⁻¹ an ⁻¹) | Références |
|--|--|-------------------------|
| Symbiose légumi- neuses-Rhizobium | | |
| . <u>Leucaena leucocephala</u> | 500 | NAS, 1977 |
| . <u>Acacia mearnsii</u> | 200 | Orchard et Darby, 1956 |
| . <u>Gliricidia sepium</u> | 34 | Roskoski et al., 1982 |
| . <u>Acacia pennatula</u> | 13 | Roskoski et al., 1982 |
| Symbiose non-légumi- neuses-Frankia | | |
| . <u>Alnus</u> spp | 12-300 | Tarrant et Trappe, 1971 |
| . <u>Coriaria</u> spp | 90-200 | Haines et De Bell, 1979 |
| . <u>Ceanothus velutivus</u> | 101 | McNaab et Cromack, 1983 |
| . <u>Hippophaë</u> spp | 80-197 | Haines et De Bell, 1979 |
| . <u>Casuarina equisetifolia</u> | 58 | Dommergues, 1963 |
| | 21-55 | Gauthier et al., 1984c |
| . <u>Allocasuarina littoralis</u> | 218 | Silvester, 1977 |

l'azote, tant au niveau des nodules des diverses familles de plantes actinorhiziennes qu'à celui des Frankia cultivés in vitro, se révèle donc être un objectif prioritaire.

3.2.6. Frankia, micro-organisme rhizosphérique

Diem et al. (1982c) ont démontré que le Frankia de Casuarina equisetifolia, cultivé en conditions hydroponiques, pouvait sortir du nodule et proliférer dans la rhizosphère de la plante-hôte tout en gardant son pouvoir infectif.

D'autre part, l'inoculation de plants de riz par des souches de Frankia s'est traduite par une augmentation de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) rhizosphérique comparable à celle obtenue par inoculation avec une souche d'Azospirillum brasiliense. Ceci suggère que dans la rhizosphère, le Frankia pourrait se comporter comme un micro-organisme de type fixateur libre d'azote (Chapitre II).

Ces résultats concernant la croissance "extra-nodulaire" de Frankia de Casuarina supportent l'hypothèse d'une vie saprophytique des Frankia dans des sols dépourvus de leurs plantes-hôtes (Akkermans, 1978 ; Akkermans et Van Dijk 1981 ; Wollum et al., 1968).

3.3. Potentiel fixateur d'azote des plantes actinorhiziennes

Le potentiel fixateur d'azote des plantes actinorhiziennes et des légumineuses est comparable (tableau 35). Il varie entre 13 et 500 kg N hectare⁻¹ an⁻¹ pour les légumineuses et de 12 à 300 kg N hectare⁻¹ an⁻¹ pour les plantes actinorhiziennes. La grande variabilité constatée au niveau de l'estimation de la quantité d'azote fixé est due à trois causes : (1) nature de la symbiose, (2) sites de croissance de la plante (nature du sol, climat...), (3) méthodes d'estimation de la fixation de l'azote.

Dans cette thèse nous avons rapporté les résultats d'expérience concernant l'estimation de la fixation d'azote de Casuarina equisetifolia inoculé par une souche pure

de Frankia (chapitre IV, article 8). Le potentiel fixateur d'azote de cette espèce est élevé et se situe entre 21 et 55 kg N hectare⁻¹ an⁻¹ dès la première année suivant la transplantation au champ. Contrairement à la plupart des estimations rapportées dans le tableau 35, nous avons mené nos expériences dans des conditions de croissance contrôlée (sol homogénéisé, irrigation, inoculation par une souche pure de Frankia, utilisation de clone de Casuarina ; ce qui réduit l'effet des facteurs limitants la fixation d'azote) et en utilisant des méthodes de mesures fiables telles que les méthodes isotopiques ¹⁵N.

3.4. Applications

De part leur capacité à prospérer sur des sols marginaux, les plantes actinorhiziennes sont appelées à jouer un rôle important dans des domaines aussi divers que la production de biomasse, la protection des sols et la régénération des sols dégradés.

Il est évident que l'avenir de la fixation d'azote en tant que Biotechnologie se situe au plan de la reforestation et de la production de bois de feu. En effet, pour la moitié de la population mondiale, le bois représente la principale source d'énergie (NAS, 1984).

Dans les régions tempérées, c'est le genre Alnus qui est le plus couramment employé. Actuellement des millions de plants d'Alnus (nodulés par Frankia en pépinière) sont plantés sur les sols dénudés par les travaux de construction des barrages de la Baie James au Québec (Fortin, communication personnelle).

Dans les régions tropicales et sub-tropicales, ce sont les espèces appartenant à la famille des Casuarinacées qui seront, probablement, appelées à jouer le rôle le plus important. En effet, cette famille constitue un réservoir d'espèces très prometteuses de part leur aptitude à croître dans des conditions extrêmes. Nous citerons comme exemple :

- Allocauarina decaisneana qui pousse dans le centre de l'Australie où les écarts de température vont

de -7°C à + 47°C et où les précipitations annuelles sont de 220 mm d'eau (NAS, 1984) ;

- Gymnostoma deplancheana qui pousse en Nouvelle-Calédonie sur des sols à haute toxicité en fer et en aluminium (NAS, 1984).

3.5. Perspectives

Les études concernant les symbioses actinorhiziennes connaîtront, dans les années à venir, une grande expansion liée aux raisons suivantes :

1) Les plantes actinorhiziennes (qui sont pérennes pour la plupart) peuvent croître dans des sols très pauvres, où elles peuvent produire une biomasse élevée ou contribuer à l'amélioration des sols. Dans l'optique d'une utilisation à grande échelle de ces plantes, il paraît nécessaire :

(1) de rechercher de nouvelles espèces actinorhiziennes inconnues, (2) de définir les potentialités fixatrices d'azote des différentes espèces utilisables en agriculture ou en foresterie, (3) de mettre au point les pratiques culturales permettant d'utiliser au mieux leur potentiel fixateur d' N_2 (cultures de rotation ou plantations mixtes, par exemple).

2) Les souches de Frankia sont caractérisées par une variabilité considérable, ce qui suggère que ce micro-organisme pourrait être manipulé lorsque l'on disposera des outils génétiques nécessaires.

3) La capacité des Frankia à s'associer symbiotiquement à huit familles de plantes très différentes, suggère qu'il serait théoriquement plus facile de créer de nouvelles plantes fixatrices d' N_2 en utilisant ce micro-organisme qu'en utilisant les Rhizobium qui ne peuvent s'associer qu'à deux familles de plantes (légumineuses et ulmacées).

BIBLIOGRAPHIE

- AKKERMANS, A.D.L., 1971. Nitrogen fixation and nodulation of Alnus and Hippophaë under natural conditions. Thesis, Univ. Leiden, 85 pp.
- AKKERMANS, A.D.L. 1978. Roots nodule Symbiosis in Non-léguminous N₂ fixing plants. In : interactions between non-pathogenic soil micro-organisms and Plants (Y.R. Dommergues and S.V. Krupa, Eds.) Elsevier Scientific Publishing Company p335-372.
- AKKERMANS, A.D.L. and VAN DIJK, C. 1975. The formation and nitrogen fixing activity of the root nodules of Alnus glutinosa under field conditions. In : Nitrogen fixation in the Biosphere, Vol. 7 : Symbiotic Nitrogen Fixation in plants. (Nutman, P.S., Ed.). Cambridge Univ. Cambridge, 511-520.
- AKKERMANS, A.D.L., and ROELOFSEN, W. 1980 Symbiotic nitrogen fixation by actinomycetes in Alnus-type root nodules. In : Nitrogen Fixation. (W.D.P. Stewart and J.R. Gallon eds.) Academic Press, London, 279-300.
- AKKERMANS, A.D.L., and VAN DIJK, C. 1981. Non-leguminous root-nodule symbioses with actinomycetes and Rhizobium. In : Nitrogen Fixation, Vol. 1. Ecology (W.J. Broughton ed.) Oxford University Press. 57-103.
- AKKERMANS, A.D.L., ROELOFSEN, W., and BLOM J. 1979. Dinitrogen fixation and ammonia assimilation in actinomycetous root nodules of Alnus glutinosa. In: Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forest. (Gordon, J.C., Wheeler C.T. and Perry, D.A., Eds). Oregon State University, Corvallis, OR. 160-174.
- AKKERMANS, A.D.L., ROELOFSEN, W., BLOM, J., HUSS-DANELLE, K, and HARKINK, R., 1983. Utilization of carbon and nitrogen compounds by Frankia in synthetic media and in root nodules of Alnus glutinosa, Hippophaë rhamnoides, and Datisca cannabina Can. J. Bot. 61, 2793- 2800.
- AMARGER, N., MARIOTTI, A., MARIOTTI, F. 1977. Essai d'estimation du taux d'azote fixé symbiotiquement chez le Lupin par le traçage isotopique naturel (¹⁵N). C.R. Acad. Sci. Paris, 284, 2179-2182.

- AMARGER, N., MARIOTTI, A., MARIOTTI, F., DURR, J.C.,
BOURGUIGNON, C., LAGACHERIE, B. 1979. Estimate of symbiotical-
ly fixed nitrogen in field grown soybeans using variations
in ^{15}N natural abundance. *Plant and Soil*, 52, 269-280.
- AN, C.S. and WILLS, J.W. 1983. Desoxyribonucleic acid base
composition of 12 Frankia isolates. *Can J. Bot* 61, 2859-2862.
- ANDEKE-LENGUI, M.A. and DOMMARGUES, Y.R. 1983. Coastal sand
dune stabilization in Senegal. In : *Casuarina Ecology, Mana-
gement and Utilization* (S.J. Midgley, J.W. Turnbull and R.D.
Johnston Eds.) CSIRO, Melbourne, 158-166.
- APPLEBY, C.A., TJEPKEMA, J.D., and TRINICK, M.J. 1983. Hemo-
globin in a nonleguminous plant, Parasponia : possible géne-
tic origin and function in nitrogen fixation. *Science*, 220,
951-953.
- APPLEBY, C.A. 1981. Leghemoglobin and other oxygen control
system. In: *Current prespectives in nitrogen fixation*. (Gib-
son, A.H. and Newton W.E., Eds.) Australian Academy of Science,
Canberra. 265-270.
- BADJI, S. 1982. Interactions entre arbres et végétations non
arborescentes dans un système de production agrosylvopasto-
rale en zone sahélienne. Nancy, Université 1 ; Engref ;
Hamburg : Bundesforschungsanstalt für Forst und Holzwirtschaft,
(D.E.A. Sciences forestières) 101pp.
- BAILEY, L.H. 1927. *The Standard Cyclopedia of Horticulture*,
vol. 3, Macmillan Co. New York and London.
- BAKER, D., and TORREY J.G., 1979. The isolation and cultiva-
tion of actinomycetous root nodule endophytes. In : *Symbio-
tic nitrogen fixation in the management of temperate forests*.
(Gordon, J.C., Wheeler, C.T. and Perry, D.A., Eds.). Oregon
State University, Corvallis, OR. 38-56.
- BAKER, D., KIDD, G.H., and TORREY J.G., 1979. Separation of
actinomycete nodule endophytes from crushed nodule suspen-
sions by Sephadex fractionation. *Bot. Gaz. (Chicago)*, 140,
S49-S51.
- BAKER, D., TORREY J.G., and KIDD G.H., 1979. Isolation by
sucrose density fractionation and cultivation in vitro of

- actinomycetes from nitrogen-fixing root nodules. *Nature* (London), 281, 76-78.
- BAKER, D., NEWCOMB, W. TORREY, J.G. 1980. Characterization studies of an ineffective actinorhizal microsymbiont, Frankia sp. Eu11 (Actinomycetales). *Can. J. Bot.* 26, 1072-1089.
- BAKER, D., PENGELLY W.L., and TORREY J.G., 1981. Immunological analysis of relationships among isolated Frankiae. (Actinomycetales). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31, 148-151.
- BAMBER, R.K., MULLETTE, K., and MACKOWSKI, C. 1980. Mycorrhizal studies. In : Research report 1977-1978. Forestry Comm. New South Wales, Sydney, Australia, 70-72.
- BAUER, W.D. 1981. Infection of legumes by rhizobia. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 32, 407-449.
- BECKING, J.H. 1966. Interactions nutritionnelles plantes - actinomycètes. *Annls Inst. Pasteur, Paris, Suppl.* 111, 211-246.
- BECKING, J.H. 1970. Frankiaceae Fam. Nov. (Actinomycetales) with one new combination and six new species of the genus Frankia Brunchorst 1886, 174. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 20, 201-220.
- BECKING J.H. 1975. Root nodules in non-legumes. In : the development and function of roots. (Torrey, Clarkson eds.) Academic Press, London, 507-566.
- BECKING, J.H. 1977. Dinitrogen-fixing associations in higher plants other than légumes. In : A treatrise on Dinitrogen fixation (R.W.F. Hardy and W.S. Silver, Eds). John Wiley and sons, New York. 185-276.
- BECKING, J.H. 1979. Nitrogen fixation by Rubus ellipticus J.E. Smith. *Plant Soil*, 53, 541-545.
- BECKING, J.H. 1982. N₂-fixing tropical non-legumes. In : Microbiology of Tropical Soil and Plant Productivity. (Y.R. Dommergues and H.G. Diem, Eds.) Martinus Nijhoff, The Hague, 109-146.
- BECKING, J., de BOER, W., HOUWINK, A. 1964. Electron microscopy of the endophyte of Ainus glutinosa. *Anton. Leeuwenhoek* 30, 342-376.

- BENSON, D.R. 1982. Isolation of Frankia strains from alder actinorhizal root nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 461-465.
- BENSON, D., ARP, D., BURRIS, R. 1979. Cell-free nitrogenase and hydrogenase from actinorhizal root nodules. *Science* 205, 688-689.
- BERG, H.R. 1983. Preliminary evidence for the involvement of suberization in infection of Casuarina. *Can. J. Bot* 61, 2910-2918.
- BERGERSEN, F.J. 1970. The quantitative relationships between nitrogen fixation and the acetylene-reduction assay. *Aust. J. Biol. Sci.*, 23, 1015-1025.
- BERGERSEN, F.J. and TURNER, G.L. 1980. Properties of terminal oxidase systems of bacteroids from root nodules of soybean and cowpea and of N₂ fixing bacteria grown in continuous culture. *Journal of General Microbiology* 118, 235-252.
- BISHOP, P.E., Mc PARLAND, R.H., and EVANS, H.J. 1975. Inhibition of the adenylylation of glutamine synthetase by methionine sulfone during nitrogenase derepression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 774-781.
- BLOM, J. 1981. Utilization of fatty acids and NH₄⁺ by Frankia Avc11. *FEMS Microbiol. Lett.* 10, 143-145.
- BLOM, J. 1982. Carbon and nitrogen metabolism of free-living Frankia spp. and of Frankia-Alnus symbioses. Ph. D. thesis, Agricultural University, Wageningen, The Netherlands. 93 p.
- BLOM, J. and R, HARKINK. 1981. Metabolic pathways for gluconeogenesis and energy generation in Frankia Avc11. *FEMS Microbiol. Lett.* 11, 221-224.
- BLOM, J., ROELOFSEN, W., and AKKERMANS A.D.L., 1981. Assimilation of nitrogen in root nodules of alder (Alnus glutinosa). *New Phytol.* 89, 321-326
- BLONDEAU, R. 1980. Fixation biologique de l'azote atmosphérique. Vuibert, Paris.
- BOND, G. 1951. The fixation of nitrogen associated with the root nodules of Myrica gale L., with special reference to

- its pH relation and ecological significance. *Ann. Bot.* (London), 15, 447-459.
- BOND, G. 1976. The results of the IBP survey of root-nodule formation in non-leguminous angiosperms. In : *Symbiotic nitrogen in plants* (P.S. Nutmann ed.) Cambridge University Press. 443-474
- BOND, G. 1983. Taxonomy and distribution of non-legume nitrogen-fixing systems. In : *Biological Nitrogen Fixation in Forest Ecosystems Foundations and applications* (J.C. Gordon and C.T. Wheeler, Eds). Martinus Nijhoff. Dr. W. Junk Publishers. The Hague, 55-88.
- BOND, G. and WHEELER, C.T. 1980. Non-legume nodule systems. In : *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation.* (F.J. Bergersen ed). John Wiley and Sons : Chichester, U.K. 185-211.
- BOND, G., and BECKING J.H. 1982. Root nodules in the genus Colletia. *New Phytol.*, 99, 57-65.
- BREMNER, J.M. 1975. Use of Nitrogen-Tracer Techniques for Research on Nitrogen Fixation. In : *Biological Nitrogen Fixation in farming systems of the tropics* (A. Ayanaba and P.J. Dart, Eds.), John Wiley and Sons, Chichester, 335-352.
- BREWBAKER, J.L., VAN DEN BELDT, R. and Mac DICKEN, K., 1982. Nitrogen Fixing tree resources : Potentials and Limitations. In : *Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture.* (P.H. Graham and S.C., Harris, Eds). C.I.A.T. Cali. 413-426.
- BROMFIELD, E.S.P. and ROUGHLEY, R.J. 1980. Characterisation of rhizobia isolated from nodules on locally-adapted *Glycine max* grown in Nigeria. *Ann. Appl. Biol.* 95, 185-190.
- BROWN, C.M. and DILWORTH, M.J. 1975. Ammonia Assimilation by *Rhizobium* cultures and *Bacteroids*. *J. Gen. Microbiol.* 86, 39-48.
- BURGGRAAF, A.J.P. and SHIPTON, W.A. 1983. Studies on the growth of Frankia isolated in relation to infectivity fixation (acetylene reduction). *Can. J. Bot.* 61, 2774-2782.
- BURNS, R.C., and HARDY, R.W.R., 1975. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springer-Verlag, New York.

- 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.
- CALLAHAM, D., NEWCOMB, W., TORREY, J.G. and PETERSON, R.L. 1979. Root hair infection in actinomycete-induced root nodule initiation in Casuarina, Myrica, and Comptonia. *Bot. Gaz.* 140 (Suppl.), S1-S9.
- CANIZO, A. and RODRIGUEZ-BARRUECO, C. 1978. Nitrogen fixation by Coriaria nepalensis Wall. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, 15, 453-458.
- CHABOUD, A. and LALONDE, M. 1983. Lectin binding on surfaces of Frankia stains. *Can. J. Bot.*, 61, 2889-2897.
- CHATERPAUL, L. and CARLISLE, A. 1983. Nitrogen Fixation : A Biotechnological opportunity for Canadian Forestry. *The Forestry chronicle*. 249-253.
- CHUK, M. 1983. Casuarina decaisneana in the Northern Territory of Australia. In : *Casuarina Ecology, Management and Utilization* (S.J. Midgley, J.W. Turnbull and R.D. Johnston Eds.). CSIRO, Melbourne 120-121.
- COTE, B. and CAMIRE, C. 1984. Growth, nitrogen accumulation, and symbiotic dinitrogen fixation in pure and mixed plantings of hybrid poplar and black alder. *Plant and Soil*, 78, 209-220.
- COYNE, P.D. 1973. Some aspects of the autecology of Casuarinas, with particular reference to nitrogen fixation. Ph.D. thesis, Dept of Forestry, Australian National University, Canberra.
- COYNE, P.D. 1983. Specificity between Casuarina species and root nodule organisms. In : *Casuarina Ecology, Management and Utilisation* (S.J. Midgley, J.W. Turnbull and R.D. Johnston Eds.). CSIRO, Melbourne, 205-210.
- DALTON, H. and MORTENSON, L.E. 1972. Dinitrogen (N₂) fixation (with a biochemical emphasis). *Bacteriol. Rev.*, 36, 231-260.
- DARROW, R.A. and KNOTTS, R.R. 1977. Two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. *Biochem. Biophys Res. Commun*, 78, 554-591.

- DART, P. 1977. Infection and Development of Leguminous nodules. In : A Treatise of Dinitrogen fixation. (R.W.F. Hardy and W.S. Silver Eds). John Wiley and Sons, New-York. 367-472.
- DAVENPORT, H.E. 1960. Haemoglobin in the root nodules of Casuarina cunninghamiana. Nature, 186 653-654.
- DELWICHE, C.C., STEYN, P.L. 1970. Nitrogen isotope fractionation in soils and microbial reactions. Environmental Sci. Technol. 4, 929-935.
- DHARMAWARDENE, M.W.N., HAYSTEAD, A. and STEWART, W.D.P. 1973. Glutamine synthetase of the Nitrogen-fixing Alga Anabaena cylindrica. Arch. Microbiol. 90, 281-295.
- 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, sér. C, 215-218.
- DIEM, H.G. and DOMMERGUES, Y.R. 1983. The isolation of Frankia from nodules of Casuarina. Can. J. Bot., 61, 2822-2825.
- DIEM, H.G., GAUTHIER, D., and DOMMERGUES, Y.R. 1982a. Isolation of Frankia from nodules of Casuarina equisetifolia. Can. J. Microbiol. 28 (5), 526-530.
- DIEM, H.G., GAUTHIER, D. and DOMMERGUES, Y.R. 1982b. Isolement et culture in vitro d'une souche infective et effective de Frankia isolée de nodules de Casuarina sp. C.R. Acad. Sc. Paris, t. 295, Ser. III, 759-763.
- DIEM, H.G., GAUTHIER, D. and DOMMERGUES, Y.R. 1982c. Extranodular growth of Frankia of Casuarina equisetifolia FEMS. Microbio. Letters 15, 181-184.
- DIEM, H.G., GAUTHIER, D. and DOMMERGUES, Y.R. 1983. An effective strain of Frankia from Casuarina sp. Can. J. Bot. 61, 2815-2821.
- DIEM, H.G., GUEYE, I., GIANINAZZI-PEARSON, V., FORTIN, J.A., and DOMMERGUES, Y.R. 1981. Ecology of VA mycorrhizae in the tropics : the semi-arid zone of Senegal. Acta Oecologica. Oecol. Plant, 2, 53-62.

- DOMMERGUES Y.R. 1963. Evaluation du taux de fixation de l'azote dans un sol dunaire reboisé en filao (Casuarina equisetifolia) *Agrochimica*, 105, 179-187.
- DOMMERGUES, Y.R. 1982. Ensuring effective symbiosis in nitrogen-fixing trees. In : Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. (P.H. Graham and S.C. Harris eds.) Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 395-411.
- DOMMERGUES, Y.R., DIEM, H.G., GAUTHIER, D., DREYFUS, B. and CORNET, F. 1983. Nitrogen fixing trees in the tropics : potentialities and limitations. Proc. 5th international Symposium on Nitrogen Fixation, Noordwijkerhout Hollande 28 Aout - 3 Septembre 1983.
- DREYFUS, B. ELMERICH, C. and DOMMERGUES, Y.R. 1983. Free-living Rhizobium strain able to grow under N_2 as the sole nitrogen source. *Appl. Environ Microbiol.*, 45, 711-713.
- DUCAN, D.B. 1955. Multiple range and F test. *Biometrics*, 11, 1-42.
- EADY, R.R. and SMITH, B.E. 1979. Physico-chemical properties of nitrogenase and its components. In : "A treatise of dinitrogen fixation" (Hardy, RWF, Bottomley, F and Burns, RC, eds). Wiley interscience New York, section II, 399-490.
- EGLE, K. and MUNDING, H. 1951. Uber den Gehalt an Häminkörpern in den Wurzelknöllchen von Nicht-Leguminoses. *Naturwissenschaften*. 38, 548-549.
- EMBERGER, L. 1960. *Traité de Botanique systématique* (CHADEFAUD M. et EMBERGER L. Eds). Tome II Masson 1540p.
- EMERICH, D.W. and BURRIS, R.H. 1978. Complementary functioning of the component proteins of nitrogenase from several bacteria. *J Bacteriol.* 134, 936-943.
- FAHIEN L.A. and COHEN P.P. 1970. L-glutamate dehydrogenase (frog and tadpole liver). In *methods in enzymology*. Vol. XVIIIA. (Tabor, H. and White Tabor, C., Eds). Academic Press, London. 839-844.
- FAURE-RAYNAUD, M., MOIROUD, A. 1983. Symbiose Frankia-Aulne

culture in vitro de Frankia sp. sur différentes sources de carbone et d'azote. C.R. Acad. Sc. Paris 296, 757-760.

FRED, E.B. BALDWIN, I.L. and Mc COY, E. 1932. Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin.

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

FRIED, M. and MIDDELBOE, V. 1977. Measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop. Plant and Soil 47, 713-715.

GARDNER, I.C. 1976. Ultrastructural studies of non-leguminous root nodules. In : Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. (P.S. Nutman ed.) Cambridge University Press, London. 485-496.

GAUTHIER, D. 1983. Effect of L-methionine DL-sulfoximine on acetylene reduction and vesicle formation in derepressed cultures of Frankia strain D11 Can. J. Microbiol. 29, 1003-1006.

GAUTHIER, D. and ELMERICH, C. 1977. Relationship between Glutamine synthetase and Nitrogenase in Spirillum lipoferum. FEMS Microbiol. Lett. 2, 101-104.

GAUTHIER, D., DIEM, H.G. and DOMMARGUES, Y.R. 1981a. in vitro nitrogen fixation by two actinomycete strains isolated from Casuarina nodules. Appl. Environ. Microbiol., 41, 306-308.

GAUTHIER, D., DIEM H.G. and DOMMARGUES, Y.R. 1981b. Infectivité et effectivité de souches de Frankia isolées de nodules de Casuarina equisetifolia et d'Hippophaë rhamnoides. C.R. Acad. Sc. Paris, 293, ser. C, 489-491.

GAUTHIER, D., DIEM H.G. and DOMMARGUES, Y.R. 1983. Preliminary results of research on Frankia and endomycorrhizae associated with Casuarina equisetifolia. In Casuarina ecology Management and Utilization. (Midgley, S.J., Turnbull, J.W. Johnston, R.D., Eds). CSIRO, Melbourne. pp. 211-217.

GAUTHIER, D., DIEM, H.G. and DOMMARGUES, Y.R. 1984a. Tropical and sub-tropical actinorhizal plants. Symposium on nitrogen fixing trees for the Tropics. Pesquisa Agropecuaria Brasileira (sous presse).

- GAUTHIER, D. FRIONI, L., DIEM, H.G. and DOMMERGUES, Y.R.
1984b. The Colletia spinosissima-Frankia symbiosis. *Oecologia Plantarum* vol. 5 (19) N° 3, 231-239.
- GAUTHIER, D., DIEM, H.G., GANRY, F. and DOMMERGUES, Y.R.
1984c. Assessment of N₂ fixation by Casuarina equisetifolia inoculated with ORSO21001 using ¹⁵N methods. *Soil Biol. Biochem.* (sous presse).
- GIANINAZZI-PEARSON, V. and DIEM H.G. 1982. Endomycorrhizae in the tropics. In : *Microbiology of Tropical Soils and plant productivity* (Y.R. Dommergues et Diem H.G. Eds). Martinus Nijhoff, the Hague 209-252.
- GIBSON, A.H. 1963. Physical environment and symbiotic nitrogen fixation the effect of root temperature on recently nodulated Trifolium subterraneum plants. *Aust. J. Biol. Sci.* 16, 23-42.
- GORDON, J.K. and BRILL, W.J. 1974. Derepression of nitrogenase synthesis in presence of excess NH₃⁺. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59, 967-971.
- HAINES, S.B., DE BELL, D.S. 1979. Use of nitrogen-fixing plants to improve and maintain productivity of forest soils. In : *Proc impact of intensive harvesting on forest nutrient cycling*. School of Forestry. Syracuse. N.Y., 279-303.
- HENRY, M. 1978. Sur la localisation et la morphologie des microorganismes présents dans les nodules racinaires d'Elaeagnus angustifolia. 103^e Congrès Nat. Soc. Sav. Nancy, Fasc. I, 359-370.
- HEISY, R.M., DELWICHE, C.C., VIRGINIA, R.A., WRONA, A.F.,
BRYAN, B.A. 1980. A new nitrogen-fixing non légume : Chamaebatia foliolosa (Rosaceae). *Am. J. Bot.*, 67, 429-431.
- HEWITT, E.J. 1966. Sand and Water Culture Methods Used in the study of Plant Nutrition. Technical Communication, N°22, 2nd ed, Commonwealth Bureau, London, 431.
- HIREL, B., PERROT-RECHENMANN., MAUDINAS, B. and GADAL, P 1982. Glutamine synthetase in alder (Alnus glutinosa) root nodules. Purification, properties and cytoimmunochemical localization. *Physiol. Plant.* 55, 197-203.

- HOAGLAND, D.R. ARNON, D.I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. Calif. Agric. Expt. Sta. Circ., 347.
- HOPWOOD, D.A. and CHATER, K.F. 1982. Cloning in *Streptomyces* : systems and strategies. In : Genetic engineering (Setlow, J.K. and Hollaender, A. Eds) Plenum Press. New York. Vol. 4, 119-145.
- HUBBELL, D.E. 1981. Legume infection by Rhizobium : a conceptual approach. *Bioscience*, 31, 832-836.
- HUGUENIN, B. 1969. Les nodules mycorrhiziens du Casuarina deplanchiana de Nouvelle-Calédonie. Thèse Doctorat 3ème Cycle, Université de Rouen.
- JANSEN VAN RENSBURG and STRIJDOM, B.W. 1972. A bacterial contaminant in nodules of leguminous plants. *Phytophylactica* 4, 1-8.
- JARA, P. 1981. Le continuum Rhizobium japonicum-Rhizobium cowpea. Thèse de Doctorat de spécialité. Université d'Aix-Marseille I. 149 p.
- JONHSON, L.A.S. 1982. Notes on Casuarinaceae II. *J. Adelaide Bot. Gard.* 6 (1), 73-87.
- KANT, S. and NARAYANA, H.S. 1977. Preliminary studies the development and structure of root nodules in Casuarina equisetifolia L. *Proc. Indian Acad. Sci.*, 85B, 34-41.
- KATAOKA, T. 1930. On the significance of the root-nodules of Coriaria japonica A. Gr. in the nitrogen nutrition of the plant. *Japan J. Bot.*, 5, 209-218.
- KEISTER, D.L. 1975. Acetylene reduction by pure culture of rhizobia. *J. Bacteriol.* 123, 1265-1268.
- KNOWLES, R. 1980. Nitrogen fixation in natural plant communities and soils. In : *Methods for Evaluating Biological Nitrogen fixation* (F.J. Bergersen ed). John Wiley, Chichester. 557-582.
- KOHL, D.H., SHEAKER, G., HARPER, J.E. 1980. Estimates of N_2 fixation based on differences in the natural abundance of ^{15}N in nodulating and non nodulating isolines of soybeans.

Plant. Physiol., 66, 61-65.

KONDAS, S. 1983. Casuarina equisetifolia a multipurpose cash crop in India. In : Casuarina Ecology, Management and Utilization (S.J. Midley, J.W. Turnbull and R.D. Johnston Eds.) CSIRO, Melbourne, 66-76.

LALONDE, M. 1980. Techniques and observations of the nitrogen fixing Alnus root nodule symbiosis. In:Recent advances in biological nitrogen fixation. (Subba Rao, N.S., Ed.) Edward Arnold, London. 421-434.

LALONDE, M. and 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. (J.C. Gordon, C.T. Wheeler, and D.A. Perry eds.) Oregon State University, Corvallis, OR. 95-110.

LALONDE, M., CALVERT, H.E. and PINE, S. 1981. Isolation and use of Frankia strains in actinorrhizae formation. In : Current perspectives in nitrogen fixation. (Gibson, A.H. and Newton, W.E., Eds). Australian Academy of Science, Canberra. 296-299.

LARUE, T.A. and PATTERSON, T.G. 1981. How much nitrogen do legumes fix? Advances in agron., 34, 15-38.

LAWRIE, A.C. 1982. Field nodulation in nine species of Casuarina in Victoria. Austr. J. Bot., 30 (4), 447-460.

LEAF, G., GARDNER, I., BOND, G. 1958. Observations on the composition and metabolism of nitrogen-fixing root nodules of Alnus. J. Exp. Bot. 9, 320-331.

LECHEVALIER, M.P. 1983. Cataloging Frankia strains. Can. J. Bot. 61, 2964-2967.

LECHEVALIER, M.P. and LECHEVALIER, H.A. 1979. The taxonomic position of the actinomycetic endophytes. In : Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests. (Gordon, J.C., Wheeler, C.T. and Perry, D.A., Eds.), Oregon State University, Corvallis, OR. 111-122.

LECHEVALIER, M.P., HORRIERE, F. and LECHEVALIER, H.A. 1982. The biology of Frankia and related organisms. Dev. Ind. Microbiol. 23, 51-60.

- LECHEVALIER, M.P., BAKER, D. and HORRIERE, F. 1983. Physiology, chemistry, serology, and infectivity of two Frankia isolates from Alnus incana subsp. rugosa. Can. J. Bot. 61, 2826-2833.
- LEPPER, M.G. and FLESCHNER, M. 1977. Nitrogen fixation by Cercocarpus ledifolius (Rosaceae) in pioneer habitats. Oecologia (Berlin) 27, 333-338.
- LI, C.Y. 1974. Phenolic compounds in understory species of alder, conifer, and mixed alder-conifer stands of coastal Oregon. Llyodia, 37, 603-609.
- LOVELACE, T.E. and COLWELL, R.K. 1968. A multipoint inocular for Petri dishes. Appl. Microbiol. 18, 944-945.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- MAGASANIK, B. 1977. Regulation of bacterial nitrogen assimilation by glutamine synthetase. Tibs, 2, 9-12.
- MAGASANIK, B., PIVAL M.J, BRENCHELEY, J.E., TYLER, B.M., DE LEO, A.B., STREICHER, S.L., BENDER, R.A. and PARIS, C.G. 1974. Glutamine synthetase as a regulator of enzyme synthetis. In : Current Topics in Cellular regulation. (Horecker, B.L. and Stadtman, E.R. eds). Academic Press, vol., 8, 119-138.
- MARIOTTI, A. 1982. Apports de la géochimie isotopique à la connaissance du cycle de l'azote. Thèse de doctorat d'Etat ès sciences naturelles. Université Paris 6.
- MARIOTTI, A., MARIOTTI, F., et AMARGER, N. 1983. Utilisation du traçage isotopique naturel par ^{15}N pour la mesure du taux d'azote fixé symbiotiquement par les légumineuses. Physio. Veg. 21, 279-291.
- MAUDINAS, B., CHEMARDIN, M., GADAL, P. 1982. Fatty acid composition of roots and root nodules of Alnus species. Phytochemistry 21, 1271-1273.
- Mc KENZIE, N.A. and WALLACE, M.S. 1954. The Kjeldahl determination : a critical study of digestion conditions - Austr. J. Chem. 7, (1), 55 - 70.

- Mc NAAB, D.H. and CROMACK, K. Jr. 1983. Dinitrogen fixation by a mature Ceanothus velutinus (Dougl.) stand in the Western Oregon Cascades. Can. J. Microbiol. 29, 1014-1021.
- Mc PARLAND, R.H., GUEVARA, J.G., BECKER, R.R., EVANS, H.F. 1976. The purification and properties of the glutamine synthetase from the cytosol of soya-bean root nodules. Biochem J. 153, 597-606.
- MEDAN, D. and TORTOSA, R.D. 1976. Nodulos radicales en Discaria y Colletia (Rhamnaceae). Bol. Soc. Argentina Bot., 17, 323-336.
- MEDAN, D. and TORTOSA, R. 1981. Nodulos ectinomicorrizicos en especies Argentina de los generos Kentrothamnus, Trevoa (Rhamnaceae) y Coriaria (Coriariaceae). Bol. Soc. Argentina de Bot., 20, 71-81.
- MENDEZ, J., GESTO, M.D.V., VAZQUEZ, A., VIEITEZ, E. and SEONE, E. 1968. Growth substances isolated from woody cuttings of Alnus glutinosa Medic. and Fraxinus excelsior L. Phytochemistry. 7, 575-579.
- MEERS, J.L., TEMPEST, D.W. and BROWN, C.M. 1970. Glutamine (amide) 2-oxoglutarate amino transferase oxidoreductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. J. Gen. Microbiol. 64, 187-194.
- MEIJER, E.G.M. and BROUGHTON, W.J. 1982. Biology of Legume-Rhizobium Interactions in Nodule formation. In : Molecular biology of plants tumors. Academic Press.
- MERCADO, A. 1978. Nodules de tres especies de Myrica endémicas de Cuba. Ciencias Biologicas, Cuba, 39-47.
- MIAN, S., BOND, G., RODRIGUEZ-BARRUECO, C. 1976. Effective and ineffective root nodules in Myrica faya. Proc. R. Soc. Lond. B. 194, 285-293.
- MORT, A., NORMAND, P. and LALONDE, M. 1983. 2-O-Methyl-D-mannose, a key sugar in the taxonomy of Frankia. Can. J. Microbiol. 29, 993-1002.
- MURRY, M.A., FONTAINE, M.S. and TORREY, J.G. 1983. O₂ protection of Nitrogenase in Frankia isolate Ar13. Proceedings

of the 5th International Symposium on Nitrogen Fixation.
Noordwijkerhout, The Netherlands.

NAGATANI, H., SHIMIZU, M. and VALENTINE, R.C. 1971. The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen fixing bacteria. Arch. Microbiol. 79, 164-175.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (US). 1977. Leucaena : Promising forage and tree crop for the tropics. NAS. Washington. D.C., USA. 115 p.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (US). 1979. Tropical legumes : Resources for the future. NAS. Washington. D.C., USA. 331.p.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (US). 1980. Firewood Crops. Shrub and Tree species for Energy Production. NAS. Washington. D.C. USA. 237 p.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (US). 1984. Casuarinas : Nitrogen-fixing Trees for Adverses Sites. NAS. Washington. D.C. USA. 118p.

NEWCOMB, W. 1981. Fine structure of the root nodules of Dryas drummondii Richards (Rosaceae). Can. J. Bot. 59, 2500-2514.

NEWCOMB, W., PANKHURST, C. 1982a. Fine structure of actinorhizal root nodules of Coriaria arborea. New Zealand J. Bot. 20, 93-103.

NEWCOMB, W., PANKHURST, C. 1982b. Ultrastructure of actinorhizal root nodules of Discaria toumatou (Rhamnaceae). New Zealand J. Bot. 20, 105-113.

NEWCOMB, W., PANKHURST, C.E. and TORREY, J.G. 1981. Casuarina montana, Coriaria arborera, Discaria toumatou and Dryas drummondii. Abstract, IV Internat. Symp. N₂ Fixation, Canberra, Australia.

NORMAND, P., SIMONET, P., BUTOUR, J., ROSENBERG, C., MOIROUD, A., LALONDE, M. 1983. Plasmids in Frankia sp. J. Bacteriol. 155, 32-35.

ORCHARD, E.R., and DARBY, G.D. 1956. Fertility changes under continued wattle culture with special reference to nitrogen fixation and base status of the soil. C.R. 6ème Congrès

International Science Sol, Paris, France Section D, 305-310.

OKON, Y., ALBRECHET, S.L. and BURRIS, R.H. 1976. Factors affecting growth and nitrogen fixation of Spirillum lipoferum. J. Bacteriol., 127, 1248-1254.

PATE, J.S. 1977. Functional biology of dinitrogen fixation by legumes. In : A treatise of dinitrogen fixation Section III. Biology. (R.W.F. Hardy and W.S. Silver, Eds.). Wiley. New York NY. USA. 473-517

PAUL, E.A. 1978. Contribution of nitrogen fixation to ecosystem functioning and nitrogen fluxes on a global basis. Ecol. Bull. (Stockholm), 26, 282-293.

PERRADIN, Y. MOTTET, M., LALONDE, M. 1983. Influence of phenolics on the in vitro growth of Frankia strains. Can. J. Bot. 61, 2807-2814.

POMMER, E.H. 1959. Über die Isolierung des Endophyten aus den Wurzelknöllchen von Alnus glutinosa Gaertn. und. über erfolgreiche Re-Infektionsversuche. Ber. Deuts. Bot. Ges. 72, 138-150.

PROSTGATE, J.R. 1972. The acetylene reduction test for nitrogen fixation. In : Methodes in Microbiology. (J.R. Norris and D.W. Ribbons, Eds). Academic Press, vol. 6B, 343-356.

PROSTGATE, J.R. 1981. Microbiology of the free-living nitrogen-fixing bacteria, excluding cyanobacteria. In : Current perspectives in nitrogen fixation. (Gibson, AH and Newton, WE, Eds) Australia academy of Science, Canberra, 217-228.

QUISPEL, A. 1960. Symbiotic nitrogen fixation in non-leguminous plant V. The growth requirements of the endophyte of Alnus glutinosa. Acta Botan. Neerl. 9, 380-396.

QUISPEL, A. 1974. The biology of nitrogen fixation. North Holland Publishing Co, Amsterdam et New York.

QUISPEL, A. and TAK, T. 1978. Studies on the growth of the endophyte of Alnus glutinosa (L.) Vill. in nutrient solutions. New Phytol. 81, 587-600.

QUISPEL, A., BURGGRAAF, A. 1981. Frankia, the diazotrophic endophyte from actinorhizas. In : Current perspectives in

- nitrogen fixation, (Gibson, A., Newton, W., Eds). Australia Academy of Science, Canberra, 229-236.
- RAIMBAULT, M., RINAUDO, G., GARCIA, J.L., BOURREAU, M. 1977. A device to study metabolic gases in the rice rhizosphere. *Soil. Biol. Biochem* 9, 193-196.
- ROSE, S.L. 1980. Mycorrhizal associations of some actinomycete nodulated nitrogen-fixing plants. *Canadian Journal of Botany*, 58, 1449-1454.
- ROSE, S.L. and TRAPPE, J.M. 1980. Three new endomycorrhizal *Glomus* spp. associated with actinorrhizal shrubs. *Mycotaxon*, 10, 413-420.
- ROSKOSKI, J.P., MONTANO, J., VAN KESSEL, C. and CASTILLEJA, G. 1982. Nitrogen fixation by tropical woody legumes : Potential source of soil enrichment. In : *Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture* (Graham, P.H. and Harris, S.C. Eds). CIAT. 447-454.
- ROSSI, S. 1964. Propagation dans le sol de l'organisme causant les nodosités dans les racines d'aulne (*Alnus glutinosa*). *Ann. Inst. Pasteur Paris*, 106, 505-510.
- ROVIRA, A.D. 1965. Plant root exudates and their influence upon soil microorganisms. In : *Ecology of soil-borne plant pathogens*. (Baker, K.F. and Snyder, W.C., Eds). John Murray, London. 170-184.
- ROWELL, P., ENTICOTT, S. and STEWART, W.D.L. 1979. Glutamine synthetase and nitrogen activity in the Blue-green Alga *Anabaena cylindrica*. *New Phytol.* 79, 41-54.
- SASSON, A. 1983. *Les Biotechnologies, défis et promesses*, UNESCO, Paris.
- SCHMIDT, E.L. 1978. Ecology of the Legume Root Nodules Bacteria. In : *Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and Plants*. (Dommergues, Y.R. and Krupa, S.V. Eds). Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam. 269-304.
- SCHWINTZER, C., BERRY, A., DISNEY, L. 1982. Seasonal pattern of root nodule growth endophyte morphology, nitrogenase activity and shoot development in *Myrica gale*. *Can. J. Bot.* 60, 746-757.

- SHAPIRO, B.M. and STADTMAN, E.R. 1970. Glutamine synthetase (Escherichia coli). In : Methods in enzymology. Vol. XVIIIA. (Tabor, H. and White-Tabor, C., Eds). Academy Press, New York 910-922.
- SHIPTON, W.A. and BURGGRAAF, A.J.P. 1982. A comparison of the requirements for various carbon and nitrogen sources and vitamins in some Frankia isolates. Plant Soil. 69, 149-161.
- SHIPTON, W.A. and BURGGRAAF, A.J.P. 1983. Aspects of the cultural behaviour of Frankia and possible ecological implications. Can. J. Bot. 61, 2783-2792.
- SILVESTER, W. 1974. Ecological and economic significance of the non-legume Symbioses. In : Proc. of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation. (Newton, W., Nyman, C., Eds). Washington State University Press, vol. 2, 489-506.
- SILVESTER, W.B. 1977. Dinitrogen fixation by plant associations excluding legumes. In : A Treatise on Dinitrogen Fixation (R.W.F. Hardy and A.H. Gibson Eds.) John Wiley, New York 141-190.
- SIMONET, P. 1983. Symbiose Aulne-Frankia. Isolement du Microsymbiote. Apport des techniques sérologiques et d'étude de l'ADN pour la caractérisation des souches pures. Thèse de Doctorat de 3ème cycle. Université Claude Bernard. Lyon I.
- STEVENSON, F.J. 1967. Organic acids in soil. Soil Biochem. 1, 119-146.
- STEWART, W.D.P. 1976. Nitrogen fixation. Phil Trans R Soc Lond 274, 341-376.
- STEWART, W.D.P. 1977. Blue-Green Algae. In : A treatise on Dinitrogen Fixation (Hardy, R.W.F. and W.S. Silver, Eds). John Wiley and Sons, New York. 63-124.
- STEWART, W.D.P. 1980. Systems involving blue-green algae (Cyanobacteria). In : Methods for evaluating biological nitrogen fixation. (Bergersen, FJ, Ed). John Wiley and Sons, 583-636.
- STRAND, R., LAETSCH, W. 1977. Cell and endophyte structure of the nitrogen-fixing root nodules of Ceanothus integerrimus H. and A.1. Fine structure of the nodule and its endosymbiont. Protoplasma 93, 165-178.

SUETIN, S., PARIJSKAJA, A., KALAKOUTSKII, L. 1979. Structural aspects of endosymbiont development and interaction with host cytoplasm in Alnus glutinosa L. Gaertn root nodules. *Microbios Letters* 12, 83-92.

TARRANT, R.F., TRAPPE, J.M. 1971. The role of Alnus in improving the forest environment. In : *Biological nitrogen fixation in natural agricultural habitats*. (Lie, T.A., Mulder, E.G., Eds). Special vol Plant and Soil. 335-348.

TESSIER, D.T. et BERRIER, J. 1979. Utilisation de la microscopie électronique à balayage dans l'étude de sols. *Sciences du sol*, 1, 67-82.

TISA, L., Mc BRIDE, M. and ENSIGN, J.C. 1983. Studies of growth and morphology of Frankia strains EANIpec, EU1lc, Cp11, and ACN1AG. *Can. J. Bot.* 61, 2768-2773.

TJEPKEMA, J. 1983. Hemoglobins in the nitrogen-fixing root nodules of actinorrhizal plants. *Can. J. Bot.* 61, 2924-2929.

TJEPKEMA, J.D. 1984. Physiology of Actinorrhizas. In : *Advances in N₂ fixation research*. (C. Veeger and W.E. Newton, Eds.) Martinus Nijhoff. The Hague. (in press).

TJEPKEMA, J.D. , ORMEROD, W. and TORREY, J.G. 1980. Vesicle formation and acetylene reduction activity in Frankia sp. CPI1 cultured in defined nutrient media. *Nature*, London 287, 633-635.

TJEPKEMA, J., ORMEROD, W., TORREY, J. 1981. Factors affecting vesicle formation and acetylene reduction (nitrogenase activity) in Frankia sp. Cp11. *Can. J. Microbiol.* 27, 815-823.

TORREY, J.G. 1976. Initiation and development of root nodules of Casuarina (Casuarinaceae). *Amer. J. Bot.* 63, 335-344.

TORREY, J.G. 1982. Casuarina : actinorrhizal nitrogen-fixing tree of the tropics. In : *Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture*. (P.H. Graham and S.C. Harris eds). Centro International de Agricultura Tropical, Cali. 427-439.

TORREY, J.G. 1983. Casuarina : actinorrhizal dinitrogen-fixing trees of the tropics. In : Casuarina Ecology, Management and

- Utilisation (S.J. Midgley, J.W. Turnbull and R.D. Johnston Eds.) CSIRO, Melbourne, 193-204.
- TORREY, J.G. and CALLAHAM, D., 1982. Structural features of the vesicles of Frankia Cp11 in culture. *Can. J. Microbiol.* 28, 749-757.
- TORREY, J.G. and TJEPKEMA, J.D. 1979. Symbiotic nitrogen fixation in Actinomycete-nodulated plants. *Botanical Gazette.* 140, 1-2.
- TORREY, J.G. and TJEPKEMA, J.D. 1983. Introduction. Conférence internationale sur la biologie de Frankia. *Can. J. Bot.* 61, 2765-2767.
- TORREY, J.G., BAKER, D., CALLAHAM, D., DEL TREDICI, P., NEWCOMB, W., PETERSON, R.L. and TJEPKEMA, J.D. 1980. On the nature of the endophyte causing root nodulation in Comptonia. In: Nitrogen fixation. Vol. II. (Newton, W.E. and Orme-Johnson, W.H., Eds.). University Park Press, Baltimore, MD. 217.227.
- TORREY, J., TJEPKEMA, J., BERGERSEN, J., GIBSON, A. 1981. Dinitrogen fixation by culture of Frankia sp. Cp11 demonstrated by $^{15}\text{N}_2$ incorporation. *Plant Physiol.* 68, 983-984.
- TRINICK, M.J. 1979. Structure of nitrogen-fixing nodules formed by Rhizobium on roots of Parasponia andersonii Planch. *Can. J. Microbiol.* 25, 565-578.
- TUBB, R.S. 1974. Glutamine synthetase and ammonium regulation of nitrogen synthesis in Klebsiella. *Nature*, 251, 481-485.
- TURNBULL, J.W. 1983. The use of Casuarina equisetifolia for protection forests in China. In : Casuarina Ecology, Management and Utilisation (S.J. Midgley, J.W. Turnbull and R.D. Johnson Eds.) CSIRO, Melbourne, 55-57.
- TYSON, J.H. and SILVER, W.S. 1979. Relationship of ultrastructure to acetylene reduction (N_2 fixation) in root nodules of Casuarina. *Bot. Gaz.* 140 (suppl.) S44-S48.
- VAN DIJK, C. 1978. Spore formation and endophyte diversity in root nodules of Alnus glutinosa (L.). *Vill. New Phytol.* 81, 601-615.

- VAN RENSBURG, H.J. and STRIJDOM, B.W. 1972. A bacterial contaminant in nodules of Leguminous plants. *Phytophylactica*. 4, 1-8.
- VAN STRATEN, J., AKKERMANS, A.D.L., ROELOFSEN, W. 1977. Nitrogenase activity of endophyte suspensions derived from root of Alnus, Hippophaë, Shepherdia and Myrica spp. *Nature* 266, 257-258.
- VINCENT, J.M. 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- VOSE, P.B., RUSCHEL, A.P., VICTORIA, R.L., SAITO, S.M.T. and MATSUI, E. 1982. ^{15}N as a tool in biological nitrogen fixation research. In : *Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture* (P.H. Graham, Ed). Centro International de Agricultura Tropical (CIAT); Cali. 575-592.
- WHEELER, C.T. and BOND, G. 1970. The amino acids of non-leguminous root nodules. *Phytochem.*, 9, 705-708.
- WILLIAMS, R.V. and LARTIGUE, D.J. 1969. Aspartase. In : *Methods in Enzymology* (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. Eds). Academy Press, New York. Vol. XIII, 354-361.
- WILLIAMS, W.A., JONES, M.B. and DELWICHE, C.C. 1977. Clover N-fixation measurement by total N difference and ^{15}N A values in lysimeters. *Agron. J.* 69, 1023-1024.
- WILLIAMSON, J.R. and CORKEY, B.E. 1969. Assays of Intermediates of the Citric Acid Cycle and Related Compounds by Fluorometric Enzyme Methods. In : *Methods in Enzymology* (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. Eds). Academic Press. New York and London. Vol XIII, 434-512.
- WOLLUM, A.G., YOUNGBERG, C.T. and CHICHESTER, F.W. 1968. Relation of previous timber stand nodulation of Ceanothus velutinus. *Forest Science* 14, 114-118.
- WORONIN, M. 1866. Über die bei der Schwarzerle (Alnus glutinosa) und der gewöhnliches Garten-Lupine (Lupinus mutabilis) auftretenden Wurzelanschwellungen. *Mém. Acad. Imp. Sci. St. Pétersbourg* 7, 10, 1-13.

WULFF, K., MECKE, D., HOLZER, H. 1967. Mechanism of the enzymatic inactivation of glutamine synthetase from E. Coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 740-745.

YOSHIDA, A. and FREESE, E. 1970. L-alanine dehydrogenase (Bacillus subtilis). In : Methods in enzymology. Vol. XVIIIA. (Tabor, H. and White-Tabor, C., Eds). Academic Press, London 176-181.

ZHANG ZHONGZE, LOPEZ, M.F. and TORREY, J.G. 1984. A comparison of cultural characteristics and infectivity of Frankia isolates from root nodules of Casuarina species. Plant Soil, 78, 79-90.

R E S U M E

La plupart des pays en voie de développement doivent faire face à deux problèmes majeurs qui sont la déforestation et la surexploitation des sols agricoles. Cet état de fait conduit à une crise énergétique et alimentaire d'une gravité sans précédent. L'utilisation des plantes fixatrices d'azote pourrait constituer un moyen d'enrayer cette crise.

Au même titre que les espèces appartenant à la famille des légumineuses, les plantes actinorhiziennes (plantes en symbiose avec Frankia) sont aptes à jouer un rôle prépondérant dans la production de bois et la régénération des sols dégradés.

En régions tropicales, et sub-tropicales, c'est la famille des Casuarinacées qui forme le groupe le plus important au point de vue économique. Parmi les 82 espèces que compte cette famille, c'est Casuarina equisetifolia qui a été le plus largement introduit hors de son aire de distribution géographique d'origine.

L'implantation de casuarinas sur des sols déficients en azote et dépourvus en Frankia spécifique ayant comme condition sine qua non l'introduction simultanée de leur endophyte, il était nécessaire de disposer d'une source d'endophytes autre que les broyats de nodules. Ceci nous a conduit à étudier, à partir de 1980, la symbiose Frankia-Casuarina equisetifolia. Cette étude a conduit aux résultats suivants :

- Nous avons isolé l'endophyte de Casuarina equisetifolia ;
- Nous avons montré la possibilité d'isoler, des nodules de Casuarina, des souches de Frankia appartenant à

deux types morphologiques bien distincts, ce qui suggère l'existence d'une population mixte de Frankia au sein des nodules de Casuarina ;

- Nous avons démontré l'existence de barrière d'incompatibilité d'hôtes au sein de la famille des Casuarinacées ;

- Nous avons montré que certaines souches de Frankia isolées de Casuarina et non-infectives vis-à-vis de leur plante d'origine, pouvaient noduler certaines Rhamnales. Ceci nous a conduit à proposer l'existence d'un continuum de souches reliant les Frankia typiques des Rhamnales à certains Frankia des Casuarinacées ;

- Nous avons montré que l'endophyte de Casuarina pouvait avoir une existence extra-nodulaire, ce qui renforce les probabilités concernant une vie saprophytique des Frankia dans la rhizosphère et le sol ;

- Nous avons montré que les Frankia de Casuarina et de certaines Rhamnales, n'avaient pas d'exigences nutritionnelles particulières lors de leur culture in vitro ;

- Nous avons démontré que certaines souches de Frankia pouvaient réduire l'acétylène in vitro et croître en utilisant l'azote moléculaire comme source d'azote. Ce qui a ajouté les actinomycètes à la liste, déjà longue, des procaroytes fixateurs d'azote ;

- Nous avons caractérisé dans les extraits bruts de Frankia cultivé in vitro une activité Glutamine synthétase (GS) et montré que l'activité de la GS n'était pas régulée par un système d'adénylation ;

- Nous avons montré que chez les Frankia de Casuarina, la production des vésicules et leur capacité à réduire l'acétylène étaient liés à la nature du composé azoté dont disposait le Frankia pour sa croissance. D'autre part, le fait que la méthionine sulfoximine (MSX) permette la production de vésicules (et leur activité nitrogénasique) en présence de $\text{NH}_4 \text{Cl}$ (1 g^{-1}) chez la souche ORSO20602 (syn. D11) suggère une possible implication de certains enzymes de l'assimilation de l'azote (GS, GOGAT) dans la régulation de la formation et de l'activité nitrogénasique des vésicules chez Frankia ;

- Nous avons montré que la double inoculation Frankia-endomycorhize (Glomus mosseae) permet à Casuarina equisetifolia de croître sur des sols à la fois déficients en azote et en phosphore ;

- Nous avons effectué la première estimation concernant les potentialités fixatrices d'azote de Casuarina inoculé par une souche pure de Frankia. Trois expériences utilisant six méthodes d'estimation de la fixation de l'azote (dont les méthodes isotopiques ^{15}N) nous permettent de penser qu'une plantation de 5 000 casuarinas par hectare fixe entre 21 et 55 kg N_2 hectare⁻¹ an⁻¹ dans la première année suivant la transplantation au champ.

PUBLICATIONS

LISTE DES ARTICLESARTICLE 1.

DIEM, H.G., GAUTHIER, D. and DOMMERGUES, Y.R. 1982. Isolation of Frankia from nodules of Casuarina equisetifolia. Can. J. Microbiol., 28 (5), 526-530.

ARTICLE 2.

DIEM, H.G., GAUTHIER, D., and DOMMERGUES, Y.R., 1983. An effective strain of Frankia from Casuarina sp. Can J. Bot., 61 (11), 2815-2821.

ARTICLE 3.

GAUTHIER, D., DIEM, H.G. and DOMMERGUES, Y.R. 1981. Infectivité et effectivité de souches de Frankia isolées de nodules de Casuarina equisetifolia et d'Hippophaë rhamnoides. C.R. Acad. Sc. Paris, t. 293 (3), 489-491.

ARTICLE 4.

GAUTHIER, D., FRIONI, L., DIEM, H.G. and DOMMERGUES, Y.R. 1984. The Colletia spinosissima-Frankia symbiosis. Oecologia Plantarum. Vol 5 (19) n° 3, p. 231-239.

ARTICLE 5.

DIEM, H.G., GAUTHIER, D. and DOMMERGUES, Y.R. 1982. Extracellular growth of Frankia of Casuarina equisetifolia. FEMS 15, 181-184.

ARTICLE 6.

GAUTHIER, D., DIEM, H.G. and DOMMERGUES, Y.R. 1981. In vitro nitrogen fixation by two actinomycetes strains isolated from

Casuarina nodules. Appl. Environm. Microbiol. ; 41, 306-308.

ARTICLE 7.

GAUTHIER, D. 1983. Effect of L. méthionine D.L. - sulfoximine on acetylene reduction and vesicules formation in derepressed culture of Frankia strain D11. Can. J. Microbiol. 29 (8) 1003-1006.

ARTICLE 8.

GAUTHIER, D., DIEM, H.G., GANRY, F. and DOMMARGUES, Y.R. 1984. Assessment of N₂ fixation by Casuarina equisetifolia inoculated with ORSO21001 using ¹⁵N methods. Soil Biol. Biochem. (sous presse).

ARTICLE 9.

DIEM, H.G., GAUTHIER, D. 1982. Effet de l'infection endomycorhizienne (Glomus mosseae) sur la nodulation et la croissance de Casuarina equisetifolia. C.R. Acad. Sc. Paris, t. 294 (3), 215-218.

ARTICLE 1

Isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina equisetifolia*

H. G. DIEM, D. GAUTHIER, AND Y. R. DOMMERSUES

Laboratoire de Microbiologie du Sol, Office de la Recherche Scientifique et Technique d'Outre-Mer, Centre National de la Recherche Scientifique, BP 1386 Dakar, Sénégal

Accepted February 2, 1982

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

Using the simple serial dilution technique, five strains of actinomycetes were isolated from nodules of *Casuarina equisetifolia*. In spite of the fact that these strains did not nodulate the host plant, they were assumed to belong to the genus *Frankia* because they possessed the morphological and cultural characteristics now admitted as specific to this genus.

DIEM, H. G., D. GAUTHIER et Y. R. DOMMERSUES. 1982. Isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina equisetifolia*. *Can. J. Microbiol.* 28: 526-530.

En utilisant la technique de dilutions successives, on a isolé cinq souches d'actinomycète à partir des nodules de *Casuarina equisetifolia*. Bien que ces souches n'aient pas nodulé la plante-hôte, elles sont considérées comme appartenant au genre *Frankia* puisqu'elles possèdent les caractères morphologiques et culturels propres à ce genre.

Introduction

Recently, strains of *Frankia* have been isolated from nodules of some plants using different methods, namely (1) enzymatic digestion, e.g., *Comptonia peregrina* (Callaham *et al.* 1978), (2) microdissection, e.g., *Alnus rubra* (Berry and Torrey 1979), (3) sucrose-density fractionation, e.g., *Elaeagnus umbellata* and *Alnus crispa* (Baker, Torrey, and Kidd 1979), (4) serial dilution, e.g., *Alnus crispa* (Quispel and Tak 1978; Quispel 1979), (5) Sephadex fractionation, e.g., *Myrica gale* and *Elaeagnus umbellata* (Baker, Kidd, and Torrey 1979), and (6) direct isolation from surface-sterilized pieces of nodules, e.g., *Alnus glutinosa* (Lalonde *et al.* 1981). With the exception of the last two methods isolation procedures were sophisticated and often associated with the use of complex media (e.g., Quispel and Tak 1978). Gauthier *et al.* (1981a) have reported that two *Frankia*-like actinomycetes isolated from nodules of *Casuarina equisetifolia* were able to reduce C₂H₂ *in vitro*. This paper describes in detail the procedures used for isolating *Frankia* strains from nodules of *Casuarina equisetifolia* from different sites throughout the world. Moreover, morphological and cultural characteristics of strains are presented.

Material and methods

Samples of nodules formed on *Casuarina equisetifolia* were taken from seven different locations: Park of Hann, Dakar, Senegal (D); Miami, FL (F); INRA Research Station, Petit-Bourg, Basse Terre, Guadeloupe (G1); INRA Research Station, Saint-François, Grande Terre, Guadeloupe (G2); IRRRI Research Station, Los Baños, Philippines (P1); UPLB (Chemistry Building), Los Baños, Philippines (P4). Nodules were also taken from *Casuarina rumphiana* at Sampalac, Los Baños, Philippines (P2).

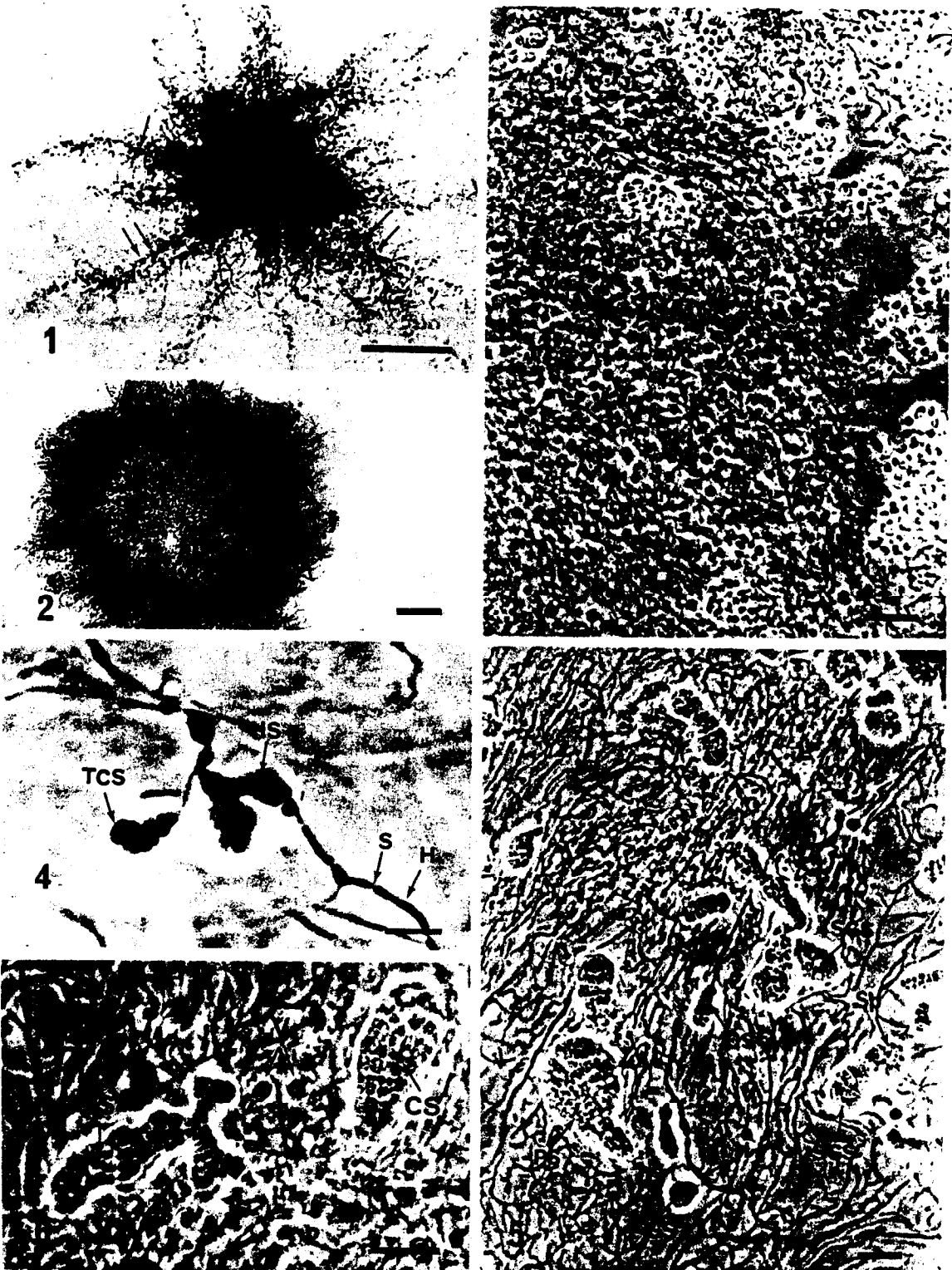
Seedlings of *Casuarina equisetifolia* were grown in test tubes containing a N-free nutrient medium (Vincent 1970) with the shoots free above an aluminium foil cap (Gibson 1963). Plants were grown in a growth chamber maintained at 28°C, light intensity 7000 lx, 14-h photoperiod. When seedlings were 1 month old their roots were inoculated with a suspension of crushed nodules, either freshly collected or stored for 3-6 months in a dry state. Nodulation occurred in both cases within 1-2 months. Nodules 0.5-2 mm in diameter from 3- to 4-month-old seedlings were cleaned thoroughly with tap water and surface sterilized with chloramine T (1% in distilled water) for 5 min and then rinsed several times with sterile distilled water before being aseptically crushed in sterile distilled water. The resulting suspension was diluted to 10⁻², 10⁻³, and 10⁻⁴ with sterile distilled water. The dilutions were then used to inoculate either solid (1.5% agar) or liquid QMOD medium (Lalonde and Calvert 1979). For isolation on agar medium, 0.2 mL of each dilution was first spread onto the surface of the solidified medium in 9-cm-diameter petri dishes. In further experiments, the same amount of each dilution was mixed with approximately 2 mL of the agar medium which was maintained at 40°C and evenly spread by swirling over a bottom layer of the same agar medium. The agar medium has the advantage that bacterial contaminants remain spatially separated from the *Frankia* colonies; moreover, the method of double layers with the inoculum embedded in a thin top layer makes more uniform the growth conditions for *Frankia*. For isolation on liquid medium, fifty to one hundred 15-mL screw-capped vials, each containing 5 mL of medium, were inoculated with one drop of 10⁻³ or 10⁻⁴ dilution. After inoculation, plates and vials were incubated at 28-30°C.

For light microscopy observations, colonies of *Frankia* from cultures in liquid or solid QMOD medium were stained with 1% (w/v) trypan blue in lactophenol.

Casuarina equisetifolia seedlings used for the infection tests were grown either in plastic pouches (Lalonde 1979), tubes, or Leonard jars (Vincent 1970) containing a sterile mixture of

0008-4166/82/050526-05\$01.00/0

©1982 National Research Council of Canada/Conseil national de recherches du Canada



vermiculite and sand (1:1, v/v) supplied with N-free Hoagland's solution (Hoagland and Arnon 1938). When the seedlings were 5 weeks old, they were inoculated with a suspension of washed, homogenized hyphae and spores from 4- to 6-week-old broth cultures. One to 3 months later, the root systems were periodically examined for the presence of nodules.

Results

Isolation on solid QMOD medium

After 10–15 days, the plates were carefully scanned under a dissecting microscope to detect the presence of *Frankia* colonies. At that time, the colonies were 100–200 μm in diameter, exhibiting a typical starfish shape (Fig. 1). If the nodules used for the dilution contained units able to form *Frankia* colonies on the medium (UFF), these colonies could be observed among a number of contaminant colonies, predominantly bacteria. The number of colonies of *Frankia* appearing in plates inoculated with 10^{-3} dilution was in the range of 1–20 per plate. Comparing the suspensions obtained from six different nodule lobes, only four lobes produced colonies of *Frankia* on the plates, suggesting a heterogeneous distribution of UFF in the nodules.

Isolation in QMOD liquid medium

After 4–6 weeks the 15-mL vials were examined for the presence of *Frankia* colonies. In most vials (80–90%) inoculated with 10^{-3} or 10^{-4} dilution, contaminants developed, making the medium turbid. These vials were discarded. In the other vials (10–20%) the medium remained clear, either devoid of any microbial growth or containing one or a few fluffy, chalk-white colonies. These colonies were usually located at the bottom of the vials and often adhering to the glass wall. Microscopic observations indicated that all the colonies exhibiting these features were *Frankia*.

Out of nodule samples corresponding to the seven sites mentioned above, *Frankia* colonies were obtained from four sites only: one site in Senegal (strains D1 and D11), two sites in Guadeloupe (strains G1 and G2), and one site in the Philippines (strain P1). Strains D1, D11, and G2 were obtained using liquid and solid QMOD media; strains G1 and P1 were obtained using the double-layer technique with the solid medium.

Morphology of the colonies

Most of the characteristics hereafter reported are related to strain D1; characteristics of other strains appeared to be similar except for the production of pigment, which varied greatly. Diameter of colonies of *Frankia* growing on the surface of QMOD solid medium increased linearly with time, reaching approximately 500 μm in 33 days. These colonies exhibited a central conical protuberance composed primarily of hyphae, sporangia, and vesicles embedded in mucilage. The

outer region of young colonies was occupied by septate hyphae growing radially with a few sporangia and vesicles (Fig. 1). Since sporangia were more abundant at the center of the colonies, it was assumed that their initiation started from the center. Pigment was produced which precipitated as blood-red crystals.

Colonies growing in QMOD liquid medium were ellipsoidal, 0.5–1.0 mm in diameter, and 0.2 mm thick when 3 weeks old. Their inner parts were mucilaginous like the colonies growing in solid medium. Similarly, growing hyphae were located at the periphery of the colony (Fig. 2). When grown in liquid medium, *Frankia* did not cause turbidity, since the colonies remained undisturbed even when shaken. Furthermore, single colonies often flocked together forming clusters of one-layer colonies. After 6–7 weeks of incubation, the growth of peripheral hyphae stopped so that the whole colony was occupied by a mass of sporangia, vesicles, and lysing hyphae (Fig. 3). Trypan blue in lactophenol stained only the peripheral hyphae, whereas the central part of the colony remained colored by its own red pigment (not shown).

Hyphae, sporangia, and vesicles

Young hyphae were typically branching, septate with a diameter approximately 0.4–0.9 μm . When older, hyphae could be up to 1.5–2.0 μm wide. Sporangia generally developed at the end of the hyphae but also in intercalary positions within hyphal filaments (Fig. 4). They were of many different sizes and shapes. Usually, terminally positioned sporangia were pear and club shaped but they could also be globose or subglobose, elongated, or exceedingly irregular (Figs. 5, 6, and 7). Club-shaped sporangia were 6–19 μm and globose ones were 13–19 μm , but sometimes much larger (up to 35 μm long) sporangia were found (Fig. 9). Spores (1.3–1.9 μm) were usually polyhedral, but were also irregular in form. They were easily released from mature sporangia (Fig. 9). Spore germination has not yet been observed in solid QMOD medium. Spherical vesicles (2.6 μm in diameter) were always formed terminally on short parental hyphae branching from hyphal strands (Fig. 8). Vesicles often remained attached to the parental hyphae even when lysis occurred (Fig. 3).

Infection tests with *Casuarina equisetifolia*

Despite repeated inoculation experiments, the formation of typical root nodules was never obtained with any of the tested strains.

Discussion

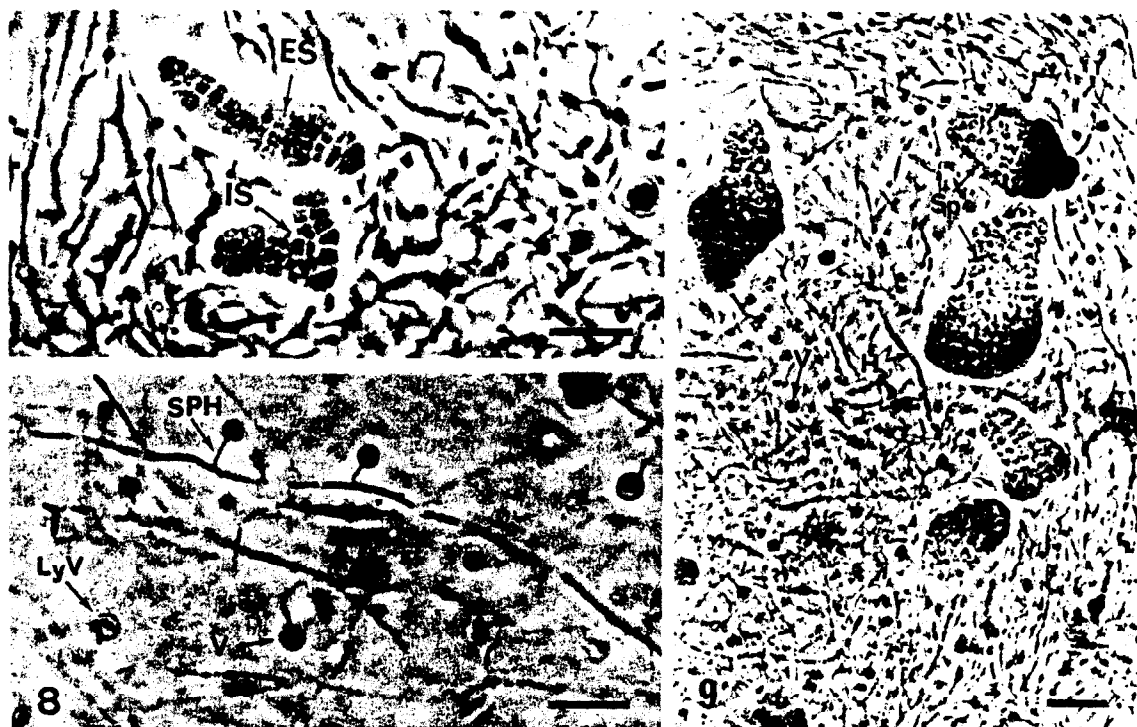
All the strains isolated from nodules of *Casuarina equisetifolia* possessed the morphological characteristics now admitted as specific to the genus *Frankia*: prokaryotic septate hyphae, polymorphic sporangia

nodule-forming capacity. The morphological and cultural characteristics described in this paper in addition to the ability to reduce C_2H_2 *in vitro* observed in two strains, D11 and G2 (Gauthier *et al.* 1981a), support the fact that actinomycetes isolated in this work are true members of the genus *Frankia*. The question remains whether these strains of *Frankia* can be considered as endophytes of *Casuarina equisetifolia*. Since during the isolation experiments we did not handle any N_2 -fixing nonlegume other than *Casuarina equisetifolia* or any exogenous *Frankia* strains, we assume that the strains described in the present paper are derived from *Casuarina equisetifolia* nodules. Further experiments reported elsewhere (Gauthier *et al.* 1981b) showed that strains D11 and G2 were able to nodulate *Hippophaë rhamnoides*, suggesting that they had lost their ability to infect *Casuarina equisetifolia*, but could still infect *Hippophaë rhamnoides*. This modification of the infective characteristics of strains D11 and G2 was attributed to alterations occurring during isolation and cultural procedures, an hypothesis reminiscent of that proposed by Burggraaf *et al.* (1981) for some *Frankia* strains isolated from *Alnus*.

Acknowledgments

This investigation was supported in part by grant DFR/1216/FG-LAT-R9 from Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique, Paris. We acknowledge Marc Boureau for the photographs.

- BAKER, D., G. H. KIDD, and J. G. TORREY. 1979. Separation of actinomycete nodule endophytes from crushed nodule suspensions by Sephadex fractionation. *Bot. Gaz. (Chicago)*, 140 (Suppl.), S49-S51.
- BAKER, D., J. G. TORREY, and G. H. KIDD. 1979. Isolation by sucrose-density fractionation and cultivation *in vitro* of actinomycetes from nitrogen-fixing root nodules. *Nature (London)*, 281: 76-78.
- BERRY, A., and J. G. TORREY. 1979. Isolation and characterization *in vivo* and *in vitro* of an actinomycetous endophyte from *Alnus rubra* Bong. In *Symbiotic nitrogen fixation in management of temperate forests*. Edited by J. C. Gordon, C. T. Wheeler, and D. A. Perry. Oregon State University, Corvallis, OR. pp. 69-83.
- BURGGRAAF, A. J. P., A. QUISPÉL, T. TAK, and J. VALSTAR. 1981. Methods of isolation and cultivation of *Frankia* species from actinorrhizas. *Plant Soil*, 61: 157-168.
- CALLAHAM, D., P. DEL TREDICI, and J. G. TORREY. 1978. Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. *Science (Washington, D.C.)*, 199: 899-902.
- GAUTHIER, D., H. G. DIEM, and Y. DOMMERGUES. 1981a. *In vitro* nitrogen fixation by two actinomycete strains isolated from *Casuarina* nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 306-308.
- . 1981b. Infectivité et effectivité de souches de *Frankia* isolées de nodules de *Casuarina equisetifolia* et d'*Hippophaë rhamnoides*. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 293: 489-491.
- GIBSON, A. H. 1963. Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. I. The effect of root temperature on recently nodulated *Trifolium subterraneum* L. plants. *Aust. J. Biol. Sci.* 16: 28-42.
- HOAGLAND, D. R., and D. I. ARNON. 1938. The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stn. Circ.* 347.
- LALONDE, M. 1979. Techniques and observations of the nitrogen fixing *Alnus* root nodule symbiosis. In *Recent advances in biological nitrogen fixation*. Edited by N. S. Subba Rao. Oxford IBH Publishing Co., New Delhi. pp. 421-434.
- LALONDE, M., and H. E. CALVERT. 1979. Production of *Frankia* hyphae and spores as an infective inoculant for *Alnus* species. In *Symbiotic nitrogen fixation in management of temperate forests*. Edited by J. C. Gordon, C. T. Wheeler, and D. A. Perry. Oregon State University, Corvallis, OR. pp. 95-110.
- LALONDE, M., H. E. CALVERT, and S. PINE. 1981. Isolation and use of *Frankia* strains in actinorrhizae formation. In *Current perspectives in nitrogen fixation*. Edited by A. H. Gibson and W. E. Newton. Australian Academy of Science, Canberra. pp. 296-299.
- LECHEVALIER, M. P., and H. A. LECHEVALIER. 1979. The taxonomic position of the actinomycetic endophytes. In *Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests*. Edited by J. C. Gordon, C. T. Wheeler, and D. A. Perry. Oregon State University, Corvallis, OR. pp. 111-122.
- QUISPÉL, A. 1979. Growth and infectivity of the endophyte of *Alnus glutinosa*. In *Symbiotic nitrogen fixation in management of temperate forests*. Edited by I. C. Gordon, C. T. Wheeler, and D. A. Perry. Oregon State University, Corvallis, OR. pp. 57-68.
- QUISPÉL, A., and T. TAK. 1978. Studies on the growth of the endophyte of *Alnus glutinosa* (L.) Vill. in nutrient solutions. *New Phytol.* 81: 587-600.
- TJEPKEMA, J. D., W. ORMEROD, and J. G. TORREY. 1980. Vesicle formation and acetylene reduction in *Frankia* sp. CPI1 cultured in defined media. *Nature (London)*, 287: 633-635.
- TORREY, J. G., D. BAKER, D. CALLAHAM, P. DEL TREDICI, W. NEWCOMB, R. L. PETERSON, and J. D. TJEPKEMA. 1980. On the nature of the endophyte causing root nodulation in *Comptonia*. In *Nitrogen fixation*. Vol. II. Edited by W. E. Newton and W. H. Orme-Johnson. University Park Press, Baltimore, MD. pp. 217-227.
- VINCENT, J. M. 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP Handbook No. 15, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh.



FIGS. 7–9. Morphological characteristics of *Frankia* strain D1 isolated from nodules of *Casuarina equisetifolia* and stained with trypan blue. Fig. 7. Elongated (ES) and irregularly formed (IS) sporangia. Bar = 10 μ m. Fig. 8. Septate vesicle (V) formed in a 25-day-old colony grown in solid QMOD medium, with short parental hyphae (SPH) and lysing vesicle (LYV). Bar = 10 μ m. Fig. 9. Large sporangia with mature spores (Sp). Vesicle (V) and hyphae (H) formed in a 21-day-old colony grown in liquid QMOD medium. Bar = 10 μ m.

producing polyhedral spores, and septate vesicles. According to Torrey *et al.* (1980), these typical structures were described by Pommer for the first time. Strains isolated from other host plants (Callaham *et al.* 1978; Baker, Torrey, and Kidd 1979; Berry and Torrey 1979; Quispel 1979; Lalonde *et al.* 1981) always exhibited hyphae and sporangia but vesicles appeared only on some of the media used, namely QMOD medium and the N-free medium used by Tjepkema *et al.* (1980).

Strains described in this paper produced pigment(s) and mucilage. Production of pigment by an *Elaeagnus* isolate was reported by Baker, Torrey, and Kidd (1979).

In contrast with this pigment, the pigment produced by our strains did not diffuse in the medium, but sometimes precipitated as microcrystals. The production of mucilage was also observed by Berry and Torrey (1979) in strains from *Alnus rubra*.

Since *Frankia* cultures from nodules of *Casuarina equisetifolia* were unable to nodulate the host plant, they theoretically could not be considered as endophytes from this plant species according to the requirements of Koch's postulate. However, Lechevalier and Lechevalier (1979) considered as members of the genus *Frankia* free-living actinomycetes producing vesicles and spore-containing sporangia even if they had no known

FIGS. 1–6. Morphological characteristics of *Frankia* strain D1 isolated from nodules of *Casuarina equisetifolia* and stained with trypan blue. Fig. 1. Starfishlike colony (25 days old) grown on solid QMOD medium. Sporangia on branching and radial hyphae (arrow). Bar = 50 μ m. Fig. 2. Ellipsoidal 21-day-old colony grown in liquid QMOD medium. Peripheral actively growing hyphae are well stained, whereas the centre of the colony is only slightly stained. Bar = 100 μ m. Fig. 3. Centre of a 49-day-old colony grown in liquid QMOD medium, with aggregates of mature spores (Sp), vesicles with short parental hyphae (V), and lysing hyphae (LYH). Bar = 25 μ m. Fig. 4. Intercalary sporangia (IS), terminal club-shaped sporangia (TCS), septa (S), and hypha (H). Bar = 10 μ m. Fig. 5. Club-shaped (CS), pear-shaped (PS), globose (GS), and subglobose (SGS) sporangia and released mature spores (Sp), vesicle (V), and large hypha (LH). Bar = 10 μ m. Fig. 6. Irregularly formed (IS) and usually club-shaped (CS) sporangia and vesicle (V). Bar = 10 μ m.

ARTICLE 2

An effective strain of *Frankia* from *Casuarina* sp.

H. G. DIEM, D. GAUTHIER, AND Y. DOMMERMUES

Centre National de la Recherche Scientifique, Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer,
B.P. 1386, Dakar, Senegal

Received December 1, 1982

DIEM., H. G., D. GAUTHIER, and Y. DOMMERMUES. 1983. An effective strain of *Frankia* from *Casuarina* sp. *Can. J. Bot.* 61: 2815–2821.

A strain of *Frankia*, designated Cj1-82, from root nodules of a hybrid of *Casuarina junghuhniana* and *C. equisetifolia* has been isolated in pure culture. When grown under standard culture conditions, Cj1-82 exhibited the following characteristics: cushionlike colonies with short, wide hyphae and, in addition to typical sporangia, intercalary elongated sporangialike structures (SLS) which could be disrupted into sporelike units. No vesicles were found. When inoculated into the rhizosphere of *C. equisetifolia*, Cj1-82 produced vesicles. Reinfection of seedlings of *C. equisetifolia* was achieved repeatedly with inocula prepared from a suspension of Cj1-82. Sequences of infection of root hairs were described. Fourteen days after inoculation, nodules were apparent on the roots. Nodules were shown to be effective in nitrogen fixation as assessed by the acetylene-reduction technique.

DIEM., H. G., D. GAUTHIER et Y. DOMMERMUES. 1983. An effective strain of *Frankia* from *Casuarina* sp. *Can. J. Bot.* 61: 2815–2821.

Une souche de *Frankia*, Cj1-82, a été isolée à partir d'un hybride de *Casuarina junghuhniana* et *C. equisetifolia*. En culture pure, Cj1-82 présente des caractéristiques suivantes: colonies en forme de coussin avec des hyphes courtes et larges, et, une plus des sporanges typiques, des structures intercalaires et allongées (SLS) ressemblant à des sporanges, structures pouvant se fragmenter en des unités semblables à des spores; pas de vésicules. Dans la rhizosphère de *C. equisetifolia* Cj1-82 produit des vésicules. La réinfection des plantules de *C. equisetifolia* a été obtenue avec une suspension de Cj1-82 utilisée comme inoculum. Les différentes séquences de l'infection des poils absorbants des racines sont décrites. Les nodules sont visibles sur les racines quatorze jours après l'inoculation. Soumis au test de la réduction d'acétylène, ces nodules se montrent capables de fixer l'azote.

During the last 2 years, we have isolated five strains of *Frankia* from nodules formed on seedlings of *Casuarina equisetifolia* inoculated with crushed nodules sampled from various parts of the world (Diem *et al.* 1982a). These strains, which exhibited the morphological features of the genus *Frankia* and fixed nitrogen *in vitro* (Gauthier *et al.* 1981), were nevertheless unable to nodulate the host plant. Recently we reported the isolation of an effective strain (Cj1-82) briefly described by Diem *et al.* (1982). In this paper, we present complementary data on the morphology and the infecting ability of this strain.

Material and methods

Strain Cj1-82 was isolated from nodules collected directly from a 1-year-old seedling of *Casuarina* grown in the nursery of the Thai Forest Service in Bangkok. According to Johnson and Briggs (1962), the tree is a hybrid of *C. junghuhniana* and *C. equisetifolia*.

Isolation procedure and cultivation

Cj1-82 was isolated according to the slightly modified method of Lalonde and co-workers as described elsewhere in this symposium (Diem and Dommergues 1983). Cj1-82 was then subcultured in Qmod (Lalonde and Calvert 1979) solid and liquid medium at 28–30°C without shaking.

Plant infection tests

Seedling cultivation in petri dishes

Seedlings of *C. equisetifolia* (6–8 weeks old) were placed in

plastic petri dishes (9 cm diameter), with the roots lying horizontally on the bottom and the stem introduced through the hole pierced in a piece of plastic stuck to the rim of the dish (Fig. 1). The lid, painted black, had a slot near the rim to let out the aerial parts of the seedling. Roots were immersed in 30 mL of 0.1-strength nitrogenfree Crone nutrient solution (Lalonde 1979) in which $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ was replaced by Fe EDTA (4 mg/L). The nutrient solution was renewed every week and, when necessary, distilled water was added to compensate for evaporation. Two weeks after the transfer of seedlings to the petri dishes, roots were inoculated by adding a few drops of a dense suspension of *Frankia* Cj1-82. This inoculum had been obtained by gently crushing ca. 10 colonies of *Frankia* Cj1-82 picked up from a solid Qmod medium (Lalonde and Calvert 1979) in 2 mL of sterile distilled water. Inoculation was also performed by placing colony fragments directly on young root hairs.

The petri dishes with inoculated (20) and noninoculated (10) seedlings were then placed in a controlled-environment chamber (day (16 h light) : night (8 h dark); day temperature (28°C) : night temperature (20°C)). By 7–10 days after inoculation, deformed root hairs with attached inoculum were stained with trypan blue in lactophenol (0.1%) for microscopic observation. Two to 3 weeks after inoculation, the petri dishes were placed under a dissecting microscope so that initiation of nodules could be observed.

Seedling cultivation in tubes

One-week-old seedlings of *C. equisetifolia* were transferred into test tubes, permitting the shoot to grow outside (Gibson 1963). The agar slant contained 0.25-strength nitrogen-free

Hoagland solution according to Knowlton *et al.* (1980) supplemented with (in grams per litre) activated charcoal Merck ref. 2186, 20 g; CaCO₃, 1 g; agar, 16 g. The tubes were replenished up to 5 mm from the top with $\frac{1}{8}$ -strength Hoagland solution with nitrogen (NH₄SO₄, 0.017 g/L). When the plants were 3–5 weeks old, the Hoagland solution ($\frac{1}{8}$ strength) with nitrogen was replaced by the same solution without nitrogen. Inoculation was performed by adding to each tube a few drops of a suspension of Cj1-82 homogenate in distilled water. The culture of Cj1-82 used for inoculation was obtained on Qmod liquid medium. Twelve inoculated tubes and 12 noninoculated tubes were then placed in a controlled-environment chamber as described above.

Assessment of acetylene-reduction activity

Three weeks after the appearance of the nodules, acetylene-reduction activity was assessed as usual (Hardy *et al.* 1968).

Results and discussion

Morphological and cultural characteristics of strain Cj1-82 grown in pure culture

After growth for 1 month on agar Qmod medium (with or without lecithin), Cj1-82 formed compact cushionlike 0.1- to 0.4-mm-diameter colonies that appeared to be embedded in mucilaginous material. Only hyphae located in the outermost periphery of the colonies could be stained with trypan blue solution (Fig. 2). Hyphae were short and wide (1–1.5 μ m) with many septations, and they frequently developed into intercalary elongated sporangialike structures (SLS, Fig. 3). SLS probably resulted from the enlargement of the hyphae followed by the formation of transverse or oblique septa. When mature, SLS were globose or subglobose in certain areas (Fig. 3); most were arranged in elongated torulose chains of cells. In contrast with sporangia of *Frankia* from *Casuarina* described earlier (Diem *et al.* 1982a), SLS did not break out easily but disrupted only under pressure into single or groups of unicellular sporelike units the shape and size of which differed from that of typical *Frankia* spores (Fig. 5).

Subcultures of Cj1-82 in solid Qmod and liquid medium sometimes contained diffuse colonies characterized by a dense center containing old hyphae, mature SLS, and a fluffy periphery with flexuous and fine hyphae (ca. 0.5 μ m diameter) bearing numerous typical spore-producing *Frankia* sporangia (Fig. 4).

Occasionally, club-shaped sporangia were arranged in helicoid chains (Fig. 6). Spores produced by typical sporangia were similar in shape and size to those produced by other strains of *Frankia* from *C. equisetifolia* (Diem *et al.* 1982a).

The cause of such a pleomorphism in the colony morphology is unclear. Quispel and Burggraaf (1981) explained the variation in the growth pattern of *Frankia* from *Alnus glutinosa* as resulting from "selection among multi-strain cultures, mutation or by phenotypic adaptation."

In contrast with other *Frankia* strains from *C. equisetifolia* (Diem *et al.* 1982a), Cj1-82 did not produce pigment, nor did it form vesicles in Qmod solid or liquid medium, which probably explains its inability to fix N₂ *ex planta* and to grow in nitrogenfree media. Growth rate of Cj1-82 was very low in Qmod medium with or without lecithin (generation time, 3–5 days). Heavy inoculum was always required to start the subcultures, which suggests that some specific nutrient was lacking in the media used or that only a limited number of components of the inoculum were able to form new *Frankia* colonies. This finding supports the concept of units able to form *Frankia* colonies (UFF) developed elsewhere (Diem and Dommergues 1983).

Observations of strain Cj1-82 in the rhizosphere of *C. equisetifolia*

In some cases, hyphae and SLS of Cj1-82 were replaced by granulelike cells (Fig. 7) which differed obviously from the typical spores observed *in vitro* or the structures observed and designated as granules by Van Dijk and Merkus (1976) within the nodules of *Alnus glutinosa*. Actually little is known about these granulelike cells, especially the time and the cause leading to their formation.

In contrast with its behavior in pure culture, Cj1-82 formed vesicles in the rhizosphere (Fig. 8). The vesicles were similar to those formed *in vitro* by other *Frankia* strains (Tjepkema *et al.* 1980; Diem *et al.* 1982a) and to those formed by *Frankia* growing in the vicinity of nodules of *C. equisetifolia* (Diem *et al.* 1982b). Since *Frankia* reputedly does not form typical vesicles within *Casuarina* nodules (Tyson and Silver 1979), the production of typical vesicles by Cj1-82 and by extranodular growing *Frankia* (Diem *et al.* 1982b) in the rhizosphere suggests that the behavior of *Frankia* from *Casuarina* varies widely according to its habitat inside or outside the nodule.

Infectivity and effectivity of strain Cj1-82

Infection tests of *C. equisetifolia* seedlings grown in petri dishes showed that 80% of the plants bearing young root hairs on their lateral roots at the time of inoculation formed one to four nodules visible at 14–21 days. Plants having no young root hairs did not nodulate, which indicated that the presence of receptive root hairs is a prerequisite for nodulation. This confirms observations on the infection of *Alnus* reported by Pizelle (1972). Infection tests performed on seedlings grown in tubes showed that 100% of inoculated plants formed nodules (10–20 nodules per plant) within 3 weeks (Fig. 15); noninoculated controls never nodulated in either assembly.

Using nodules obtained from seedlings grown in petri dishes, we reisolated strain Cj1-82 within 3 weeks on the double-layer Qmod (without lecithin) solid medium as



FIG. 1. Petri-dish assembly for seedling cultivation; 4-week-old seedlings. FIG. 2. Partial view of a cushionlike colony of *Frankia* Cj1-82 on agar Qmod medium; short peripheral hyphae are stained by trypan blue; the mucilaginous central part of the colony is not stained. Bar = 50 μm . FIG. 3. Cj1-82 on agar Qmod medium showing numerous intercalary elongated and globose or subglobose (arrows) sporangialike structures (SLS). Bar = 10 μm . FIG. 4. Filamentous colony of Cj1-82 bearing large typical sporangia (arrows) on agar Qmod medium. Bar = 30 μm . Inset: a typical spore-producing sporangium formed on peripheral hyphae. Bar = 10 μm .

described by Diem and Dommergues (1983). The recovered organism exhibited all the morphological characteristics of the original strain Cj1-82.

Acetylene-reduction activity exhibited by 3-week-old nodules was 10.8 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ per gram (fresh weight) per hour, indicating Cj1-82 was effective.

Preliminary steps of nodulation

Most observations were performed on roots of inoculated seedlings grown in petri dishes. Root hair deformation occurred 24–48 h after inoculation (Fig. 9). When the inoculum was a fragment of *Frankia* colony, root hairs converged towards this fragment, entrapping

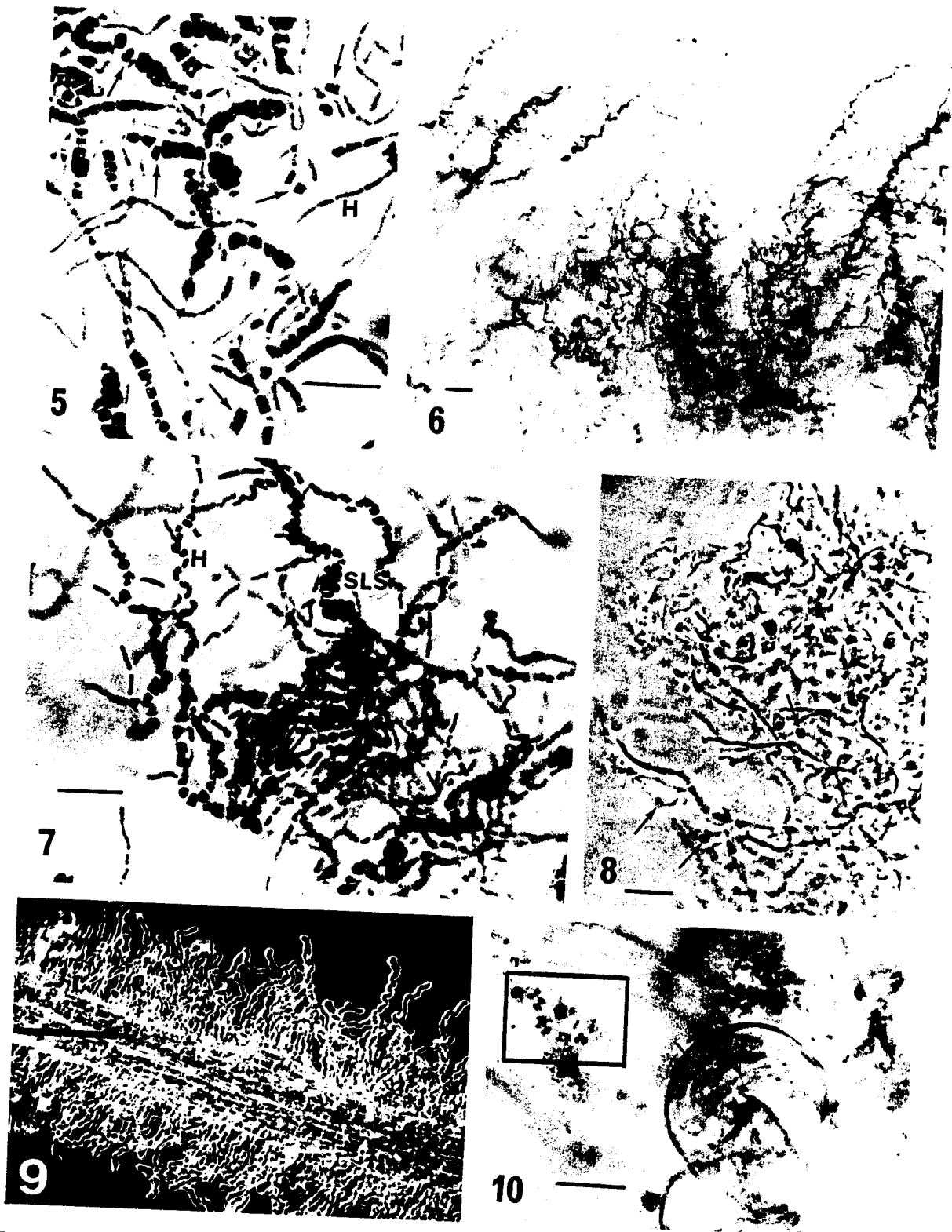


FIG. 5. SLS disrupted into sporelike units (arrows); short septate hyphae (H). Bar = 10 μ m. FIG. 6. Helicoidal chains of club-shaped sporangia formed in some filamentous colonies of Cj1-82 on agar Qmod medium. Bar = 10 μ m. FIG. 7. Hyphae (H) and SLS fragmented into granulelike cells in the rhizosphere of *C. equisetifolia* seedlings. Bar = 10 μ m. FIG. 8. Vesicles

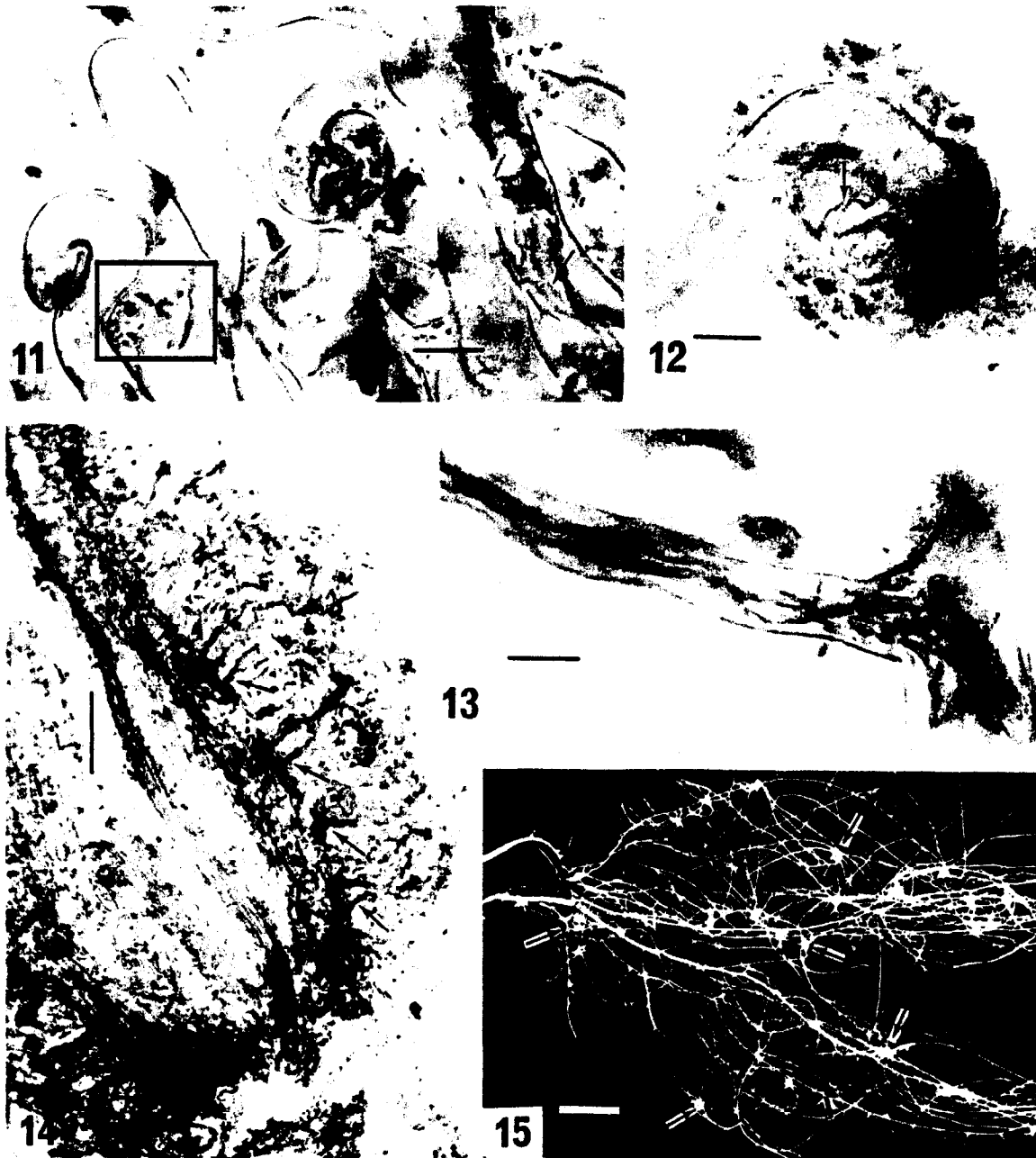


FIG. 11. Curling of root tips after inoculation; note the presence of granulelike cells (outlined area) and infection hyphae within a root hair (arrow). Bar = 10 μ m. FIG. 12. Curled root hair tip showing convoluted material (arrow). Bar = 10 μ m. FIG. 13. A root hair with several branched infection hyphae progressing towards its base. Bar = 10 μ m. FIG. 14. Multiple infections occurring at the base of a lateral root of *C. equisetifolia*; only infected root hairs are stained by trypan blue (arrows). Bar = 100 μ m. FIG. 15. *Casuarina equisetifolia* seedling root system from tube culture 6 weeks after inoculation with a suspension of Cj1-82; nodules (arrows). Bar = 1 cm.

(arrows) formed by Cj1-82 in the rhizosphere of *C. equisetifolia* seedlings. Bar = 10 μ m. FIG. 9. Deformed root hairs of *C. equisetifolia* 48 h after inoculation with Cj1-82. Bar = 150 μ m. FIG. 10. Curled root hair tip with initiating infection hyphae (arrows) within the curled area; granulelike cells from Cj1-82 (outlined area). Bar = 10 μ m.

it, suggesting the involvement of an unknown attraction process. Later, the tips of some root hairs began to exhibit the curling that typically occurs prior to infection (Fig. 11), which always starts from the curled area. Preliminary observations with the light microscope did not allow us to determine the actual process by which Cj1-82 penetrated the root hairs; but since granulelike cells were detected in the vicinity of the curled root hairs (Figs. 10, 11, 12), we assumed that infection usually initiated by hyphae might be initiated also by the granulelike cells after they were enclosed in the fold of the root hair tips. This assumption is reminiscent of the theory that bacteriallike cells are responsible for the infection of actinorhizal plants (Lalonde and Quispel 1977).

We have already mentioned that infection occurred in root zones bearing young and still-elongating root hairs. Only root hairs in that stage were able to curl and consequently provide *Frankia* with a niche allowing its penetration. These observations are in accordance with the principles governing the root hair curling and subsequent infection in legumes, as proposed by Bauer (1981) and Hubbell (1981).

By 7–10 days after inoculation, infection hyphae could be seen, originating from the fold enclosure (Fig. 10). In this area, convoluted hair wall material accumulated (Fig. 12), as reported by Callaham *et al.* (1979) for *Myrica gale* and *Comptonia*. Each root hair contained up to four infection hyphae (Fig. 13). The hyphae, encapsulated and often branched, progressed towards the base of the hair, then invaded the root cortical cells as described by Kant and Narayana (1977) and Callaham *et al.* (1979). The hyphae located in the root hairs or crossing, often in bundles, the wall between two infected nodule cells were encapsulated in a sheath apparently thicker than that of the hyphae coiled inside the nodule cells.

Ten days after root hair deformation, the infected root zone swelled as a result of the proliferation and hypertrophy of root cortical cells. Single infection was sufficient to initiate a nodule, but generally several root hair infections occurred leading to a single root nodule (Fig. 14). Nodulation was initiated not only at the base of lateral roots but also on main roots that had young root hairs. Nodulation on the main root was responsible for the deviation of the root axis.

Acknowledgments

This work was partly supported by Délégation Générale à la Recherche Scientifique (grant LAT/OG2). We thank Dr. P. Chittachumnonk for supplying us with the seedlings of the Thai *Casuarina* and M. Boureau for the photographs.

- BAUER, W. D. 1981. Infection of legumes by *Rhizobia*. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 407–449.
- CALLAHAM, D., W. NEWCOMB, J. G. TORREY, and R. L. PETERSON. 1979. Root hair infection in actinomycete-induced root nodule initiation in *Casuarina*, *Myrica*, and *Comptonia*. *Bot. Gaz. (Chicago)*, 140: S51–S59.
- DIEM, H. G., and Y. R. DOMMERGUES. 1983. The isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina*. *Can. J. Bot.* 61. This issue.
- DIEM, H. G., D. GAUTHIER, and Y. R. DOMMERGUES. 1982a. Isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina equisetifolia*. *Can. J. Microbiol.* 28: 526–530.
- . 1982b. Extranodular growth of *Frankia* on *Casuarina equisetifolia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 15: 181–184.
- . 1983. Isolement et culture *in vitro* d'une souche infective et effective de *Frankia* isolée de nodules de *Casuarina* sp. *C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. Paris. Sér. C*, 295: 759–763.
- GAUTHIER, D., H. G. DIEM, and Y. R. DOMMERGUES. 1981. *In vitro* nitrogen fixation by two actinomycete strains isolated from *Casuarina* nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 306–308.
- GIBSON, A. H. 1963. Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. I. The effect of root temperature on recently nodulated *Trifolium subterraneum* L. plants. *Aust. J. Biol. Sci.* 16: 28–42.
- HARDY, R. W. F., R. D. HOLSTEN, E. K. JACKSON, and R. C. BURNS. 1968. The acetylene–ethylene assay for N_2 fixation; laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43: 1185–1207.
- HUBBELL, D. H. 1981. Legume infection by *Rhizobium*: a conceptual approach. *BioScience*, 31: 832–836.
- JOHNSON, L. A. S., and B. G. BRIGGS. 1962. Evolution in the Proteaceae. *Aust. J. Bot.* 11: 21–61.
- KANT, S., and H. S. NARAYANA. 1977. Preliminary studies on the development and structure of root nodules in *Casuarina equisetifolia* L. *Proc. Indian Acad. Sci. Sect. B*, 85: 34–41.
- KNOWLTON, S., A. BERRY, and J. G. TORREY. 1980. Evidence that associated soil bacteria may influence root hair infection of actinorhizal plants by *Frankia*. *Can. J. Microbiol.* 26: 971–977.
- LALONDE, M. 1979. Techniques and observations of the nitrogen fixing *Alnus* root nodule symbiosis. In *Recent advances in biological nitrogen fixation*. Edited by N. S. Subba Rao. Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi: pp. 421–434.
- LALONDE, M., and H. E. CALVERT. 1979. Production of *Frankia* hyphae and spores as an infective inoculant for *Alnus* species. In *Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests*. Edited by J. C. Gordon, C. T. Wheeler, and D. A. Perry. Oregon State University, Corvallis, OR. pp. 95–110.
- LALONDE, M., and A. QUISPTEL. 1977. Ultrastructural and immunological demonstration of the nodulation of the European *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. host plant by the North-American *Alnus crispa* var. *mollis* Fern. root nodule endophyte. *Can. J. Microbiol.* 23: 1529–1547.
- PIZELLE, G. 1972. Observations sur les racines de plantules

- d'Aulne glutineux, *Alnus glutinosa* Gaertn., en voie de nodulation. *Bull. Soc. Bot. Fr.* **119**: 571-580.
- QUISPEL, A., and J. P. BURGGRAAF. 1981. *Frankia*, the diazotrophic endophyte from actinorhiza's. In *Current perspectives in nitrogen fixation*. Edited by A. H. Gibson and W. E. Newton. Australian Academy of Science, Canberra. pp. 229-236.
- TJEPKEMA, J. D., W. ORMEROD, and J. G. TORREY. 1980. On vesicle formation and *in vitro* acetylene-reduction by *Frankia*. *Nature (London)*, **287**: 633-635.
- TYSON, J. H., and W. S. SILVER. 1979. Relation of ultrastructure to acetylene reduction (N_2 fixation) in root nodules of *Casuarina*. *Bot. Gaz. (Chicago)*, **140**: S544-S548.
- VAN DIJK, C., and E. MERKUS. 1976. A microscopical study of the development of a spore-like stage in the life cycle of the root-nodule endophyte of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *New Phytol.* **77**: 73-91.

The isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina*

H. G. DIEM AND Y. DOMMERGUES

Centre National de la Recherche Scientifique, Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer,
B.P. 1386, Dakar, Senegal

Received December 1, 1982

DIEM, H. G., and Y. DOMMERGUES. 1983. The isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina*. *Can. J. Bot.* **61**: 2822–2825.
Attempting to isolate *Frankia* from *Casuarina*, we found that this endophyte exhibited two unexpected characteristics: (i) an inability of most infected nodule cells to produce *Frankia* colonies; and (ii) the absence of specific nutritional requirements in the isolation medium. These findings led us to the formulation of some principles for isolating *Frankia* from *Casuarina*.

DIEM, H. G., et Y. DOMMERGUES. 1983. The isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina*. *Can. J. Bot.* **61**: 2822–2825.
Au cours des essais d'isolement de *Frankia* à partir de *Casuarina*, nous avons trouvé que cet endophyte présentait deux caractéristiques inattendues: (i) inaptitude de la plupart des cellules infectées du nodule à produire des colonies; et (ii) absence d'exigences nutritionnelles particulières dans le milieu d'isolement. Ces résultats nous ont conduit à formuler quelques principes pour l'isolement de *Frankia* à partir de *Casuarina*.

Though the earliest attempts to isolate the actinomycetous endophyte from *Casuarina* nodules began at the turn of the century (see Torrey 1983), these efforts have failed up to the present time. This fact is surprising, because an increasing number of *Frankia* strains have been isolated from many genera of N₂-fixing non-legumes (see Baker and Torrey 1979; Baker *et al.* 1981) since the first report of successful isolation of the endophyte from *Comptonia peregrina* in 1978 (Callahan *et al.* 1978).

Using the serial dilution technique, Diem *et al.* (1982) isolated five strains of *Frankia* from nodules of *Casuarina equisetifolia* collected in different parts of the world (Senegal, Guadeloupe). Although these strains exhibited the morphological characteristics of the genus *Frankia* and the ability to fix N₂ *in vitro* (Gauthier *et al.* 1981), they were unable to nodulate the host plant. We presumed that this failure could be linked to the use of an inappropriate isolation procedure; thus we decided to investigate the technique based on the use of superficially sterilized nodules directly incubated onto the nutrient medium. This technique, similar to that commonly used for isolating plant pathogenic fungi and ectomycorrhizal fungi from root tissues, had already been successfully applied to the isolation of *Frankia* from *Alnus* and *Elaeagnus* (Lalonde *et al.* 1981).

The objectives of the present study were to adapt the technique mentioned above to the isolation of the difficult endophyte from *Casuarina equisetifolia* and at the same time to determine whether the isolation of this endophyte required specific nutrients in the medium. In interpreting the results of our experiments, we attempted to formulate some concepts about the isolation of *Frankia*.

Isolation techniques

Technique No. 1: modified technique of Lalonde et al. (1981)
Nodule lobes were washed, superficially sterilized in a 3%

aqueous solution of osmium tetroxide for 4 min (Lalonde *et al.* 1981), thoroughly rinsed in sterile water, and chopped into small pieces (ca. 0.1–1.5 mm³) by using a sterile scalpel. Each nodule piece was transferred into a 15-mL vial containing 7 mL of semisolid (0.3% agar) Qmod medium (Lalonde and Calvert 1979). This method differed slightly from that of Lalonde *et al.* (1981) in that semisolid rather than liquid medium was used and neither phosphate-buffered saline (PBS) nor polyvinylpyrrolidone (PVP-40) was employed.

Since *Frankia* is assumed to be microaerophilic, we used the semisolid medium to maintain nodule pieces in suspension just beneath the agar surface. This technique is analogous to that devised for isolating microaerophilic *Azospirillum* (Dobereiner and Day 1976).

The vials were incubated at 25–28°C for 2 months. Vials with contaminants were discarded. In some of the remaining vials, nodule pieces carried typical *Frankia* colonies, visible under the dissecting microscope. Each colony was transferred into a 125-mL serum flask containing 15 mL of Qmod liquid medium and then broken up with a magnetic stirrer to obtain an inoculum for subculturing *Frankia*.

Technique No. 2: combination of nodule peeling and incubation on double-layer agar

To eliminate most of the contaminants harbored in the outer cell layer of the nodule lobes, we peeled away these layers as already suggested by Quispel and Burggraaf (1981). Then the nodule lobes were superficially sterilized in a 1.5% calcium hypochlorite solution for 10 min and thoroughly rinsed in sterile water. This procedure was performed along with osmium tetroxide sterilization (technique No. 1). Nodule lobes sterilized by either procedure were then aseptically cut into pieces as mentioned above. Five to 10 pieces of nodule were deposited onto a layer of 1.5% agar Qmod medium without lecithin in a petri dish. Three millilitres of the same medium, maintained at 40°C, was poured on the agar layer, thus covering the pieces of nodule. A variant of this procedure used water agar instead of the Qmod medium as the isolation medium.

Ten petri dishes thus inoculated were incubated at 25–28°C in a saturated atmosphere for preventing the desiccation of the medium during the incubation, which might last up to 2

ARTICLE 3

PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE. — *Infectivité et effectivité de souches de Frankia isolées de nodules de Casuarina equisetifolia et d'Hippophaë rhamnoides*. Note (*) de Daniel Gauthier, Hoang Gia Diem et Yvon Dommergues, présentée par Roger Buvat.

Deux souches d'actinomycète (D11 et G2) isolées de nodules de *Casuarina equisetifolia*, mais incapables d'initier la nodulation chez la plante hôte (*C. equisetifolia*), sont capables d'initier la nodulation chez *Hippophaë rhamnoides*. L'activité réductrice d'acétylène (ARA) spécifique des nodules de *H. rhamnoides* induits par D11 et G2 est sensiblement la même que l'ARA spécifique des nodules de *H. rhamnoides* inoculé soit avec une souche (H13) isolée de nodules de *H. rhamnoides*, soit avec des nodules broyés de la même plante. Ces résultats confirment que les souches D11 et G2 sont bien des *Frankia* et indiquent que ces souches sont à la fois infectives et effectives quand la plante hôte est *Hippophaë rhamnoides*.

Two strains of actinomycete isolated from nodules of Casuarina equisetifolia (D11 et G2), were unable to initiate nodulation in the host plant (C. equisetifolia), but could nodulate Hippophaë rhamnoides. The specific acetylene reduction activity (ARA) of the nodules formed by D11 and G2 on H. rhamnoides was similar to that of nodules obtained by inoculation of H. rhamnoides with a strain (H13) isolated from H. rhamnoides or with crushed nodules from the same plant. These results confirm that strains D11 and G2 are Frankia and indicate that they are not only infective but also effective when the host plant is Hippophaë rhamnoides.

Dans une publication précédente, nous avons rapporté l'isolement de deux souches d'actinomycète (D11 et G2) à partir de nodules de *Casuarina equisetifolia* [1]. Nous avons admis alors que ces souches appartenaient au groupe des *Frankia* en raison (1) de leur morphologie et notamment de la présence d'hyphes, de vésicules et de sporanges caractéristiques des actinomycètes symbiotiques des non-légumineuses fixatrices d'azote [1], (2) de leur capacité à réduire l'acétylène *in vitro* ([1], [2]). Cependant, il nous avait été alors impossible d'obtenir des nodules sur *Casuarina equisetifolia* par inoculation avec les souches D11 et G2. Étant donné ces résultats, nous avons tenté de vérifier si les souches D11 et G2 étaient capables d'induire la nodulation chez une autre non-légumineuse fixatrice d'azote, en l'occurrence *Hippophaë rhamnoides*. Cette étude nous a amené à comparer les souches D11 et G2 avec une souche que nous avons isolée à partir de nodules de *H. rhamnoides*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — *Souches de Frankia*. — Rappelons que la souche D11 a été isolée à partir de nodules de *Casuarina equisetifolia* récoltés dans le parc de Hann à Dakar (Sénégal) [1]. Nous avons effectué l'isolement et réalisé la culture de cette souche sur le milieu QMOD [3]. La souche G2 a été isolée et cultivée de la même manière à partir de nodules de *C. equisetifolia* provenant de Guadeloupe [1]. Nous avons isolé la souche H13 à partir de nodules d'*Hippophaë rhamnoides* récoltés dans la région de Mens (Isère, France). Nous avons réalisé ce dernier isolement en utilisant la méthode de dilution utilisée antérieurement [1], en remplaçant le milieu QMOD par le milieu sans azote suivant (g/l) : KH_2PO_4 : 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,01; FeSO_4 : 0,01; succinate de sodium : 1,2; MoO_4Na , $2\text{H}_2\text{O}$: 0,005; SO_4Mn , H_2O : 0,025; SO_4Zn , $7\text{H}_2\text{O}$: 0,007; SO_4Cu , $5\text{H}_2\text{O}$: 0,001 25; SO_4Co , $7\text{H}_2\text{O}$: 0,001 4; BO_3H_3 : 0,000 3. Le pH a été ajusté à 6,8.

Culture des plantes-hôtes. — Les graines de *Casuarina equisetifolia* et d'*Hippophaë rhamnoides* ont été traitées à l'acide sulfurique concentré pendant 2 mn puis rincées abondamment à l'eau stérile. Après germination sur eau gélosée (5 jours), les plantules ont été placées à raison de 4 à 6 dans des enveloppes de polyester (17 cm × 16 cm) comportant une mèche en papier [4] et contenant environ 50 ml de solution nutritive de Hoagland [5] sans azote diluée au seizième et ajustée à pH 5,4. Nous avons placé les plantes dans une chambre de culture à 28°C sous un éclairage de 7 000 lx. Tous les 3 à 5 jours nous avons ajouté dans les enveloppes une quantité suffisante de solution nutritive de façon à ce que le volume de cette solution reste constant.

Inoculation d'Hippophaë rhamnoides. — Nous avons inoculé les plants de *H. rhamnoides* âgés de 10 jours en injectant, dans chaque enveloppe, 1 ml de suspension de culture de *Frankia* ou de broyat de nodules. Nous avons préparé la suspension de *Frankia* à partir de cultures de 15 jours, que nous avons centrifugées, lavées et homogénéisées stérilement dans une fiole contenant un barreau aimanté. Pour obtenir les broyats de nodules, nous avons broyé au mortier 1 g de nodule que nous avons ensuite resuspendu dans 100 ml d'eau stérile.

TABLEAU
Nodulation d'Hippophaë rhamnoides par différents inoculums

| Inoculums | Pourcentage de plants nodulés | Nombre de nodules par plante nodulée | ARA spécifique ($\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{h/g}$ poids sec de nodules) |
|---|-------------------------------|--------------------------------------|---|
| Témoin non inoculé. | 0 (10) | 0 | 0 |
| Souche isolée d' <i>Hippophaë rhamnoides</i> : | | | |
| H13. | 100 (12) | 2,2 \pm 1 | 50 \pm 23 |
| Nodules broyés d' <i>Hippophaë rhamnoides</i> | | | |
| | 100 (12) | 3,2 \pm 1,5 | 40 \pm 32 |
| Souches isolées de <i>Casuarina equisetifolia</i> : | | | |
| DII. | 66 (44) | 3 \pm 0,8 | 66 \pm 28 |
| G2. | 50 (8) | 3 \pm 2,6 | n.d. |
| Nodules broyés de <i>Casuarina equisetifolia</i> | | | |
| | 61 (12) | 1,7 \pm 0,8 | n.d. |

Entre parenthèses : nombre de plantes testées; n. d. : non déterminé.

Nous avons dénombré les nodules 5 semaines après l'inoculation. Nous avons déterminé leur activité réductrice d'acétylène par chromatographie en phase gazeuse [6], 2 mois après l'inoculation.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — Une expérience complémentaire a confirmé les résultats antérieurs [1], à savoir que la nodulation de *Casuarina equisetifolia* ne pouvait être induite par les souches DII et G2, alors qu'elle était obtenue facilement avec les broyats de nodules de *C. equisetifolia*.

Le tableau résume les résultats de l'essai d'inoculation d'*Hippophaë rhamnoides* par cinq types d'inoculum. Les plantes témoins n'ont pas été nodulées, ce qui indique qu'il n'y a eu aucune contamination dans notre dispositif expérimental. Tous les plants de *H. rhamnoides* inoculés par la souche H13 (isolée de nodules de *H. rhamnoides*) et par le broyat de nodules de *H. rhamnoides* ont été nodulés. Le pourcentage de plants nodulés a été seulement de 50 et 66 % lorsque l'inoculation a été effectuée avec les souches G2 et DII (isolées à partir de nodules de *Casuarina equisetifolia*). Les ARA spécifiques ont été sensiblement les mêmes quelle que soit l'origine des inoculums.

En conclusion, si jusqu'à présent nous n'avons pu obtenir la nodulation de *Casuarina equisetifolia* par inoculation avec les souches DII et G2, nous avons, par contre, obtenu la nodulation d'*Hippophaë rhamnoides* avec ces souches. Les nodules ainsi formés réduisant l'acétylène, c'est-à-dire fixant l'azote, les souches DII et G2 sont donc non seulement infectives mais aussi effectives vis-à-vis d'*Hippophaë rhamnoides*. Pour expliquer l'échec de la nodulation de *Casuarina equisetifolia* avec DII et G2, nous émettons l'hypothèse que cette

nodulation pourrait être obtenue seulement dans des conditions particulières, par exemple en présence de microorganismes associés (helpers) comme l'ont suggéré Knowlton et coll. [7].

Si nous admettons avec Akkermans et Roelofsen [8] que *Casuarina equisetifolia* et *Hippophaë rhamnoides* appartiennent à deux groupes d'inoculation croisée différents, nous devons supposer que DII et G2 seraient des souches à large spectre, telles qu'il en existe chez le genre *Rhizobium*, ou qu'*Hippophaë rhamnoides* serait une non-légumineuse fixatrice d'azote peu spécifique.

(*) Reçue le 9 juillet 1981, acceptée le 21 septembre 1981.

- [1] D. GAUTHIER, H. G. DIEM et Y. DOMMARGUES, *Appl. Environm. Microbiol.*, 41, 1981, p. 306.
- [2] J. D. TJEKEMA, W. ORMEROD et J. G. TORREY, *Nature*, 287, 1980, p. 633.
- [3] M. LALONDE et H. E. CALVERT, In (J. C. GORDON, C. T. WHEELER et D. A. PERRY, éd., *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests*, Forst Research Laboratory, Oregon State University, Corvallis, 1979, p. 95.
- [4] F. E. PORTER, I. S. NELSON et E. K. WOLD, *Crops and Soils*, 18, 1966, p. 10.
- [5] D. R. HOAGLAND et D. I. ARNON, *Calif. Agric. Expt. Sta.*, 1950, Cir. 347.
- [6] R. W. HARDY, R. D. HOLSTEN, E. K. JACKSON et R. C. BURNS, *Plant Physiol.*, 43, 1968, p. 1185.
- [7] S. KNOWLTON, A. BERRY et J. G. TORREY, *Can. J. Microbiol.*, 26, 1980, p. 971.
- [8] A. D. L. AKKERMANS et W. ROELOFSEN, in *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, W. D. P. STEWART and J. R. GALLON, éd., Academic Press, London, 1980, p. 279.

O.R.S.T.O.M./C.N.R.S., Laboratoire de Microbiologie du Sol, B.P. n° 1386, Dakar, Sénégal.

ARTICLE 4

The *Colletia spinosissima*-*Frankia* symbiosis

D. Gauthier ⁽¹⁾, L. Frioni ⁽²⁾, H. G. Diem ⁽¹⁾, Y. Dommergues ⁽¹⁾

⁽¹⁾ ORSTOM/CNRS B. P. 1386, Dakar, Senegal.

⁽²⁾ Facultad de Agronomía, Universidad de Río Cuarto,
5800 Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

SUMMARY

Colletia spinosissima, an actinorhizal Rhamnalian species native to South America, is known for its beneficial effect on soil fertility (improvement of the soil nitrogen status).

The symbiotic endophyte, *Frankia*, was isolated (strain ORS060501) and shown to be infective and effective. Similar to other *Frankia* strains, strain ORS060501 fixed nitrogen *in vitro*. This strain nodulated other Rhamnales (*Hippophaë rhamnoides*, *Elaeagnus angustifolia*) but failed to nodulate the non-Rhamnales tested, suggesting that strains of *Frankia* associated with Rhamnales form a cross-inoculation group. This concept, however, should be applied with flexibility since some strains isolated from non-Rhamnales (such as strains ORS020602, HFPCc11, and HFPCc12) are able to nodulate Rhamnales.

The *Colletia*-*Frankia* symbiosis is characterized by a N₂-fixing potential which is comparable with other actinorhizal systems.

KEY-WORDS: Argentina - *Colletia spinosissima* - *Frankia* - Actinorhizae -
Rhamnale - Nitrogen fixation.

RÉSUMÉ

Colletia spinosissima est une Rhamnale actinorhizienne originaire d'Amérique du Sud. Cette plante est connue pour son effet améliorant la fertilité des sols (accroissement de leur teneur en azote).

On a isolé l'endophyte symbiotique (souche de *Frankia* ORS060501) et on a montré que cette souche était infective et effective. De même que les autres souches de *Frankia*, la souche ORS060501 fixe l'azote *in vitro*. Cette souche a nodulé d'autres Rhamnales (*Hippophaë rhamnoides*, *Elaeagnus angustifolia*) mais n'a pu noduler les autres non-Rhamnales testées, ce qui suggère que les souches de *Frankia* associées aux Rhamnales forment un groupe d'inoculation croisée. Cependant ce concept ne doit pas être appliqué avec rigueur car certaines souches isolées de non-Rhamnales (telles que les souches ORS020602, HFPCc11 et HFPCc12) peuvent noduler les Rhamnales.

Les potentialités fixatrices d'azote de la symbiose *Colletia spinosissima*-*Frankia* sont comparables à celles des autres systèmes actinorhiziens connus.

MOTS-CLÉS : Argentine - *Colletia spinosissima* - *Frankia* - Actinorhize -
Rhamnale - Fixation d'azote.

I. — INTRODUCTION

The family Rhamnaceae comprises six genera, *Ceanothus*, *Colletia*, *Discaria*, *Kentrothamnus*, *Trevoa*, *Talguenea* which have been reported to bear actinorhizal nodules (BOND, 1976; MEDAN & TORTOSA, 1976, 1981; BOND & BECKING, 1982). The genus *Colletia* itself comprises 17 shrubby species confined to South America (BOND & BECKING, 1982). Two species of *Colletia* are well known to be native to

Argentina: *C. spinosissima* Gmel. (syn.: *C. spinosa* Lam), *C. paradoxa* (Spreng.) Escalente (syn.: *C. cruciata*) (DIMITRI, 1959). These species differ according to the shape of their stems and thorns, which are cylindrical in *C. spinosissima* and markedly flattened in *C. paradoxa* (DIMITRI, 1959).

According to Pr. A. H. MERZARI from the faculty of Agronomy of Buenos Aires quoted by MIGUEL *et al.* (1978), « The beneficial effects of *Colletia* in Argentina lands have long been recognized by Araucan Indians ». Since these effects probably result from the ability of *Colletia* to fix nitrogen and consequently improve the soil nitrogen status, we attempted to evaluate the N₂-fixing potential of the *Colletia*-*Frankia* system. This investigation required the isolation of the specific *Frankia* strain and a preliminary study of its ability to fix N₂ *in vitro*.

II. — MATERIALS AND METHODS

Plant cultivation and obtention of nodules for further isolation of Frankia.

Seeds, nodules and rhizosphere soil of *Colletia spinosissima* were collected on plants growing in a stony soil close to Embalse Dam on the Rio Tercero, Argentina (plate I, fig. 1), a location with a low rainfall (600 mm per annum, with rain occurring mainly in spring and summer).



Plate I, FIG. 1. — A bush of spontaneously growing *Colletia spinosissima* at flowering stage, Embalse Dam, Rio Tercero, Argentina.

To obtain fast and regular germination, the seeds were pretreated with concentrated sulfuric acid for 3 min, then washed with water until all traces of acid were removed. The seeds were sown in sterile nitrogen-deficient soil placed in pots in a glasshouse at ORSTOM research station, Dakar, Senegal. Young seedlings were inoculated with a suspension of dried crushed nodules plus rhizo-

sphere soil. The pots were irrigated with distilled sterile water and supplied with nitrogen-free HOAGLAND'S solution (HOAGLAND & ARNON, 1950) every week. When the *Colletia* seedlings were 6 months old, some of them were dug out and the fresh nodules were excised and used for isolation of *Frankia* as indicated below; the remaining plants were clipped to get cuttings used for inoculation experiments.

Isolation of *Frankia* from *Colletia* nodules.

Nodule lobes were superficially sterilized in a 3 % aqueous solution of osmium tetroxide for 4 min, were then thoroughly rinsed in sterile water and chopped into small pieces (LALONDE *et al.*, 1981). These pieces were transferred onto a 1.5 % water agar layer in a 10 cm Petri dish, on which 3 ml of QMOD (LALONDE & CALVERT, 1979) agar was poured to form the top layer (DIEM & DOMMERMUES, 1983).

The Petri dishes were incubated at 25-28° C for one month in a saturated atmosphere. Typical colonies of *Frankia* emerging from nodule pieces were separately transferred into 10 vials containing 4 ml of QMOD medium. When colonies had grown to 1 mm diameter, they were gently broken into fragments using a magnetic stirrer and subcultured in liquid QMOD medium. The strain thus obtained was designated ORS060501 according to Lechevalier's proposed nomenclature rule (LECHEVALIER, 1983).

Frankia strains of collection.

Four strains were kindly provided by Dr. D. BAKER: Cp11, isolated from *Comptonia peregrina* (CALLAHAM *et al.*, 1978); Mg15, isolated from *Myrica gale*; Avc11, isolated from *Alnus viridis*; Ptl1 isolated from *Purshia tridentata* (BAKER, 1982).

Other strains used had been previously isolated in our laboratory: ORS140101 (syn.: H13), isolated from *Hippophaë rhamnoides* (GAUTHIER *et al.*, 1981 a); ORS020602 (syn.: D11) isolated from *Casuarina equisetifolia* (DIEM *et al.*, 1982 a); ORS021001 (syn.: Cj1-82) isolated from *Casuarina junghuhniana* (DIEM *et al.*, 1983).

Plants tested.

The following actinorrhizal plants were tested in our study: *Purshia tridentata* (seeds kindly provided by D. BAKER), *Elaeagnus angustifolia* (seeds from Versepuy Seed Company, Le Puy, France) *Hippophaë rhamnoides* (seeds harvested by A. GUILLERMIN in the vicinity of Grenoble, France), *Casuarina equisetifolia* (seeds provided by CNRF/ISRA, Dakar, Senegal) and *Allocasuarina torulosa* (seeds provided by the Botanical Garden, Canberra, Australia).

Nitrogenase activity in vitro.

A culture of ORS060501 grown on QMOD medium was centrifuged and homogenized using a magnetic stirrer. The suspension thus obtained was used to inoculate 145 ml vials containing 25 ml of the following nitrogen-free medium (NFM) expressed as g/l: KH_2PO_4 : 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 0.1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$: 0.01; FeSO_4 : 0.01; sodium succinate: 1.2; glucose: 1.0; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$: 0.005; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 0.025, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 0.007, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$: 0.00125, $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 0.0014, H_3BO_3 : 0.0003, pH 6.8. The inoculated vials were incubated under either 80 % Ar-20 % O_2 or 80 % N_2 -20 % O_2 gas mixtures. After a 15-day incubation, C_2H_2 was added (10 %) and acetylene reduction activity (ARA) was measured daily by the method of POSTGATE (1972) for 3 days and expressed as nmoles of C_2H_4 produced per hour and per mg of dry weight.

Plant infection tests.

Colletia spinosissima was grown in test tubes with an aluminium foil cap (GIBSON, 1963). Cuttings were inserted through the aluminium cap so that their base, previously dipped into a commercial mixture of phytohormones (¹), remained immersed. The nutrient medium in each tube was made of two phases: one solid phase made of an agar slant containing 1/4 strength nitrogen-free HOAG-

(¹) ROOTONE F., Compagnie française de Produits Industriels, 117, quai du Docteur-Dervaut, F-92601 Asnières.

LAND solution according to KNOWLTON *et al.* (1980) supplemented with (in grams per litre) activated charcoal Merck ref. 2186: 20 g; CaCO₃: 1 g; agar: 16 g and one liquid phase which was a 1/4 strength HOAGLAND solution. The liquid phase was complemented with nitrogen ((NH₄)₂SO₄: 17 mg l⁻¹) during the first 5 weeks to allow a satisfactory plant growth, then no more nitrogen was added. From then on inoculation was performed by adding a few drops of a suspension of the different strains of *Frankia* to each tube.

A similar device was used for growing the other plants except that they were obtained from seeds instead of cuttings.

Estimation of the N₂-fixing potential.

Nodules of each root system were incubated in 7 ml vials under a 90 % air-10 % C₂H₂ gas mixture. ARA was measured after 0.5 h and 1 h incubation and expressed as μ moles of C₂H₄ produced per hour and per g of dry nodule. Total nitrogen content of the whole plantlets was analysed using the microKjeldahl method.

Electron microscopy.

Nodules for study under the electron microscope were fixed in 2.5 % glutaraldehyde in 0.025 M cacodylate buffer, post-fixed in 1 % osmic acid and then embedded in epon 812. Ultrathin sections were cut from the blocks on an ultramicrotome, stained with uranyl acetate-lead citrate and examined in a Siemens Elmiskop 101.

III. — RESULTS AND DISCUSSION

1. *Morphological characteristics of strain ORS060501.*

When grown on QMOD medium strain ORS060501 exhibited the three usual structures of *Frankia*, i. e.: hyphae, sporangia and vesicles. This strain was morphologically very similar to strain ORS020602 (syn.: D11) except that it produced no pigment. Strain ORS060501 produced vesicles (but did not fix N₂) in some media containing combined nitrogen, such as yeast extract and casamino-acids (that are contained in QMOD medium). Such behavior was similar to that of strain ORS020602, but contrasted with that of strains Cp11 and ORS021001 which form vesicles only in conditions of N₂ fixation, i. e., in nitrogen-free media (TJEPKEMA *et al.*, 1980; GAUTHIER *et al.*, 1983). From these observations, one can infer that the *Frankia* strains known up to now fall into two categories: those which form only N₂-fixing vesicles (e. g. Cp11; ORS021001) and those which form vesicles without necessarily fixing N₂.

2. *N₂ fixation in vitro.*

Table I shows that in nitrogen-free medium (NFM), strain ORS060501 could grow only when the gas mixture contained N₂; in other words the strain appeared to grow with N₂ as the sole nitrogen source. Table I also shows that N₂ fixation by the strain ORS060501 occurred at high pO₂ (normal atmosphere). These results confirm the fact that *Frankia* has a highly efficient protection system against O₂, a conclusion already drawn by TJEPKEMA *et al.* (1981) and GAUTHIER *et al.* (1981 b), with other *Frankia* strains, respectively strain Cp11 and strain ORS020602.

3. *Infectivity of strain ORS060501 and potential N₂ fixation in plants.*

Strain ORS060501 was not only infective but effective since it profusely nodulated and sustained the growth of the cuttings of *Colletia spinosissima* in the nitrogen-free nutrient medium (plate 2, fig. 1 and 2).

The N₂-fixing potential of the *Colletia-Frankia* symbiosis was evaluated in terms of acetylene reduction activity expressed per hour and per g (dry weight) of plant

TABLE I. — Nitrogenase activity and growth of *Frankia* strain ORS060501 under two gas mixtures after 15-day incubation in nitrogen-free medium (NFM).

| Gas mixture | <i>Frankia</i> biomass ⁽¹⁾ (mg dry weight vial ⁻¹) | ARA ⁽¹⁾ (nmoles C ₂ H ₄ h ⁻¹ mg ⁻¹ dry weight) |
|---|--|---|
| 80 % N ₂ : 20 % O ₂ | 2.6 | 165 |
| 80 % Ar: 20 % O ₂ | 0.3 | 7 |

⁽¹⁾ Mean value of 10 replications.

Frankia inoculum was 0.17 mg dry weight vial⁻¹.

ARA = acetylene reduction activity.

TABLE II. — Effect of inoculation with *Frankia* strain ORS060501 on dry weight, nitrogen content and acetylene reduction activity (ARA) of 3-month-old hydroponically grown *Colletia spinosissima*.

| Treatments | Dry weight (mg plant ⁻¹) | N % | Total N (mg plant ⁻¹) | ARA ⁽¹⁾ |
|------------|---|--------|--------------------------------------|--------------------|
| Control | 56 | 0.8 | 0.45 | 0 |
| Inoculated | 113 | 1.5 | 1.69 | 0.68 |

⁽¹⁾ Acetylene reduction activity expressed as $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ plant}^{-1}$.

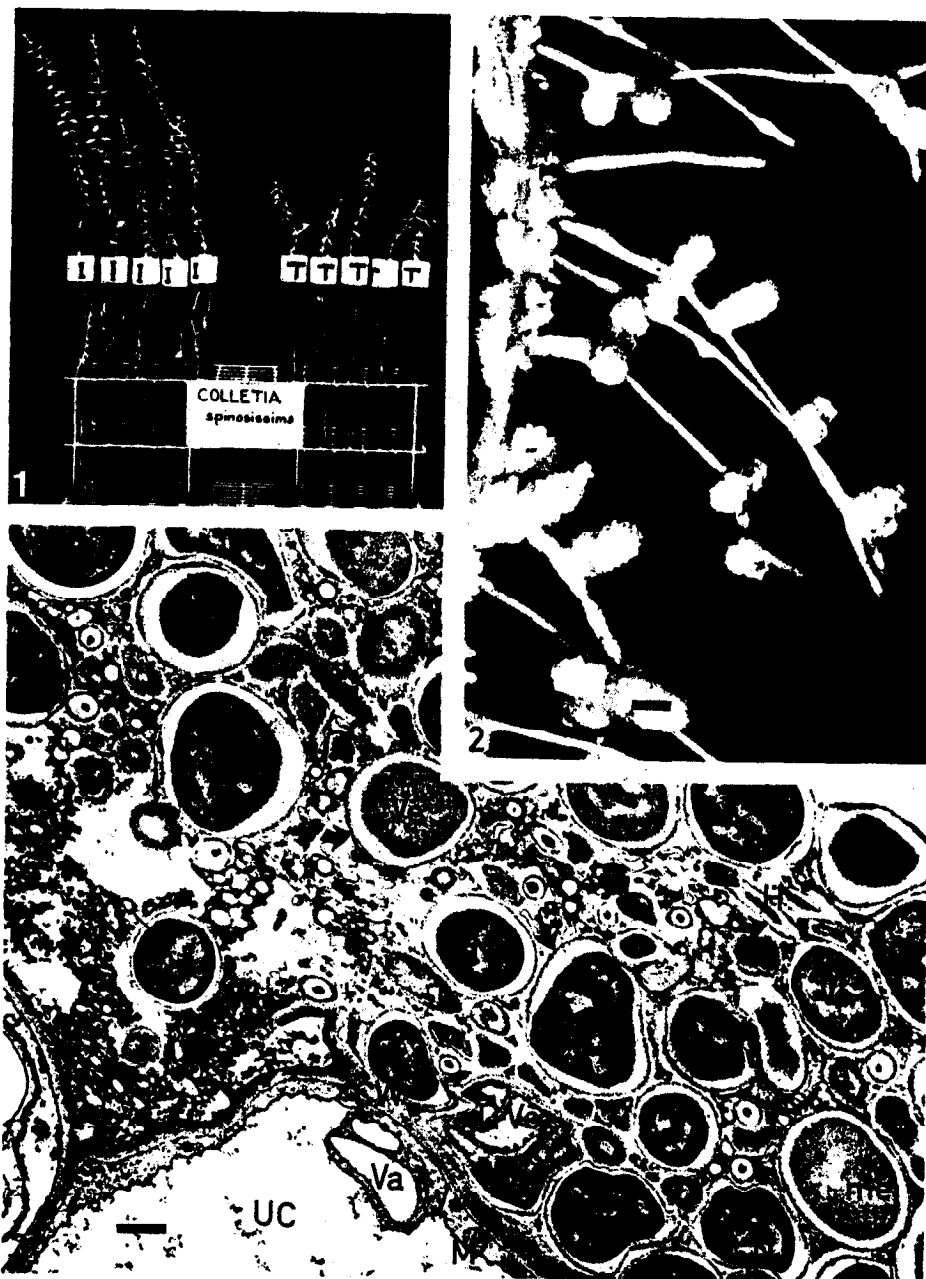
TABLE III. — Nodulation response of six actinorhizal plants inoculated with four strains of *Frankia*.

| Host of isolation and related strain | Test host | | | | | |
|---|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | <i>Colletia spinosissima</i> | <i>Hippophaë rhamnoides</i> | <i>Elaeagnus angustifolia</i> | <i>Purshia tridentata</i> | <i>Casuarina equisetifolia</i> | <i>Allo-casuarina torulosa</i> |
| <i>Colletia spinosissima</i> (ORS060501) | E (12) | E (8) | E (10) | — | — | — |
| <i>Hippophaë rhamnoides</i> (OR140101; syn.: H13) | E (6) | E (50) | E (nd) | — | — | — |
| <i>Casuarina equisetifolia</i> (ORS020602; syn.: D11) | E (2) | E (66) | E (nd) | — | — | — |
| <i>Casuarina junghuhniana</i> (ORS021001; syn.: Cj1-82) | — | — | — | — | E (38) | — |

Remarks: E, effective nodulation; —, no nodules. Between parentheses: SARA as $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ nodule dry weight; nd: SARA non determined.

The following strains were unable to nodulate *C. spinosissima*: Cp11, Mg15, Avc11, Pt11.

tissue (ARAP), or acetylene reduction activity expressed per hour per gram (dry weight) of nodule (SARA), or amount of total N fixed evaluated by the difference between inoculated and uninoculated *Colletia* (ΔN). The related figures were 6 (ARAP), 12 (SARA) and 1.24 (ΔN) (table II and III).



These figures are comparable to those obtained with other actinorhizal N₂-fixing systems. For example, SARA for *Casuarina equisetifolia* measured in comparable conditions was 24-30 $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ nodule (dry weight) (DIEM *et al.*, 1982 *b*; DIEM *et al.*, 1983). Studying the SARA of *Colletia paradoxa in situ*, BOND & BECKING (1982) found that the related SARA was 8.5, which is a figure very close to ours.

The nodules of *C. spinosissima* contained typical spherical septate vesicles 2-3 μm in diameter. Our micrograph of *Colletia spinosissima* nodules (plate 2, fig. 3) is remarkably similar to that of *Colletia paradoxa* published by BOND & BECKING (1982).

4. Cross-inoculation studies.

Table III shows that the *Frankia* strain isolated from *Colletia spinosissima* (ORS060501) could effectively nodulate the host of isolation and two other actinorhizal Rhamnales tested, namely *Hippophaë rhamnoides* and *Elaeagnus angustifolia*, a result which could be expected in spite of the fact that strain ORS060501 was isolated from nodules and the rhizosphere of a plant growing far away from the distribution area of *Hippophaë* and *Elaeagnus*. A strain isolated from *Hippophaë rhamnoides* (ORS140101) was able to effectively nodulate the three Rhamnales, which suggests that *Frankia* isolated from Rhamnales could form a homogeneous cross-inoculation group. This conclusion was confirmed by the other cross-inoculation studies reported in table III (last line and remarks) which show that a number of *Frankia* strains isolated from non-Rhamnales, namely a species from Casuarinales (ORS021001), two from Myricales (Cp11 and Mg11), a species from Fagales (Avcl1) and one from Rosales (Pt11) cannot nodulate *Colletia spinosissima*.

One should be aware of the fact that the concept of a Rhamnales cross-inoculation group is flexible, since anomalies are already known, such as that related to strain ORS020602 (syn.: D11). This last strain isolated from nodules of *Casuarina equisetifolia*, which is unable to nodulate its own host of isolation, can nodulate *Hippophaë rhamnoides* (GAUTHIER *et al.*, 1981 *a*) and is shown here to also nodulate *Colletia spinosissima* and *Elaeagnus angustifolia*. Thus we are led to consider that strain ORS020602 belongs to the Rhamnales cross-inoculation group defined above. The suggested explanation for this surprising result is that nodules of *Casuarina* probably contain not only infective strains (such as ORS021001) but also strains

Plate II. FIG. 1. — Seven-week-old plants of *C. spinosissima* (I) showing nodules on the roots 18 days after inoculation with strain ORS060501. Uninoculated plants of *C. spinosissima* at the same age do not bear any nodules on the roots. Leaves of inoculated plants (I) are green whereas those of uninoculated ones (T) are yellow.

FIG. 2. — Nodules formed on secondary roots of 7-week-old hydroponically grown *C. spinosissima* inoculated with strain ORS060501. Bar represents 1 mm.

FIG. 3. — Transmission electron micrograph showing a partial view of an infected cell adjacent to a portion of an uninfected cell (UC). The infected cell contains numerous endophytic spherical vesicles (Ve) and hyphae (H) both surrounded by a capsule (large arrows). In addition to nuclear material (N), some vesicles show the presence of septa (small arrows) and mesosomes (Me). Near the host cell wall (Cw), a degenerating vesicle (DVe) has partially shrunk, but still contains septa. Note the presence of mitochondria (M) and vacuoles (Va) within the cytoplasm (Cy) of the uninfected cell. Bar represents 1 μm .

failing to infect the host of isolation (such as ORS020602). Both types of isolates were recently obtained by ZANG ZHONGZE *et al.* (1984) from nodules of *Casuarina cunninghamiana*: one strain of the first type (HFPCc13) nodulated *Casuarina* whereas two strains of the second type (HFPCc11 and HFPCc12) failed to nodulate *Casuarina*, but effectively nodulated two Rhamnales, namely *Elaeagnus* and *Hippophaë*.

CONCLUSION

1. The cross-inoculation studies reported here suggest that the strains of *Frankia* associated with Rhamnales form a cross-inoculation group. However, the existence of some strains isolated from non-Rhamnales, but able to nodulate Rhamnales (such as strain ORS020602 and strain HFPCc11 and HFPCc12) implies that there is a continuum between the typical Rhamnalian strains (such as strain ORS060501 isolated from *C. spinosissima*) and some strains from the Casuarinaceae. This situation is reminiscent of that encountered with the continuum of *Rhizobium* strains which extend from the typical *R. japonicum* strains, to the cowpea miscellany (BROMFIELD & ROUGHLEY, 1980).

2. The *Colletia-Frankia* symbiosis is characterized by a N₂-fixing potential which is comparable with other actinorhizal systems. One factor limiting N₂-fixation in the field is probably the absence of the specific endophyte since nodules are not always present (RUNDEL & NEEL, 1978). This situation can easily be improved since we have now isolated the specific *Frankia* strain. Of course, other limiting factors can be involved, which should be investigated in the field.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the fine assistance of Pr. MATTEI, University of Dakar, for TEM studies. We thank Dr. D. BAKER, for providing four *Frankia* strains and seeds of *Purshia tridentata*, and Aïnina SAMB for technical assistance.

REFERENCES

- BAKER D., 1982. — A cumulative listing of isolated *Frankiae*, the symbiotic, nitrogen-fixing actinomycetes. In: *The Actinomycetes*, 17, 35-42.
- BOND G., 1976. — The results of the IBP survey of root-nodule formation in non-leguminous angiosperms. In: *Symbiotic nitrogen fixation in plants* (P. S. NUTMAN, Ed.). Cambridge University Press, 443-474
- BOND G. & BECKING J. H., 1982. — Root nodules in the genus *Colletia*, *New Phytol.*, 90, 57-65.
- BROMFIELD E. S. P. & ROUGHLEY R. J., 1980. — Characterisation of rhizobia isolated from nodules on locally-adapted *Glycine max* grown in Nigeria. *Ann. Appl. Biol.*, 95, 185-190.
- CALLAHAM D., DEL TREDICI P. & TORREY J. G., 1978. — Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. *Science*, 199, 4331, 899-902.
- DIEM H. G. & DOMMERMUES Y., 1983. — The isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina*. *Can. J. Bot.*, 61, 2822-2825.
- DIEM H. G., GAUTHIER D. & DOMMERMUES Y. R., 1982 a. — Isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina equisetifolia*. *Can. J. Microbiol.*, 28, 526-530.
- DIEM H. G., GAUTHIER D. & DOMMERMUES Y. R., 1982 b. — Isolement et culture *in vitro* d'une souche infective de *Frankia* isolée de nodules de *Casuarina*. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sér. III*, 295, 759-763.
- DIEM G. H., GAUTHIER D. & DOMMERMUES Y. R., 1983. — An effective strain of *Frankia* from *Casuarina* sp. *Can. J. Bot.*, 61, 2815-2821.

- DIMITRI M. J., 1959. — Rhamnaceas. In: *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardineria*, (L. PARODI, Ed.). Vol. 1, 573-574.
- GAUTHIER D., DIEM H. G. & DOMMERGUES Y. R., 1981 a. — Infectivité et effectivité de souches de *Frankia* isolées de nodules de *Casuarina equisetifolia* et d'*Hippophaë rhamnoides*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, Sér. III, 293, 489-491.
- GAUTHIER D., DIEM H. G. & DOMMERGUES Y. R., 1981 b. — *In vitro* nitrogen fixation by two actinomycete strains isolated from *Casuarina* nodules. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 306-308.
- GAUTHIER D. L., DIEM H. G. & DOMMERGUES Y. R., 1983. — Tropical and Subtropical Actinorhizal Plants. In: *Proc. Symposium on Nitrogen Fixing Trees for The Tropics*. Rio de Janeiro, September 19-24, 1983 (in press).
- GIBSON A. H., 1963. — Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. The effect of root temperature on recently nodulated *Trifolium subterraneum* plants. *Aust. J. Biol. Sci.*, 28, 28-42.
- HOAGLAND D. R. & ARNON D. I., 1950. — The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Expt. Sta. Circ.*, 347.
- KNOWLTON S., BERRY A. & TORREY J. G., 1980. — Evidence that associated soil bacteria may influence root hair infection of actinorhizal plants by *Frankia*. *Can. J. Microbiol.*, 26 (8), 971-977.
- 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* (J. C. GORDON, C. T. WHEELER & D. A. PERRY Eds). Forest Research Laboratory, Corvallis, 95-110.
- LALONDE M., CALVERT H. E. & PINE S., 1981. — Isolation and use of *Frankia* strains in actinorhizae formation. In: *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. (A. H. GIBSON & W. E. NEWTON Eds). Australian Academy of Science, Canberra, pp. 296-312.
- LECHEVALIER M. P., 1983. — Cataloging *Frankia* strains. *Can. J. Bot.*, 61, 2964-2967.
- MEDAN D. & TORTOSA R. D., 1976. — Nodulos radicales en *Discaria* y *Colletia* (Rhamnaceas). *Bol. Soc. Argentina Bot.*, 17, 323-336.
- MEDAN D., TORTOSA R. D., 1981. — Nodulos actinomicorrizicos en especies Argentinas de los generos *Kentrothamnus*, *Trevoa* (Rhamnaceae) y *Coriaria* (Coriariaceae). *Bol. Soc. Argentina de Bot.*, 20, 71-81.
- MIGUEL D., CANIZO A., COSTA A. & RODRIGUEZ-BARRUECO C., 1978. — Some aspects of the *Alnus*-type root nodule. In: *Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics* (J. DOBEREINER, R. H. BURRIS & A. HOLLAENDER, Eds). Plenum Press, New York and London, 121-133.
- POSTGATE J. R., 1972. — The acetylene reduction test for nitrogen fixation, p. 343-356. In: J. R. NORRIS & D. W. RIBBONS Eds, *Methods in microbiology*, Vol. 2 B. Academic Press, Inc., London.
- RUNDEL W. R. & NEEL J. W., 1978. — Nitrogen fixation by *Trevoa trinervis* (Rhamnaceae) in the Chilean matorral. *Flora*, 167, 127-132.
- TJEPKEMA J. D., ORMEROD W. & TORREY J. G., 1980. — Vesicle formation and acetylene reduction activity in *Frankia* sp. Cp11 culture in defined nutrient media. *Nature*, 287, 633-635.
- TJEPKEMA J. D., ORMEROD W. & TORREY J. G., 1981 — Factors affecting vesicle formation and acetylene reduction (nitrogenase activity) in *Frankia* sp. Cp11. *Can. J. Microbiol.*, 27, 815-823.
- ZHANG ZHONGZE, LOPEZ M. F. & TORREY J. G., 1984. — A comparison of cultural characteristics and infectivity of *Frankia* isolates from root nodules of *Casuarina* species. *Plant Soil* 78, 79-90.

ARTICLE 5

Extranodular growth of *Frankia* on *Casuarina equisetifolia*

H.G. Diem, D. Gauthier and Y.R. Dommergues

Laboratoire de Microbiologie des Sols, ORSTOM/CNRS, B.P. 1386, Dakar, Sénégal

Received 19 January 1982

Accepted 3 May 1982

1. INTRODUCTION

17 genera of non-leguminous angiosperms bear N₂-fixing root nodules initiated by an actinomycete known as *Frankia* [1,11]. The expanding volume of current literature attests to the significance vested in this symbiosis. However, to the best of our knowledge, no publications up to this point have dealt with the occurrence and behaviour of *Frankia* outside its specific niche, the nodule. Reported here are observations indicating that *Frankia* is able to grow outside the nodule of *Casuarina equisetifolia* and to proliferate in its vicinity. Our study is focused on *Casuarina* because these tropical and subtropical non-legumes play a major role by virtue of their ability to thrive on nitrogen-deficient soils.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Cultivation and inoculation of the *Casuarina* seedlings

Seeds of *Casuarina equisetifolia* were washed and surface-sterilized with concentrated H₂SO₄ for 2 min and rinsed several times with sterile distilled water. They were then germinated in sterile, moist sand for 10 days at 30°C. 6-week-old seedlings were transferred into empty petri dishes (9 cm diam.); the stems were maintained upright with a plastic clip fitted inside the rim and the roots were positioned lying horizontally on the bottom. The

petri dishes were filled with 20 ml of a sterile quarter strength Hoagland solution [5]. The lids of the petri dishes had a radial slot near the rim in which the seedling stems were inserted. The lid and the rim of the petri dishes were painted black to prevent the proliferation of algae. The seedlings were placed in a controlled environment chamber (day/night: 16/8 h; day temperature/night temperature: 25/20°C). Each week, for 4 weeks, the Hoagland solution was renewed; when necessary, sterile water was added to compensate for evaporation. When the seedlings were ca. 10 weeks old, the Hoagland solution was replaced by a sterile N-free Hoagland solution. One set of the seedlings was inoculated by adding into each petri dish 1 ml of a water suspension of crushed nodules (ca. 10 mg fresh wt.). These nodules had been freshly collected on nodulated *Casuarina* grown in tubes or pots and had been surface-sterilized before being crushed. In some petri dishes, sterile distilled water was used instead of the N-free Hoagland solution. Another set of the seedlings remained uninoculated to serve as a control or to be used later in infectivity tests described in Section 3.

2.2. Microscopic observations of the root systems

To observe the root systems of the seedlings without disturbing them, we removed the lid of each petri dish and placed the whole device with the seedling under a dissecting microscope (×40). Such observations were made every week after

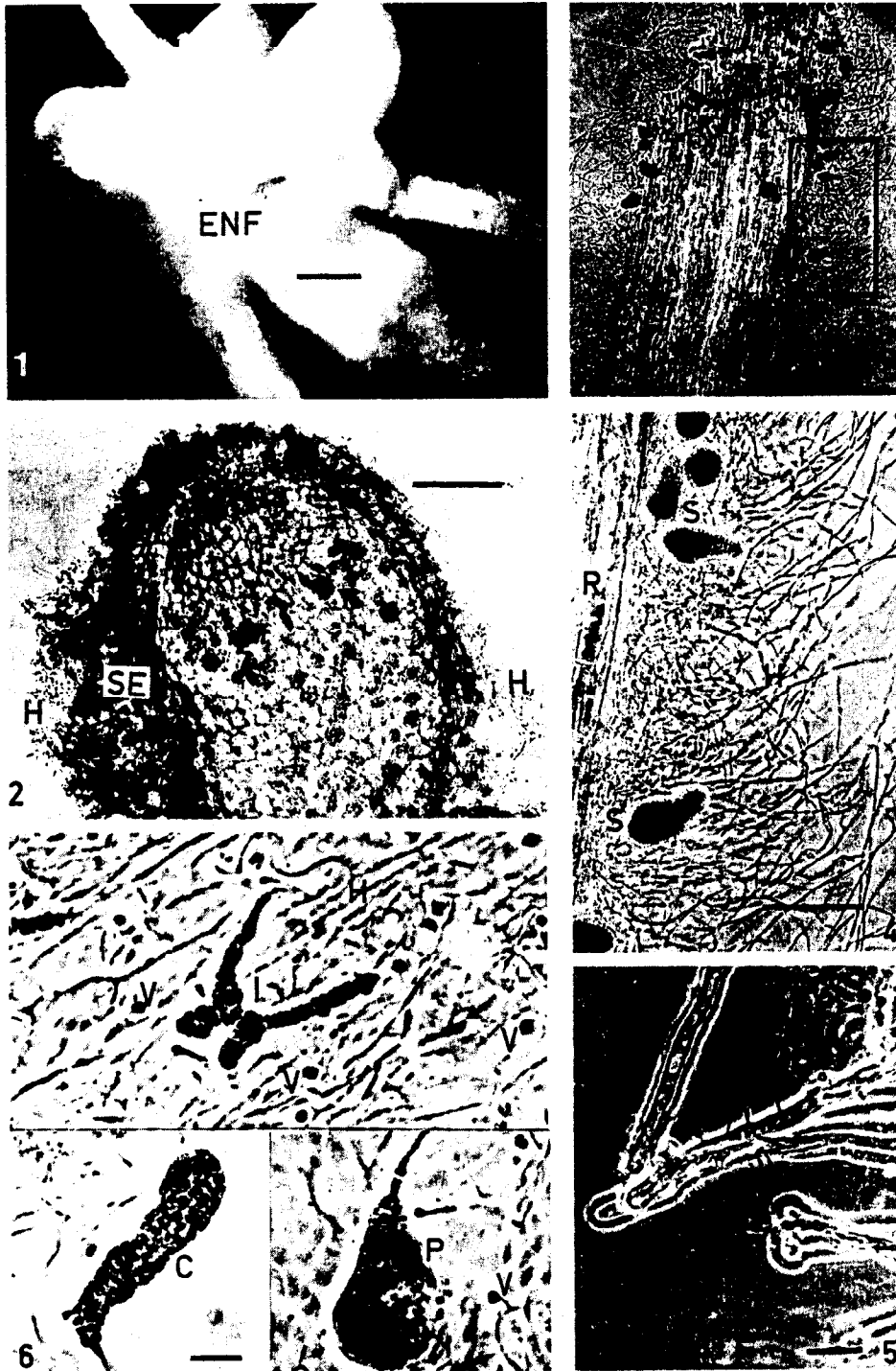


Fig. 1. Extranodular colony of *Frankia* (ENF) growing in the vicinity of a nodule of *Casuarina equisetifolia* as observed under dissecting microscope. Note the fluffy whitish aspect of the colony. Bar = 200 μ m.

inoculation for the presence of nodules. After the initiation of nodulation, the seedlings were cultivated for 3–4 additional weeks. Adjacent roots or microbial colonies growing around the newly formed nodules were then excised and stained with trypan blue in lactophenol (0.1%, w/v) for microscopical observation ($\times 250$). Thick sections of nodule lobes were cut with a freezing rotary microtome and stained with trypan blue.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Up to 7 weeks after inoculation, uninoculated seedlings bore no nodule at all. By contrast, all the seedlings that had been inoculated were nodulated as early as the fourth week. Direct examination of the root systems under the dissecting microscope showed that 7 weeks after inoculation, 30–70% of the nodules in all the inoculated root systems were partially covered with fluffy whitish colonies composed of very thin hyphal filaments ($0.9 \mu\text{m}$), which appeared to be different from fungal hyphae (Fig. 1). Under higher magnification, the morphology of the filaments appeared similar to that of an actinomycete. Moreover, in the hyphal network, there were many spore-containing sporangia and vesicles similar to those formed by *Frankia* in vitro (Figs. 4 and 6). Sections of nodules suggested that the growing hyphae originated from the inner tissue of the nodule lobe (Fig. 2). The sites of emergence of the hyphae had the form of round protruding spots (ca. $200 \mu\text{m}$ diam.) at the surface of the nodules. In later stages, the hyphae proliferated around these spots, resulting

in the typical fluffy colonies, which we designated as extranodular *Frankia* colonies (ENF). In some cases, ENF extended along the rootlets adjacent to the nodules, covering them up to 2–3 mm but apparently without penetrating the rootlet (Figs. 3 and 4). Sporangia in the ENF colonies exhibited a wide range of sizes and shapes (Fig. 6), much like those observed in pure cultures of *Frankia* from *Casuarina* [3] or other host plants (e.g. [9]). ENF vesicles were spherical ($2.5\text{--}3.0 \mu\text{m}$) and resembled typical vesicles obtained in vitro (Fig. 6). It is interesting to note that up to now typical spherical vesicles have never been observed inside the *Casuarina* nodules [11,12]. Fig. 5 shows that in the region invaded by ENF, rod-shaped particles were attached perpendicularly to the root hairs. We do not know the nature and the role of these particles. They could be bacteria-like contaminants or undetermined structures of *Frankia*. They were strikingly reminiscent of the 'exo-encapsulation threads' involved in the infection process of *Alnus* [7].

Some ENF colonies were carefully detached from the mother nodule and used to inoculate 10-week-old seedlings grown in N-free Hoagland solution. After 3–4 weeks, all the seedlings were heavily nodulated, indicating that *Frankia* from ENF colonies was infective.

4. CONCLUSION

Light microscope observations presented here suggest that, under the conditions of the experiments, *Frankia* was able to escape from some nodules as actively growing hyphae and to subse-

Fig. 2. Section through a nodule lobe showing the site of emergence (SE) of extranodular hyphae of *Frankia* (H). Heavily infected cells inside the nodule (arrow). Bar = $100 \mu\text{m}$.

Fig. 3. ENF growing along roots adjacent to the nodules. Bar = $100 \mu\text{m}$.

Fig. 4. Higher magnification of outlined area in Fig. 3 showing hyphae (H), spores-containing sporangia (S) on the root surface (R) of *C. equisetifolia*. Bar = $100 \mu\text{m}$.

Fig. 5. Bacteria-like rods (arrow) perpendicularly attached to the surface of root hairs in an area invaded by ENF (out of focus in the picture). Bar = $10 \mu\text{m}$.

Fig. 6. Micrograph montage showing hyphae (H), vesicles (V) and different types of sporangia observed in an ENF colony. Club-shaped (C), pear-shaped (P) and irregular-shaped (I) sporangia. Bar = $10 \mu\text{m}$.

quently proliferate in the vicinity of the nodule and on the adjacent rootlets where it produced vesicles and spore-containing sporangia, structures considered to be specific to *Frankia*. Since no significant growth of *Frankia* was detected in other sites of the root system of *Casuarina equisetifolia*, this extranodular growth occurring spontaneously was thought to be distinct from the growth of *Frankia* in the rhizosphere, which is a consequence of the well-known rhizosphere effect. The latter type of growth has been recently reported by Lalonde et al. [8] after spot inoculation of the root systems of *Alnus*. The ability of *Frankia* to grow and sporulate outside the nodule probably contributes actively to the dissemination of this actinomycete in the soils, a problem already encountered by Houwers and Akkermans [6]. Since vesicles were abundant in the ENF colonies, it was inferred that free N₂ fixation could occur in the extranodular zone. Further experiments are planned to verify this hypothesis.

Interestingly enough, it was possible to harvest the *Frankia* structures that grew outside the nodule and to use them as an infective inoculum for *Casuarina equisetifolia*; this finding indicates that the *Frankia* from ENF colonies retained their infectivity, in contrast with the non-infective strains we have hitherto isolated from nodules of *Casuarina* using the serial dilution technique and synthetic media [3,4]. This last result raises the question as to the origin of deviating non-infective strains already posed by the Dutch group [2,10].

It is unknown at this point whether the extranodular growth of *Frankia* occurs in natural

conditions or in host species other than *Casuarina equisetifolia*.

ACKNOWLEDGEMENTS

Additional financial support was provided by Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique, Paris (Contrat LAT OG2). We thank M. Boureau for the photographs.

REFERENCES

- [1] Becking, J.H. (1982) in *Microbiology of Tropical Soils* (Dommergues, Y.R. and Diem, H.G., Eds.) Nijhoff, The Hague, in press.
- [2] Burggraaf, A.J.P., Quispel, A., Tak, T. and Valstar, J. (1981) *Plant Soil*, 61, 157-168.
- [3] Diem, H.G., Gauthier, D. and Dommergues, Y.R. (1982) *Can. J. Microbiol.*, in press.
- [4] Gauthier, D., Diem, H.G. and Dommergues, Y.R. (1981) *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 306-308.
- [5] Hoagland, D.R. and Arnon, D.I. (1950) *The Water Culture Method for Growing Plants Without Soil*. Calif. Agric. Exp. Sta. Circ. 347.
- [6] Houwers, A. and Akkermans, A.D.L. (1981) *Plant Soil*, 61, 189-202.
- [7] Lalonde, M. (1977) in *Recent Developments in Nitrogen Fixation* (Newton, W., Postgate, J.R. and Rodriguez-Barreco, C., Eds.), pp. 569-589. Academic Press, London.
- [8] Lalonde, M., Calvert, H.E. and Pine, S. (1981) in *Current Perspectives in Nitrogen Fixation* (Gibson, A.H. and Newton, W.E., Eds.), pp. 296-312. Australian Academy of Science, Canberra.
- [9] Newcomb, W., Callaham, D., Torrey, J.G. and Peterson, R.L. (1979) *Bot. Gaz.* 140 (suppl.), S22-S34.
- [10] Quispel, A. and Tak, T. (1978) *New Phytol.* 81, 587-600.
- [11] Torrey, J.G. (1978) *BioScience*, 28, 586-592.
- [12] Tyson, J.H. and Silver, W.S. (1979) *Bot. Gaz.* 140 (Suppl.), S44-S48.

ARTICLE 6

In Vitro Nitrogen Fixation by Two Actinomycete Strains Isolated from *Casuarina* Nodules

D. GAUTHIER, H. G. DIEM, AND Y. DOMMERGUES*

Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, Centre National de la Recherche Scientifique, Dakar, Sénégal

Acetylene reduction activity was demonstrated in pure cultures of two actinomycete strains isolated from nodules of *Casuarina equisetifolia*. This activity was comparable to that of free-living *Rhizobium* strains, but appeared to be less sensitive to pO_2 and more sensitive to the presence of combined nitrogen.

It is well established that some strains of *Rhizobium* can exhibit nitrogenase activity when grown in vitro on defined media (2, 7, 8, 13, 14), but such activity has not been reported for actinomycete strains isolated from root nodules of N_2 -fixing nonlegumes. The present study was initiated to determine whether actinomycetal isolates from nodules of *Casuarina equisetifolia*, a nonleguminous tree widely introduced in tropical and semiarid countries, can express nitrogenase activity when grown in the absence of the plant host.

Two strains, designated D11 and G2, were isolated from nodules of *C. equisetifolia* sampled in Senegal (D11) and in Guadeloupe (G2). Seedlings of *C. equisetifolia* were grown axenically in test tubes (6) and inoculated at an age of 1 month with a suspension of crushed nodules. Nodules that developed after 2 months were used to obtain the isolates. Plates of agar QMOD medium (10) were inoculated with 1 ml of a 10^{-3} suspension of these nodules and incubated for 3 to 4 weeks. Since the actinomycete colonies are small (ca. 0.1 mm), the microscope had to be used to observe and isolate the strains. These colonies can be easily recognized since they exhibit a typical starfish-like appearance. Two features of isolates D11 and G2 (hyphae and sporangia with polyhedral spores) were very similar to those of actinomycete symbionts of the temperate nonlegume genera *Comptonia*, *Alnus*, and *Elaeagnus* as viewed both in culture (1, 4, 9, 11, 16) and in the nodule (17). But, in contrast with in vitro cultures of these temperate symbionts, our strains produced not only hyphae and sporangia but also vesicles (Fig. 1). Vesicles were formed on both Kalininskaya and QMOD media. Attempts to nodulate axenic seedlings of *Casuarina* sp. by inoculation with pure cultures of D11 and G2 have failed.

Isolates D11 and G2 were aerobically grown in a liquid QMOD medium at 30°C for 5 days by using a rotary shaker (108 rpm). The cultures were centrifuged, washed, suspended in a Kali-

ninskaya saline medium supplemented with malate (20 mM) as a carbon source, and adjusted to pH 7.0 (3) to the same volume as that of the initial culture. A portion (25 ml) of this suspension was placed in 150-ml vials with serum stoppers. The vials were evacuated and filled with a gas mixture containing 10% C_2H_2 , with increasing percentages of O_2 (2, 5, 10, 15, and 20%), and argon as the complementary gas. Incubation together with agitation was continued for 5 days at 30°C. During the incubation, there was no significant growth, but a profuse sporulation was observed together with the formation of vesicles. Specific acetylene reduction activity was measured daily by the method of Postgate (15) and was expressed as nanomoles of C_2H_4 produced per hour per milligram of protein, estimated by the method of Lowry et al. (12).

As shown in Fig. 2, the reduction of acetylene to ethylene by strain D11 occurred only in the presence of O_2 . Specific activities were highest when pO_2 was 10 kPa. Comparison of the specific acetylene reduction activity of strains D11 and G2 at different levels of pO_2 showed that the behavior of those strains was similar, with pO_2 optimal at 5 to 15 kPa (Fig. 3).

To check the effect of different sources of nitrogen upon nitrogenase synthesis, strains D11 and G2, which had been previously grown on QMOD medium for 5 days, were incubated by the procedure mentioned above with Kalininskaya saline medium with different nitrogen sources. Table 1 shows that yeast extract slightly stimulated nitrogenase activity at a low concentration (25 $\mu\text{g/ml}$) with little effect at higher concentrations (50 to 100 $\mu\text{g/ml}$). Repression by glutamine occurred when the concentration was equal to or higher than 0.54 mM. Nitrate and ammonium drastically repressed nitrogenase synthesis even at the lowest concentrations (2 mM) used.

This is the first report of nitrogen fixation by free-living actinomycetes isolated from nodules of a nitrogen-fixing nonlegume. Acetylene reduc-

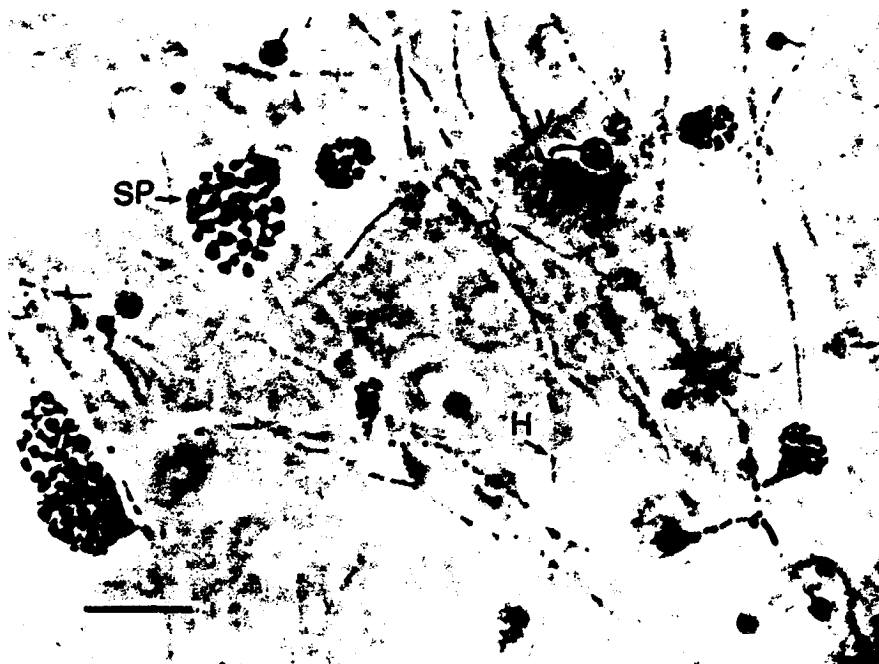


FIG. 1. Photomicrograph of a portion of a 14-day-old colony of strain D11, grown in QMOD medium, showing hyphae (H), vesicles (V), and mature sporangia (SP) with disaggregating polyhedral spores. Bar, 10 μm .

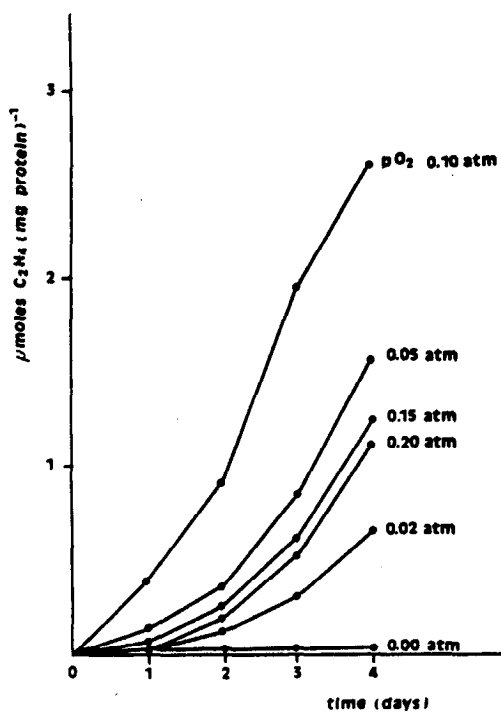


FIG. 2. Time course of derepression of nitrogenase biosynthesis at different $p\text{O}_2$ (strain D11).



FIG. 3. Specific nitrogenase activity at different $p\text{O}_2$ (strains D11 [●] and G2 [■]).

TABLE 1. Influence of different nitrogen sources on nitrogenase biosynthesis measured by the acetylene reduction method^a

| Nitrogen source ^b | Specific acetylene reduction activity (nmol of C ₂ H ₄ per h per mg of protein) | |
|------------------------------|---|-----------|
| | Strain D11 | Strain G2 |
| None (control) | 34 | 14 |
| Yeast extract (25 µg/ml) | 42 | 20 |
| Yeast extract (50 µg/ml) | 30 | 12 |
| Yeast extract (100 µg/ml) | 17 | 12 |
| L-Glutamine (0.25 mM) | 32 | 16 |
| L-Glutamine (0.54 mM) | 3 | 1 |
| L-Glutamine (1.1 mM) | 3 | 1 |
| KNO ₃ (2 mM) | 1 | 1 |
| KNO ₃ (5 mM) | 0 | 0 |
| KNO ₃ (10 mM) | 0 | 0 |
| NH ₄ Cl (2 mM) | 5 | 2 |
| NH ₄ Cl (10 mM) | 0 | 0 |
| NH ₄ Cl (20 mM) | 0 | 0 |

^a Actinomycete strains were incubated in agitated vials filled with a gas mixture containing 10% O₂ and 90% argon at 30°C for 5 days. The specific acetylene reduction activity was calculated by using the slope of the C₂H₄ production curve.

^b The medium contained malate (20 mM) and different amounts of combined nitrogen as indicated.

tion was ca. 10 to 30 nmol/h per mg of protein, which is comparable to values obtained for free-living *Rhizobium* strains which exhibited moderate acetylene reduction activities (2, 5). Since the incubation in the preliminary experiments reported here was carried out in agitated vials and the cell number was low, we assume that the concentration of dissolved O₂ in the culture was relatively high. Thus, it seems likely that our isolates fix nitrogen under more aerobic conditions than reported for free-living *Rhizobium* strains.

Nitrogenase synthesis by our isolates appeared to be more sensitive than *Rhizobium* strains to the presence of combined nitrogen, since *Rhizobium* strains are still able to form a significant amount of nitrogenase with an ammonium concentration of 40 mM (7).

Surprisingly, strains D11 and G2 did not initiate nodulation in the host plant. Failure to induce nodulation may indicate that these strains are noninfective in the pure culture condition as suggested by Knowlton et al. (7a) or that the requisite environmental conditions for nodulation were not achieved in our tests.

ADDENDUM IN PROOF

This note was in press when Tjepkema et al. (J. D. Tjepkema, W. Ormerod, and J. G. Torrey, Nature

[London] 287:633-635, 1980) reported that strains of *Frankia* isolated from *Comptonia peregrina* and *Alnus rubra* cultured in defined nutrient media could reduce acetylene.

LITERATURE CITED

1. Baker, D., J. G. Torrey, and G. H. Kidd. 1979. Isolation by sucrose-density fractionation and cultivation *in vitro* of actinomycetes from nitrogen-fixing root nodules. *Nature* (London) 281:76-78.
2. Bedmar, E. J., and J. Olivares. 1979. Nitrogen fixation (acetylene reduction) by free-living *Rhizobium meliloti*. *Curr. Microbiol.* 2:11-13.
3. Biggins, D. R., and J. R. Postgate. 1969. Nitrogen fixation by culture and cell-free extracts of *Mycobacterium flavum* 301. *J. Gen. Microbiol.* 56:181-193.
4. Callahan, D., P. Del Tredici, and J. G. Torrey. 1978. Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. *Science* 199:899-902.
5. Evans, R. W., and D. L. Keister. 1976. Reduction of acetylene by stationary cultures of free-living *Rhizobium* sp. under atmospheric oxygen levels. *Can. J. Microbiol.* 22:949-952.
6. Gibson, A. H. 1963. Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. I. The effect of root temperature on recently nodulated *Trifolium subterraneum* (L) plants. *Aust. J. Biol. Sci.* 16:28-42.
7. Keister, D. L. 1975. Acetylene reduction by pure culture of rhizobia. *J. Bacteriol.* 123:1265-1268.
- 7a. Knowlton, S., A. Berry, and J. G. Torrey. 1980. Evidence that associated soil bacteria may influence root hair infection of actinorhizal plants by *Frankia*. *Can. J. Microbiol.* 26:971-977.
8. Kurtz, W. G., and T. A. Larue. 1975. Nitrogenase activity in rhizobia in absence of plant host. *Nature* (London) 256:407-409.
9. Lalonde, M. 1978. Confirmation of the infectivity of a free-living actinomycete isolated from *Comptonia peregrina* root nodules by immunological and ultrastructural studies. *Can. J. Bot.* 56:2621-2635.
10. Lalonde, M., and H. E. Calvert. 1979. Production of *Frankia* hyphae and spores as an infective inoculant for *Alnus* species, p. 95-110. In J. C. Gordon, C. T. Wheeler, and D. A. Perry (ed.), *Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests*. Forest Research Laboratory, Oregon State University, Corvallis.
11. Lalonde, M., R. Knowles, and A. Fortin. 1975. Demonstration of the isolation of non-infective *Alnus crispa* var. *mollis* fern, nodule endophyte by morphological immunolabelling and whole cell composition studies. *Can. J. Microbiol.* 21:1901-1920.
12. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
13. McComb, J. A., J. Elliot, and M. J. Dilworth. 1975. Acetylene reduction by *Rhizobium* in pure culture. *Nature* (London) 256:409-410.
14. Pagan, J. D., J. J. Child, W. R. Scrowcroft, and A. H. Gibson. 1975. Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on a defined medium. *Nature* (London) 256:406-407.
15. Postgate, J. R. 1972. The acetylene reduction test for nitrogen fixation, p. 343-356. In J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 2B. Academic Press, Inc., London.
16. Torrey, G. H. 1978. Nitrogen fixation by actinomycete nodulated angiosperms. *Bioscience* 28:586-592.
17. Van Dijk, C., and E. Merkus. 1976. A microscopical study of the development of a spore like stage in the life cycle of the root-nodule endophyte of *Alnus glutinosa* (L) Gaertn. *New Phytol.* 77:73-91.

ARTICLE 7

Effect of L-methionine-DL-sulfoximine on acetylene reduction and vesicle formation in derepressed cultures of *Frankia* strain D11

D. L. GAUTHIER

Orstom, Dakar, BP 1386 Senegal

Accepted February 23, 1983

GAUTHIER, D. L. 1983. Effect of L-methionine-DL-sulfoximine on acetylene reduction and vesicle formation in derepressed cultures of *Frankia* strain D11. *Can. J. Microbiol.* 29: 1003–1006.

L-Methionine-DL-sulfoximine, a glutamate analog known to inhibit glutamine synthetase (GS) and glutamate synthase (GOGAT), allowed nitrogenase biosynthesis by *Frankia* strain D11 in presence of NH_4^+ . GS activity, detected in cell-free extracts of D11, was higher in N_2 -fixing than in nonfixing conditions. These facts suggested that nitrogenase biosynthesis in *Frankia* was probably regulated by GS, GOGAT, or a product of their reaction, but regulation of GS by an adenylation–unadenylation system was probably not involved. Similarities between *Frankia* and *Anabaena cylindrica* were stressed.

GAUTHIER, D. L. 1983. Effect of L-methionine-DL-sulfoximine on acetylene reduction and vesicle formation in derepressed cultures of *Frankia* strain D11. *Can. J. Microbiol.* 29: 1003–1006.

Un analogue du glutamate, la L-méthionine-DL-sulfoximine, inhibiteur des activités glutamine synthétase (GS) et glutamate synthase (GOGAT), permet la dérèpression de la biosynthèse de la nitrogénase en présence de NH_4^+ chez la souche de *Frankia* D11. En ce qui concerne l'activité GS, cette dernière est plus importante dans les extraits bruts de cultures de D11 réduisant l'acétylène que dans ceux provenant de cultures réprimées. D'autre part, il n'a pas été possible de mettre en évidence un système d'adénylation de la GS chez la souche D11. Ces résultats suggèrent que le NH_4^+ *per se* n'est pas l'effecteur de la régulation de la biosynthèse de la nitrogénase mais que cette dernière est probablement sous le contrôle des enzymes de l'assimilation de l'azote (GS et GOGAT). Enfin, quelques points de similarité entre *Frankia* et *Anabaena cylindrica* sont relevés.

In an earlier paper (Gauthier *et al.* 1981), we reported that a strain isolated from *Casuarina equisetifolia* (D11) reduces acetylene *in vitro* and NH_4^+ inhibits nitrogenase biosynthesis, a fact also related by Tjepkema *et al.* (1980, 1981). Using strain D11 we want to know if NH_4^+ is the actual effector for nitrogenase repression or if nitrogenase repression is governed by the enzymes of nitrogen assimilation, namely, glutamine synthetase (GS) and glutamate synthase (GOGAT) as in other nitrogen-fixing microorganisms such as *Klebsiella pneumoniae* (Tubb 1974), *Azospirillum* (Okon *et al.* 1976; Gauthier and Elmerich 1977), and *Anabaena cylindrica* (Dharmawardene *et al.* 1973). To determine if NH_4^+ assimilation is required for the inhibition of nitrogenase biosynthesis, we added methionine sulfoximine (MSX), a glutamate analog known to inhibit both GS and GOGAT (Gordon and Brill 1974; Stewart and Rowell 1975). We also explored the effect of MSX on vesicle production.

Material and methods

Strain

Strain D11 of *Frankia* isolated from nodules of *Casuarina* was that described by Gauthier *et al.* (1981) and Diem *et al.* (1982).

Growth conditions

D11 was aerobically grown in liquid QMOD medium (Lalonde and Calvert 1979) at 30°C for 10 days without shaking. In this medium vesicles were produced. When QMOD medium was supplemented with NH_4Cl (20 mM), no vesicles were formed.

Derepression of nitrogenase biosynthesis

Cultures of D11 from QMOD or QMOD + NH_4Cl were centrifuged and resuspended in an equal volume of the following nitrogen-free medium (NFM) (grams per litre): KH_2PO_4 , 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01; FeSO_4 , 0.01; Na succinate, 1.2; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.005; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.025; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.007; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.00125; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0014; H_3BO_3 , 0.0003; pH 6.8. Portions (25 mL) of this suspension were placed in 145-mL vials with serum stoppers in air containing 10% C_2H_2 and maintained at 30°C without shaking.

Acetylene reduction activity (ARA)

ARA was measured daily by the method of Postgate (1972) for 8 days and was expressed as nanomoles of C_2H_4 produced per hour and per milligram of dry weight. Supplementation with NH_4Cl and (or) MSX was performed at the rate of 20 and 10 mM, respectively.

Glutamine synthetase activity (GS)

GS was determined in two cultures of D11: (i) a culture of D11 grown in QMOD medium for 10 days (repressed culture), and (ii) a culture of D11 grown in QMOD for 10 days and then derepressed in NFM for 8 days (derepressed culture). Cell-free extracts were obtained by passage through a French press at 18 000 psi (1 psi = 6.894 757 kPa) in Imidazol–HCl buffer (10 mM, pH 7.1) containing 10 mM MnCl_2 and 1 mM mercaptoethanol.

GS activity was estimated by the glutamyltransferase assay (Shapiro and Stadtman 1970). Relative adenylation of GS in crude extracts was estimated by the snake venom phosphodiesterase (SVD) method (Bishop *et al.* 1975) and also from the transferase assay conducted in the presence or absence of 60 mM MgCl_2 (Bishop *et al.* 1975).

Protein content

Protein content was estimated by the method of Lowry *et al.* (1951).

Enumeration of vesicles

D11 cultures were centrifuged, resuspended in a known volume of phosphate buffer, homogenized, and counted in a Petroff-Hausser chamber under phase illumination.

Results

When one compares the effect of different media on ARA and vesicle production by D11 (Table 1), one finds that QMOD medium allowed the production of vesicles without ARA expressed. NFM allowed both ARA and the production of vesicles. Supplementation with a nitrogen source, such as NH_4Cl or glutamine, inhibited both ARA and vesicle production.

A culture of D11 grown in QMOD medium, thus containing vesicles, could not derepress its nitrogenase biosynthesis in the presence of NH_4Cl (20 mM), but this inhibition could be partly overcome by addition of MSX (Table 2).

An experiment similar to that reported in Table 2 was made using a culture of D11, which being grown in QMOD medium supplemented with NH_4Cl (20 mM) was thus devoid of preexisting vesicles. NH_4^+ inhibited both ARA and vesicles production, but adding MSX restored ARA and vesicle production even in the presence of NH_4^+ (Table 3).

When one compares the GS activity in cell-free extracts from D11 cultures grown on QMOD medium or from the same culture derepressed in NFM medium, one observes that this activity was higher in the derepressed culture than in the repressed one (Table 4).

In contrast with what was observed with other nitrogen-fixing organisms, such as *Azospirillum* (Okon *et al.* 1976), addition of SVD did not markedly alter the relative adenylation (+Mg/-Mg) of GS (Table 4).

Discussion

Two facts suggest that NH_4^+ was not the actual effector and that nitrogenase biosynthesis was possibly regulated by GS, GOGAT, or a product of their reaction. First MSX, a glutamate analog known to inhibit GS and GOGAT, allowed nitrogenase biosyn-

TABLE 1. Effect of different media on acetylene reduction activity (ARA) and vesicle production in *Frankia* strain D11

| Medium ^a | ARA | Vesicle production |
|---|-----|--------------------|
| QMOD | - | + |
| QMOD + NH_4Cl (20 mM) | - | - |
| QMOD + glutamine (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | - | - |
| NFM | + | + |
| NFM + NH_4Cl (20 mM) | - | - |

NOTE: NFM, nitrogen-free medium.

^aIn all assays *Frankia* was grown aerobically.

TABLE 2. Derepression (under air) of nitrogenase biosynthesis in a culture of D11 with preexisting vesicles (obtained in QMOD medium)

| Medium | ARA ^a |
|--|------------------|
| NFM + NH_4Cl (20 mM) | 0 |
| NFM + MSX (10 mM) | 25 |
| NFM + NH_4Cl (20 mM) + MSX (10 mM) | 10 |

NOTE: NFM, nitrogen-free medium; MSX, L-methionine-DL-sulfoximine.

^aExpressed as nanomoles C_2H_4 per hour per milligram dry weight.

thesis in the presence of NH_4^+ . Second, GS activity was actually detected in cell-free extracts of D11, this activity being higher in nitrogen-fixing conditions (derepression in NFM medium) than in nonfixing conditions (QMOD medium) (Table 4). However, the hypothesis that nitrogenase biosynthesis is regulated by GS should be further tested using GS mutants of strain D11 as in the case of *Klebsiella pneumoniae* (Streicher *et al.* 1974) or *Azospirillum* (Gauthier and Elmerich 1977).

The fact that adding SVD to cell-free extracts of D11 did not affect the relative adenylation (+Mg/-Mg) suggests that GS in strain D11 is not regulated through the adenylation-unadenylation system found in *E. Coli* (Wuff *et al.* 1967).

Vesicle formation was always required for the expression of nitrogenase activity, a conclusion already stressed by Tjepkema *et al.* (1981); however, from our data we

TABLE 3. Derepression (under air) of nitrogenase activity and vesicle production in a culture of D11 devoid of preexisting vesicles (obtained in QMOD medium supplemented with 20 mM NH_4Cl)

| Medium | ARA ^a | No. of vesicles ^b |
|--|------------------|------------------------------|
| NFM + NH_4Cl (20 mM) | 0 | 0 |
| NFM + MSX (10 mM) | 18 | 13 |
| NFM + NH_4Cl (20 mM) + MSX (10 mM) | 7 | 5 |

NOTE: NFM, nitrogen-free medium; MSX, L-methionine-DL-sulfoximine.

^aExpressed as nanomoles C_2H_4 per hour per milligram dry weight.

^bExpressed as $\times 10^6$ per milligram dry weight.

cannot infer that vesicle formation is regulated in the same way as nitrogenase biosynthesis.

The general behaviour of strain D11 was reminiscent of that of *Anabaena cylindrica*, since the biosynthesis of nitrogenase by the latter organism is restored by MSX in presence of NH_4^+ (Stewart and Rowell 1975) and its GS has no adenylation–adenylylation system (Dharmawardene *et al.* 1973; Rowell *et al.* 1979). Another similarity between *Frankia* and *Anabaena cylindrica* is that both organisms are filamentous and able to develop specialized structures which are the site of nitrogen fixation: vesicles in *Frankia* and heterocysts in *Anabaena cylindrica*.

- BISHOP, P. E., R. H. MCPARLAND, and H. J. EVANS. 1975. Inhibition of the adenylylation of glutamine synthetase by methionine sulfone during nitrogenase derepression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67: 774–781.
- DHARMAWARDENE, M. W. N., A. HAYSTEAD, and W. D. P. STEWART. 1973. Glutamine synthetase of the nitrogen-fixing alga *Anabaena cylindrica*. *Arch. Mikrobiol.* 90: 281–295.
- DIEM, H. G., D. GAUTHIER, and Y. R. DOMMERS. 1982. Isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina equisetifolia*. *Can. J. Microbiol.* 28: 526–530.
- GAUTHIER, D., H. G. DIEM, and Y. R. DOMMERS. 1981. *In vitro* nitrogen fixation by two actinomycete strains isolated from *Casuarina* nodule. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 306–308.
- GAUTHIER, D., and C. ELMERICH. 1977. Relationship between glutamine synthetase and nitrogenase in *Spirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2: 101–104.
- GORDON, J. K., and W. J. BRILL. 1974. Derepression of nitrogenase synthesis in presence of excess NH_3^+ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59: 967–971.
- LALONDE, M., and H. E. CALVERT. 1979. Production of *Frankia hyphae* and spores as an infective inoculant for *Alnus* species. In *Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests*. Edited by J. C. Gordon, C. T. Wheeler, and D. A. Perry. Forest Research Laboratory, Oregon State University, Corvallis. pp. 95–110.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.
- OKON, Y., S. L. ALBRECHT, and R. H. BURRIS. 1976. Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.* 128: 592–597.
- POSTGATE, J. R. 1972. The acetylene reduction test for nitrogen fixation. In *Methods in microbiology*. Vol. 6B. Edited by J. R. Norris and D. W. Ribbons. Academic Press, New York. pp. 343–356.
- ROWELL, P., S. ENTICOTT, and W. D. L. STEWART. 1979. Glutamine synthetase and nitrogenase activity in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *New. Phytol.* 79: 41–54.
- SHAPIRO, B. M., and E. R. STADTMAN. 1970. Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). In *Methods in enzymology*. Vol. XVIIIA. Edited by H. Tabor and C. White-Tabor. Academic Press, New York. pp. 910–922.

TABLE 4. Specific glutamine synthetase activity in strain D11

| Medium | Transferase assay ^a | | | Relative adenylylation ^b | |
|---------------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------------|---------------------------------------|--|
| | –Mg ²⁺ | +Mg ²⁺ | –Mg ²⁺ + SVD | +Mg ²⁺ / –Mg ²⁺ | (+Mg ²⁺ / –Mg ²⁺) + SVD |
| QMOD (repressed culture) | 7.00 | 0.70 | 2.80 | 0.09 | 0.08 |
| NFM (derepressed culture) | 12.00 | 0.60 | 8.20 | 0.05 | 0.07 |

Note: +Mg²⁺, transferase assay with Mn²⁺ (3 mM) and Mg²⁺ (60 mM); –Mg²⁺, transferase assay with Mn²⁺ (3 mM) only; +SVD, cell-free extract incubated 3 h in snake venom phosphodiesterase (10 µg/mL) at 37°C; NFM, nitrogen-free medium.

^aGS activity measured by transferase assay is expressed as micromoles γ-glutamyl-hydroxamate per 10 minutes per milligram of protein. The assay mixture was as follows in a final volume of 1.0 mL: glutamine, 30 mM; hydroxylamine-HCl, 30 mM; sodium ADP, 0.4 mM; sodium arsenate, 20 mM; MnCl₂, 3 mM in Imidazol-HCl buffer, 80 mM; pH 7.1.

- STEWART, W. D. P., and P. ROWELL. 1975. Effects of L-methionine-DL-sulfoximine on the assimilation of newly fixed NH_3 , acetylene reduction and heterocyst production in *Anabaena cylindrica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**: 846-856.
- STREICHER, S. L., K. T. SHANMUGAN, F. AUSUBEL, C. MORANDI, and R. C. GOLDBERG. 1974. Regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*. Evidence for a role of glutamine synthetase as a regulator of nitrogenase synthesis. *J. Bacteriol.* **120**: 815-821.
- TJEPKEMA, J. D., W. ORMEROD, and J. G. TORREY. 1980. On vesicle formation and *in vitro* acetylene reduction by *Frankia*. *Nature (London)*, **287**: 633-635.
- . 1981. Factors affecting vesicle formation and acetylene reduction (nitrogenase activity) in *Frankia* sp. CP11. *Can. J. Microbiol.* **27**: 815-823.
- TUBB, R. S. 1974. Glutamine synthetase and ammonium regulation of nitrogen synthesis in *Klebsiella*. *Nature (London)*, **251**: 481-485.
- WULFF, K., D. MECKE, and H. HOLZER. 1967. Mechanism of the enzymatic inactivation of glutamine synthetase from *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**: 740-745.

ARTICLE 8

ASSESSMENT OF N₂ FIXATION BY *CASUARINA* *EQUISETIFOLIA* INOCULATED WITH *FRANKIA* ORS021001 USING ¹⁵N METHODS

D. GAUTHIER, H. G. DIEM and Y. R. DOMMERGUES

Centre National de la Recherche Scientifique, Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer,
B.P. 1386, Dakar, Sénégal

and

F. GANRY

Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, Institut de Recherche Agronomique Tropicale, Bambeby,
Sénégal

(Accepted 25 October 1984)

Summary—*Casuarina equisetifolia* seedlings, uninoculated or inoculated with *Frankia* strain ORS021001 were grown for 4.5 months in pouches, then transplanted into 1 m³ concrete containers forming 1 m² microplots. Trees were harvested 6.5 months later when they were 11 months old. N₂ fixation was measured using three methods of assessment: the direct isotopic method, the A-value method and the difference method. Estimations of N₂ fixation during the 6.5 months following transplantation were respectively 3.27, 2.31 and 3.07 g N₂ per tree. From these values it was calculated that about 40–60 kg N₂ would be fixed per hectare in a year at normal densities of 10,000 trees ha⁻¹. The results of this experiment confirm that *Frankia* strain ORS021001 can be confidently recommended to inoculate casuarinas in the field. Means to improve nodulation and subsequently N₂ fixation by casuarinas are discussed.

INTRODUCTION

The outstanding ability of casuarinas to thrive in poor N-deficient soils is due to their association with *Frankia*, the symbiotic N₂-fixing actinomycete forming nodules on their roots. Because of this characteristic, casuarinas can give a high yield of biomass as well as be exploited as timber, firewood or charcoal in many tropical countries. Furthermore casuarinas are sometimes used in rotational agriculture to improve the N status of soil. Casuarinas are then planted in wasted, N-deficient soils, grown for 5–10 yr, cleared for wood or charcoal, after which the land is planted with various crops, such as yams in New Guinea (Silvester, 1976) or non-N₂-fixing trees such as *Anacardium occidentale* for the production of cashew nuts in India (J.C.G. Ottow, personal communication). The crops or forest plantations following casuarinas benefit from the soil N accretion resulting from the N₂-fixing activity of the actinorhizal tree. Thus it is a primary task to evaluate the amount of N₂ actually fixed by field-grown casuarinas. Up to now, only two estimations have been published. The first one by Hannon, quoted by Silvester (1977), is related to a stand of *Allocausuarina littoralis* near Sydney, Australia. The litter fall was estimated as 29 t ha⁻¹ yr⁻¹. Since this litter contained 1% N, the N circulation rate in it was estimated to be 290 k N ha⁻¹ yr⁻¹. Taking into account the fact that the N content of all the soils in the region was less than 0.1% it was assumed that at least 75% of this N was recently fixed, thus suggesting a fixation rate of 218 kg N₂ ha⁻¹ yr⁻¹.

The second estimation is related to a 13-yr-old *Casuarina equisetifolia* stand established in the sand dunes of the Cap-Vert peninsula 30 km from Dakar

(Dommergues, 1963). By comparing the soil and tree N content of a planted plot with the soil N content of an adjacent plot devoid of vegetation, the mean N₂ fixation rate was calculated to be ca. 58 kg N₂ ha⁻¹ yr⁻¹.

Since the results mentioned above are questionable because the methods of estimation are not the most reliable and since we wanted to check the effectiveness of recently isolated strain of *Frankia* ORS021001 (Diem *et al.*, 1982), we decided to apply the ¹⁵N-tracer technique. We report here the results of a study to evaluate N₂ fixation by *Casuarina equisetifolia* inoculated with *Frankia* ORS021001 and growing in conditions very close to those encountered in the open field. This experiment covered a growth period of 6.5 months thus providing a basis for estimation of the annual N₂ fixation. Three different methods for measuring N₂ fixation were compared: the direct isotopic dilution method, the A-value method and the difference method.

It is now well known that casuarina roots have symbioses not only with *Frankia* but also with ecto- (Bamber *et al.*, 1980) or endomycorrhizal fungi (Rose, 1980; Diem *et al.*, 1981) that help the trees scavenge mineral nutrients, especially P, thus enhancing nodulation and N₂ fixation (Diem and Gauthier, 1982). However this response to mycorrhizal infection occurs only when the soil content in available P is low (≤ 10 kg P ha⁻¹). Since the aim of the experiment reported here was not to study the effect of mycorrhizal fungi we added to the soil a relatively high level of P (30 kg P ha⁻¹) at the onset of the experiment and later N-free Hewitt (1966) solution so that the plant requirements in elements other than N were largely fulfilled, thus masking a possible effect of any mycorrhizal infection.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted from July 1982 to May 1983 at the ORSTOM Bel Air Station in Dakar, Senegal, in twelve 1 m³ concrete containers forming 1 m² microplots. The soil used was Bel Air soil, a typical sandy (93% sand), neutral (pH 7.0) soil, with C and N contents of 0.3 and 0.025% respectively (psamment; vernacular name: Dior). The soil was carefully homogenised, introduced into the concrete containers and finally fumigated with methyl bromide.

Seeds of *Casuarina equisetifolia* harvested in the vicinity of Dakar were sown in sterile Bel Air soil. When 1-month-old, the seedlings were planted into 5 × 25 cm polyethylene pouches filled with a mixture of vermiculite and sterile soil (1:5). The seedlings were inoculated by dipping their roots in a suspension of a 2-month-old culture of *Frankia* ORS021001 grown at 28°C in liquid QMOD medium (Lalonde and Calvert, 1979), the amount of *Frankia* inoculum added to each plant being equivalent to 3 µg protein.

Plants were raised in the pouches for 3.5 months and then transplanted into the microplots with four plants per microplot, all of which received PK as K₂HPO₄ at the rate of 17 g m⁻².

Treatments

At transplantation time three treatments with four replications each were used as follows:

Treatment 1. No inoculation; application of ¹⁵N-labelled NH₄⁺-N at the rate of 2 g N m⁻² (i.e. 0.5 g N plant⁻¹) as a solution of (15NH₄)₂SO₄ containing 10.5 atom% ¹⁵N excess.

Treatment 2. No inoculation; application of ¹⁵N-labelled NH₄⁺-N at the rate of 10 g N m⁻² (i.e. 2.5 g N plant⁻¹) as a solution of (15NH₄)₂SO₄ containing 1.9 atom% ¹⁵N excess.

Treatment 3. Inoculation with *Frankia* ORS021001; application of ¹⁵N-labelled fertilizer as in treatment 1.

Throughout their growth the plants were carefully irrigated. When the plants were 8 months old, they exhibited symptoms of an undefined nutrient deficiency which was eliminated following application of 1 l of Hewitt (1966) N-free nutrient solution to each microplot every 2 weeks. Plants were harvested 6.5 months after transplantation to the microplots when they were 11 months old. Three out of the 16 plants in treatment 1 and three out of 16 plants in treatment 2 were found to bear nodules. These contaminated plants were discarded so that calculations were based on 13 plants instead of 16 in treatments 1 and 2.

Estimation of N₂ fixation

Shoots were divided into three fractions: cladodes, branchlets (dia < 4 mm), and stems plus branches (dia > 4 mm), dried to a constant weight at 60–70°C. Then each fraction was completely ground into 100 µm powder. Samples of each powdered fraction were analyzed for total N and ¹⁵N. ¹⁵N analyzes were carried out at the Seibersdorf Laboratory (IAEA) using Dumas' method (the combustion performed in this technique converts total N directly to N₂) and

Table 1. Influence of inoculation with *Frankia* ORS021001 on nodule weight, height, dry weight and N content of 11-month-old *Casuarina equisetifolia*¹

| Treatments ² | Nodule weight (g tree ⁻¹) | Height (cm) | Dry weight (g tree ⁻¹) | | | N content (%) | | |
|-------------------------|---------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| | | | Cladodes | Branchlets (dia ≤ 4 mm) | Stems and branches (dia > 4 mm) | Cladodes | Branchlets (dia ≤ 4 mm) | Stems and branches (dia > 4 mm) |
| 1 | 0 | 170 ± 22 ^a | 151 ± 32 ^a | 43 ± 13 ^a | 100 ± 27 ^a | 0.86 ± 0.05 ^a | 0.36 ± 0.02 ^a | 0.30 ± 0.01 ^a |
| 2 | 0 | 192 ± 20 ^{ab} | 204 ± 58 ^{ab} | 66 ± 18 ^b | 140 ± 34 ^{ab} | 1.00 ± 0.09 ^{ab} | 0.39 ± 0.03 ^a | 0.29 ± 0.04 ^a |
| 3 | 17 ± 9 | 216 ± 21 ^b | 260 ± 88 ^b | 76 ± 20 ^b | 188 ± 58 ^b | 1.30 ± 0.14 ^b | 0.54 ± 0.05 ^b | 0.40 ± 0.09 ^b |
| | | | Total | | | | | |
| | | | 295 ± 70 ^a | | | | | |
| | | | 409 ± 105 ^{ab} | | | | | |
| | | | 525 ± 162 ^b | | | | | |
| | | | | | | | | N total (g tree ⁻¹) |
| | | | | | | | | 1.77 ± 0.45 ^a |
| | | | | | | | | 2.71 ± 0.75 ^a |
| | | | | | | | | 4.78 ± 1.90 ^b |

¹Mean values ± confidence interval (P = 0.05).

²Treatment 1: uninoculated trees with application of ¹⁵N-labelled fertilizer, 0.5 g N tree⁻¹; Treatment 2: uninoculated trees with application of ¹⁵N-labelled fertilizer, 2.5 g N tree⁻¹; Treatment 3: inoculated trees with application of ¹⁵N-labelled fertilizer, 0.5 g N tree⁻¹. For each experiment, numbers in column with same letter do not differ significantly, P = 0.05 (Duncan, 1955).

emission spectrometry. For each individual tree N and ¹⁵N values were calculated taking into account the weight, N and ¹⁵N contents of the different fractions of the tree (cladodes, branchlets, stems and branches).

As already indicated in the Introduction N₂ fixation was assessed using three methods: the direct isotope dilution method (Bremner, 1977; Fried and Middleboe, 1977; Vose *et al.*, 1982) the A-value method proposed by Fried and Broeschart (1975) and the difference method (Williams *et al.*, 1977).

(a) *Use of the direct isotope dilution method.* The percentage *y* of the plant N derived from N₂ fixation was calculated according to the formula:

$$y = 1 - \frac{en}{eo}$$

eo and *en* being the atom% ¹⁵N excess in non-N₂-fixing and N₂-fixing plants respectively.

The individual *y* values for each of the 16 N₂-fixing plants were calculated taking into account each of the *en* values whereas *eo* was the average value for the non-N₂-fixing trees.

If *N* was the total content of each N₂-fixing tree, N₂ fixed per tree was:

$$Y = \frac{y \times N}{100}$$

(b) *Use of the A-value method.* In this modification of the isotope dilution method proposed by Fried and Broeschart (1975), the ¹⁵N-labelled fertilizer is applied at a low rate to the N₂-fixing plant but at a normal (higher) rate to the non-N₂-fixing plant.

The A-value method involves the assumption that, when confronted with different sources of N, the plant uptake is directly proportional to the amount of N available in each source, provided that this amount is measured in the same unit, designated A. This unit is expressed as fertilizer N equivalent:

$$\begin{aligned} & \frac{\% \text{ N derived from fertilizer}}{\text{A-value of fertilizer}} \\ &= \frac{\% \text{ N derived from N}_2 \text{ fixation (} y \text{)}}{\text{A-value of N}_2 \text{ fixation}} \\ &= \frac{\% \text{ N derived from soil}}{\text{A-value of soil}} \end{aligned}$$

The available amount of soil plus fixed N is determined using the N₂-fixing plants:

$$\begin{aligned} & \text{A "soil + fix"} \\ &= \frac{(100 - fn) \times \text{fertilizer rate (N}_2\text{-fixing plants)}}{fn} \end{aligned}$$

The available amount of soil N is determined using the non-N₂-fixing plants:

$$\begin{aligned} & \text{A "soil"} \\ &= \frac{(100 - fo) \times \text{fertilizer rate (non-N}_2\text{-fixing plants)}}{fo} \end{aligned}$$

and the A-value for fixed N₂ is:

$$\text{A "fix"} = \text{A "soil + fix"} - \text{A "soil"}$$

fn and *fo* being the percentages of N derived from fertilizer in N₂-fixing and non-N₂-fixing plants re-

spectively:

$$fn = \frac{en}{efn} \quad \text{and} \quad fo = \frac{eo}{efo}$$

en and *eo* being the atom% ¹⁵N excess in N₂-fixing and non-N₂-fixing plants respectively and *efn* and *efo* the atom% ¹⁵N excess in the fertilizer applied on N₂-fixing and non-N₂-fixing plants respectively.

The percentage *y* of the total plant N derived from N₂ fixation is calculated using the formula:

$$y = \frac{\text{A "fix"} \times fn}{\text{fertilizer rate (N}_2\text{-fixing plants)}}$$

We calculated the average A "soil" value which was considered as a constant in our experiment. For each individual N₂-fixing (inoculated) plant, we calculated A "soil + fix", A "fix.", *y* and finally the amount of N₂ fixed per plant:

$$Y = \frac{y \times N}{100} \quad (5)$$

where *N* was the total N content of each plant.

(c) *Use of the difference method.* For each individual N₂-fixing plant (treatment 3), N₂ fixation was estimated to be the difference between the total N content of the harvested portion of each of these plants and the average total N content of harvested portion of uninoculated ones.

RESULTS

N₂ fixation by *Casuarina equisetifolia*

When they were transplanted the seedlings were 4.5 months old, the height of inoculated seedlings was *ca.* 30 cm and that of uninoculated ones was *ca.* 25 cm. The mean N content of inoculated seedlings was ≤ 30 mg plant⁻¹. Thus N₂ fixation before transplantation was ≤ 30 mg plant⁻¹, which is negligible in comparison to the amount of N₂ fixed after transplantation. Therefore N₂ fixation values presented hereafter are related to the 6.5 months following transplantation to the field. During this period N₂ fixation was 2.31–3.27 g N₂ fixed tree⁻¹, depending on the method of assessment (Table 2). If we assume that N₂ fixation would have been stabilized at this rate during the whole year following transplantation, extrapolation would give figures in the range of 4.26–6.04 g N₂ fixed plant⁻¹ yr⁻¹.

Table 2 indicates that in 95 out of 100 times we can expect a large variation in the estimation of N₂ fixation since the related values lie within the range of 0.84–4.93 N₂ fixed plant⁻¹ if we take into account the highest and the lowest figures calculated from the three methods.

Table 2. N₂ fixation by 11-month-old *Casuarina equisetifolia* as estimated by three different methods¹

| Methods | N ₂ fixation ² expressed as | |
|-------------------------|--|--|
| | Per cent N derived from N ₂ fixation (<i>y</i>) | g N ₂ fixed tree ⁻¹ (<i>Y</i>) |
| Direct isotope dilution | 55.0 ± 11.0 | 3.27 ± 1.60 |
| A-value | 39.1 ± 11.9 | 2.31 ± 1.47 |
| Difference | 49.0 ± 14.8 | 3.07 ± 1.86 |

¹Mean values ± confidence interval (*P* = 0.05).

²For the period of 6.5 months following transplantation to the field.

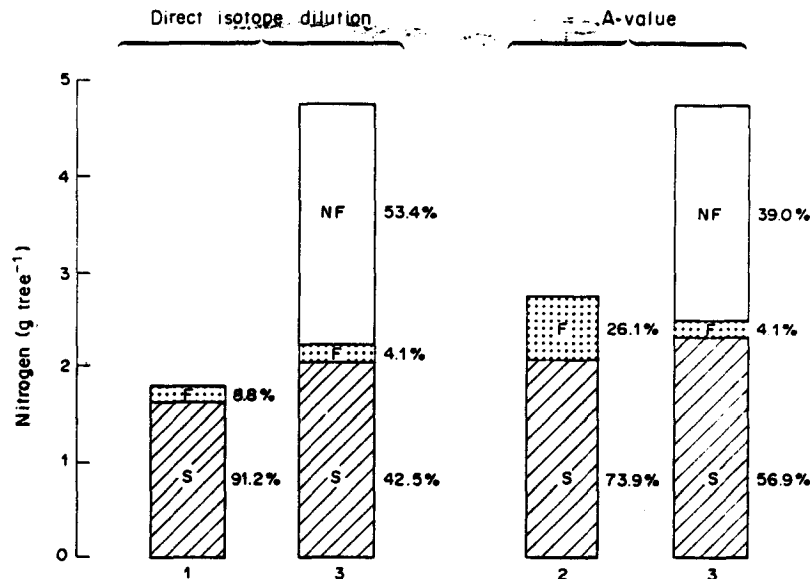


Fig. 1. Contribution of soil (S), fertilizer (F) and N₂ fixation (NF) to the N nutrition of *Casuarina equisetifolia* as assessed using direct isotope (left) and A-value (right) methods. Results expressed as g of N tree⁻¹ or as percentage of total N content of the trees. Numbers 1, 2 and 3 refer to the treatments as defined in the text.

Nitrogen uptake from soil and fertilizer

The percentage of plant N derived from soil by N₂-fixing plants was 42.5 or 56.9% according to the method of assessment used (Fig. 1). The percentage of plant N derived from fertilizer was 4.1–8.8% (lower application of fertilizer) and 26.1% (higher application of fertilizer). The contribution of N fertilizer to plant nutrition was small probably because the percentage of utilization of N fertilizer remained low (27.12–31.26%), a situation comparable to that reported for soybean and millet in other Senegalese soils (F. Garry, unpublished data).

DISCUSSION

N₂ fixation by *Casuarina equisetifolia*

From the values on Table 2 it can be calculated that at normal planting densities for *Casuarina equisetifolia*, i.e. 10,000 trees ha⁻¹ (Kondas, 1983), in the presence of 20 kg fertilizer N ha⁻¹, N₂ fixation would be in the range of 40–60 kg N₂ fixed ha⁻¹ yr⁻¹. The three methods used led to N₂ fixation estimates not very different from each other. The ¹⁵N based estimates should be interpreted with caution since the methods used involve not only the assumption that the N₂-fixing plant takes up N from soil and added ¹⁵N-labelled fertilizer in the same ratio, but also that the time courses of declining ¹⁵N enrichment in N and of assimilation of N for the nodulated and non-nodulated treatments are the same (Witty, 1983). The difference based estimates differ somewhat from the ¹⁵N estimates probably for the reason, suggested by Witty (1983), that the relative fertilizer uptake of non-N₂-fixing and N₂-fixing casuarinas differ, being 8.8 and 4.1% respectively (Fig. 1).

Further field experiments are required to improve the accuracy of the ¹⁵N method used, especially by, attempting to get more stable soil enrichment

throughout the experiment (Witty, 1983). In addition it would be desirable (1) to study more extensively the influence of plantation density on N₂ fixation taking into account the fact that in semi-arid conditions many plantations do not contain more than 2000 trees ha⁻¹ (Andeke-Lengui and Dommergues, 1983; Ataia, 1983); (2) to follow up the N₂-fixing activity of aging plantations, this activity supposedly increasing up to 5–10 yr of age, then decreasing with the progressive accumulation of N in the forest litter.

Variation in the N₂-fixing potential of individual trees

This variation could not be attributed to the endophyte, since trees were inoculated with a pure strain of *Frankia* and contamination by external strains was unlikely. Nor could the variation be due to soil heterogeneity, because the soil was carefully homogenized before filling the microplots. Since Table 1 shows that the total dry weight of trees was in the range of 363–687 g ($P = 0.05$), which indicates a heterogeneous growth, we assume that a large part of the variation in N₂ fixation was due to differences in individual tree growth. These differences were probably related (i) to the intrinsic genetic variability of the trees, which were all obtained from seed and exhibited conspicuous differences in shape and colour; (ii) to variations in the physiological state of the seedlings at the time of transplantation, the effect of these variations being intensified by competitive interactions between the trees growing in the same microplot and (iii) to the fact that we used a minimal inoculum, which may not have allowed a homogeneous infection of the root systems.

Improving the growth of casuarinas by proper inoculation

We have seen (Table 1) that inoculation significantly increased the yield of the casuarina trees expressed as total N g tree⁻¹ ($\times 2.70$) whereas the

application of N fertilizer at a rate of 2.5 g tree⁻¹, considered a high rate by silvicultural standards, induced a much lower, and non-significant, yield increase ($\times 1.53$). Thus inoculation appears to be a more efficient way to improve the growth of casuarinas than N fertilization whenever the soil is devoid of *Frankia*, a situation which is most often encountered in tropical countries where casuarinas have not yet been introduced. In addition, the result of the experiment reported here together with unpublished experiments using non-sterile soils devoid of *Frankia* confirm that strain ORS021001 can be confidently recommended to inoculate casuarinas in the field.

Preliminary work in field-simulating conditions has shown that by applying a heavy inoculum (equivalent to 30 μ g *Frankia* proteins per plant) instead of a sparing inoculum (3 μ g *Frankia* proteins), nodulation was more regular and the nodule dry weight expressed per 9-month-old tree nearly doubled (27 ± 5 g nodule tree⁻¹). Since we have been able to improve the culture of *Frankia* strains specific to casuarinas, we can now envisage massive inoculation of these trees, thus hopefully inducing a homogeneous and more abundant nodulation, which is the prerequisite to high N₂ fixation.

Improving the nodulating ability of the host-plant

We have already discussed the origin of the large variation in the N₂-fixing capacity of the casuarina tree. This variation can be partly related to the nodulating ability of the host-plant genotype. Attempting to explore this variability would probably be a fruitful approach to increasing N₂ fixation of casuarina stands.

Acknowledgements—We thank F. Cornet for setting up the experiment and the Soils Section of the joint FAO-IAEA Division, IAEA, Vienna and its Seibersdorf staff for its assistance in performing the ¹⁵N analyses. We also thank Dr M. Fried for revising the manuscript and J. Bakhom for technical assistance.

REFERENCES

- Andeke-Langui M. A. and Dommergues Y. R. (1983) Coastal sand dune stabilisation in Senegal. In *Casuarina Ecology, Management and Utilization* (S. J. Midgley, J. W. Turnbull and R. D. Johnston, Eds), pp. 158–166. CSIRO, Melbourne.
- Ataia A. (1983) *Casuarina oligodon* in the Eastern Highlands Province-Papua New Guinea. In *Casuarina Ecology, Management and Utilization* (S. J. Midgley, J. W. Turnbull and R. D. Johnston, Eds), pp. 80–87. CSIRO, Melbourne.
- Bamber R. K., Mullette K. and Mackowski C. (1980) Mycorrhizal studies. In *Research 1977–1978*, pp. 70–72. Forestry Commission of New South Wales, Sydney.
- Bremner J. M. (1977) Use of nitrogen-tracer techniques for research on nitrogen fixation. In *Biological Nitrogen Fixation in Farming Systems of the Tropics* (A. Ayanaba and P. J. Dart, Eds), pp. 335–352. Wiley, Chichester.
- Diem H. G. and Gauthier D. (1982) Effet de l'infection endomycorhizienne (*Glomus mosseae*) sur la nodulation et la croissance de *Casuarina equisetifolia*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* 294(III), 215–218.
- Diem H. G., Gueye I., Gianinazzi-Pearson V., Fortin J. A. and Dommergues Y. R. (1981) Ecology of VA mycorrhizae in the tropics: the semi-arid zone of Senegal. *Oecologia Plantarum* 2, 53–62.
- Diem H. G., Gauthier D. and Dommergues Y. R. (1982) Isolement et culture *in vitro* d'une souche infective et effective de *Frankia* isolée de nodules de *Casuarina* sp. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* 295(III), 759–763.
- Diem H. G., Gauthier D. and Dommergues Y. R. (1983) An effective strain of *Frankia* from *Casuarina* sp. *Canadian Journal of Botany* 61, 2815–2821.
- Dommergues Y. R. (1963) Evaluation du taux de fixation de l'azote dans un sol dunaire reboisé en filao (*Casuarina equisetifolia*). *Agrochimica* 105, 179–187.
- Duncan D. B. (1955) Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11, 1–42.
- Fried M. and Broeschart H. (1975) An independent measurement of the amount of nitrogen fixed by a legume crop. *Plant & Soil* 43, 707–711.
- Fried M. and Middelboe V. (1977) Measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop. *Plant & Soil* 47, 713–715.
- Hewitt E. J. (1966) *Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition*. Technical Communication No. 22. Commonwealth Agricultural Bureaux, London.
- Lalonde M. and 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* (J. C. Gordon, C. T. Wheeler and D. A. Perry, Eds), pp. 95–110. Forest Research Laboratory, Corvallis.
- Rose S. L. (1980) Mycorrhizal associations of some actinomycete nodulated nitrogen-fixing plants. *Canadian Journal of Botany* 58, 1449–1454.
- Silvester W. B. (1976) Ecological and economic significance of the non-legume symbioses. In *Nitrogen Fixation* (W. E. Newton and C. J. Nyman, Eds), pp. 489–506. Washington State University Press.
- Silvester W. B. (1977) Dinitrogen fixation by plant associations excluding legumes. In *A Treatise on Dinitrogen Fixation* (R. W. F. Hardy and A. H. Gibson, Eds), pp. 141–190. Wiley, New York.
- Vose P. B., Ruschel A. P., Victoria R. L., Saito S. M. T. and Matsui E. (1982) ¹⁵N as a tool in biological nitrogen fixation research. In *Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture* (P. H. Graham and S. C. Harris, Eds), pp. 575–592. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali.
- Williams W. A., Jones M. B. and Delwiche C. C. (1977) Clover N-fixation measurement by total N difference and ¹⁵N A values in lysimeters. *Agronomy Journal* 69, 1023–1024.
- Witty J. F. (1983) Estimating N₂ fixation in the field using ¹⁵N-labelled fertilizer: some problems and solutions. *Soil Biology & Biochemistry* 15, 631–639.

ARTICLE 9

MICROBIOLOGIE. — *Effet de l'infection endomycorhizienne (Glomus mosseae) sur la nodulation et la croissance de Casuarina equisetifolia*. Note (*) de Hoang Gia Diem et Daniel Gauthier, présentée par Roger Buvat.

Des plants de *Casuarina equisetifolia* cultivés sur un sol stérile contenant seulement $10 \cdot 10^{-6}$ de phosphore assimilable, ont été inoculés soit par *Frankia* sp. (sous forme de broyat de nodules), soit par *Glomus mosseae*, soit simultanément par les deux endophytes. Au bout de 6 mois, le nombre de nodules et l'azote total des parties aériennes étaient plus de deux fois plus élevés chez les plants inoculés par *Frankia* sp. et *Glomus mosseae* que chez les plants inoculés par *Frankia* seulement.

Seedlings of Casuarina equisetifolia, grown in a sterile soil containing only $10 \cdot 10^{-6}$ available phosphorus, were inoculated with Frankia sp. (as crushed nodules) or Glomus mosseae or both endophytes. After 6 months, the number of nodules and the total nitrogen of aerial parts were more than twice as great in plants simultaneously inoculated with Frankia sp. and Glomus mosseae as in plants inoculated with Frankia sp. alone.

Il est désormais bien établi que l'association des racines de légumineuses avec des endomycorhizes vésiculo-arbusculaires est susceptible d'accroître la fixation d'azote et la productivité de ces plantes lorsque celles-ci poussent dans des conditions édaphiques défavorables, notamment dans des sols mal pourvus en phosphore assimilable. On sait que ce rôle des endomycorhizes est essentiellement, mais non exclusivement, de nature trophique [1]. Par leur réseau d'hyphes extramatricielles, les endomycorhizes constituent des structures mieux adaptées que les racines à l'absorption des éléments nutritifs peu mobiles du sol, notamment le phosphore. On peut *a priori* penser que l'infection endomycorhizienne des racines joue un rôle semblable dans le cas des non-légumineuses fixatrices d'azote. Cette hypothèse découle du fait que l'on a montré que pratiquement tous les genres connus de non-légumineuses fixatrices d'azote pouvaient héberger des endomycorhizes vésiculo-arbusculaires [2]. En ce qui concerne plus particulièrement *Casuarina* sp. la présence des endomycorhizes vésiculo-arbusculaires a été rapportée antérieurement par Rose [3] et par Diem et coll. [4]. A notre connaissance une seule étude expérimentale a été effectuée à ce jour pour vérifier l'effet de l'infection endomycorhizienne sur la croissance et la nodulation d'une non-légumineuse fixatrice d'azote : c'est l'étude conduite sur *Ceanothus velutinus* par Rose et Youngberg [5].

Dans la présente Note, nous rapportons les résultats d'une première expérience portant sur *Casuarina equisetifolia* cultivé dans un sol renfermant seulement $10 \cdot 10^{-6}$ de phosphore assimilable. L'infection par *Glomus mosseae* de jeunes plants de *C. equisetifolia* déjà inoculés avec *Frankia* (apporté sous forme de broyats de nodules) entraîne un doublement du poids des nodules et de la teneur totale en azote des plantes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Le sol utilisé a été un sol ferrugineux tropical faiblement lessivé (non vernaculaire : Dek) renfermant seulement $10 \cdot 10^{-6}$ de phosphore assimilable. Les autres caractéristiques de ce sol figurent au tableau.

Afin d'obtenir des plantules homogènes de *Casuarina equisetifolia* on a préalablement mis à germer des graines sur du sable stérile. On a choisi des plantules de même vigueur pour les repiquer dans des sachets de polyéthylène de 11×24 cm renfermant chacun 1 kg de sol préalablement stérilisé. Après avoir appliqué les traitements décrits ci-dessous on a placé les sachets contenant les plantules sous un abri vitré de la station O.R.S.T.O.M. de Bel-Air, Dakar, Sénégal, pendant la période allant du mois d'août au mois de janvier inclus. Tous les mois, on a apporté à chaque plante 10 ml de solution nutritive de Hewitt [6] dépourvue de phosphore et d'azote et diluée deux fois. Tous les 2 jours, on a apporté la quantité d'eau nécessaire pour maintenir la tension de l'eau du sol au voisinage de la capacité au champ.

L'inoculum de *Frankia* sp. a été constitué par un broyat de nodules, étant donné que les tentatives d'inoculation avec des cultures pures de *Frankia* sont restées vaines jusqu'à présent ([7], [8]). Afin que le broyat de nodules soit exempt de Champignons endomycorhiziens, les nodules ont été prélevés sur des plantes cultivées dans du sable stérile. Aussitôt après récolte, les nodules ont été stérilisés comme suit : on a immergé environ 1 g de nodules (poids frais) dans une solution de chloramine T 1,5 % (poids/volume) pendant 15 mn. On a ensuite rincé les nodules à l'eau distillée stérile, puis on les a broyés dans 30 ml d'eau stérile. On a procédé à l'inoculation en introduisant 1 ml de ce broyat de nodule dans le sol au niveau du collet de chaque plantule, au moment de repiquage.

TABLEAU

Inoculation de jeunes plants de Casuarina equisetifolia par un broyat de nodules (apportant Frankia sp.) et par un Champignon endomycorhizien (Glomus mosseae).

| Traitements | Nodules poids sec (mg/plante) | Infection par <i>G. mosseae</i> (%) | Parties aériennes | | |
|---|-------------------------------------|--|-------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| | | | Poids sec (g/plante) | Azote total (mg/plante) | Phosphore total (mg/plante) |
| (1) Témoin | 0 _a | 0 | 2,69 _a | 22,0 _a | 2,6 _a |
| (2) Inoculation avec broyat de nodules | 57 _b | 0 | 4,23 _b | 50,7 _b | 2,1 _a |
| (3) Inoculation avec <i>G.</i> <i>mosseae</i> | 0 _a | 39 _a | 2,32 _a | 19,7 _a | 5,1 _b |
| (4) Inoculation avec broyat de nodules et <i>G. mosseae</i> | 132 _c | 47 _a | 7,69 _c | 96,1 _c | 3,9 _b |
| (5) Inoculation avec broyat de nodules et apport de phosphore | 107 _c | 0 | 7,49 _c | 120,5 _c | 3,0 _b |

Caractéristiques du sol utilisé (sol stérile) : pH (KCl), 6,2; phosphore total, $79 \cdot 10^{-6}$; phosphore assimilable (Olsen [10]), $10 \cdot 10^{-6}$; N total, $300 \cdot 10^{-6}$; argile, 8,5 %; limon, 3,3 %; sables, 94,7 %. Le phosphore a été apporté à la dose de $90 \cdot 10^{-6}$ sous forme de K_2HPO_4 . Les déterminations ont été effectuées lorsque les plantes étaient âgées de 6 mois. Dans chaque colonne ne sont pas significativement différentes ($P=0,05$) les moyennes suivies de la même lettre (test de Duncan [12]).

L'inoculum de Champignon endomycorhizien, *Glomus mosseae*, a été constitué par des fragments de racines de *Sorghum sudanense* inoculés préalablement avec *Glomus mosseae* suivant la technique habituelle, utilisée par exemple par Menge et coll. [9]. On a procédé à l'inoculation en appliquant environ 500 mg (poids frais) de racines fragmentées contre le système racinaire de chaque plantule au moment du repiquage. L'apport complémentaire de phosphore a consisté à ajouter au sol en une fois au début de l'expérience $90 \cdot 10^{-6}$ de phosphore sous forme de K_2HPO_4 .

Les analyses du matériel végétal récolté au 6^e mois ont consisté à peser les parties aériennes des plantes après séchage à 65° à l'étuve jusqu'à poids constant, à doser l'azote total par la méthode Kjeldahl et le phosphore total par la méthode au métavanadate et molybdate d'ammonium [10].

Pour obtenir une évaluation quantitative de l'infection endomycorhizienne on a effectué un prélèvement randomisé de racines (environ 0,5 g par plante). Les racines ont ensuite été colorées suivant la méthode de Phillips et Hayman [11]. On a placé 120-130 segments de 3 mm de long sous la loupe binoculaire et l'on a déterminé le pourcentage de segments infectés.

Si les racines sont très opaques, il peut être nécessaire de disséquer le cortex racinaire pour mieux voir les tissus infectés.

DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL. — Le principe de l'expérience a été de comparer la nodulation, la croissance et les teneurs totales en azote et phosphore des plants de *Casuarina equisetifolia* (1) en l'absence d'endophytes (témoin), (2) en présence de *Frankia* sp. apporté sous forme de broyat de nodules, (3) en présence du Champignon endomycorhizien *Glomus mosseae*, (4) en présence des deux endophytes, (5) en présence de *Frankia* sp. avec apport complémentaire de phosphore. Chaque traitement a comporté sept répétitions. Les inoculations ont été effectuées au moment du repiquage des plantules de *Casuarina equisetifolia*.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — Le tableau montre l'effet des différents traitements sur l'infection du système racinaire de *Casuarina equisetifolia* par *Frankia* sp. (mesurée par le poids des nodules), sur l'infection par *Glomus mosseae* (mesurée par le pourcentage des segments de racine infectés), sur le poids sec des parties aériennes et leur teneur totale en azote et phosphore.

L'inoculation avec *G. mosseae* seul (traitement 3) est pratiquement sans effet; elle accroît la teneur totale des plantes en phosphore mais ne modifie pas leur poids. L'inoculation avec *Frankia* sp. seul (traitement 2) exerce un effet favorable puisqu'elle accroît le poids sec des plantes de 57 % et leur teneur totale en azote de 130 %; elle est, par contre, sans effet sur la teneur totale en phosphore. Ces deux premiers résultats suggèrent que, dans le sol et pour le système symbiotique considéré, l'azote était le facteur limitant majeur.

L'inoculation double avec *Frankia* sp. et *Glomus mosseae* (traitement 4) accroît de façon spectaculaire le poids sec des plantes (+186 %), vraisemblablement par suite de l'amélioration de la nodulation et de la fixation de l'azote, d'où un accroissement considérable de la teneur totale en azote des plantes (+337 %). L'apport complémentaire de $90 \cdot 10^{-6}$ de phosphore combiné à l'inoculation avec *Frankia* (traitement 5) donne pratiquement les mêmes résultats que la double inoculation (traitement 4). En d'autres termes, l'inoculation avec *G. mosseae* équivaut, dans nos conditions expérimentales, à un apport complémentaire de phosphore. Ces derniers résultats montrent qu'après l'azote, le phosphore était un facteur limitant très important.

Il existe, notamment sous les tropiques, de nombreux sols caractérisés par une déficience en azote et phosphore où seules peuvent s'installer des plantes capables à la fois de fixer l'azote et de mieux explorer le sol pour en extraire le phosphore. *Casuarina equisetifolia*, présente ces deux propriétés, lorsqu'il a pu s'associer symbiotiquement avec *Frankia* et un champignon endomycorhizien tel que *Glomus mosseae*. Dans ces conditions *C. equisetifolia* constitue une espèce particulièrement précieuse pour fixer les sols dunaires dont on connaît la pauvreté en éléments nutritifs.

(*) Remise le 12 octobre 1981, acceptée le 9 novembre 1981.

[1] B. MOSSE et D. S. HAYMAN, in *Tropical Mycorrhiza Research*, P. MIKOLA, éd., Clarendon Press, Oxford, 1980, p. 213.

[2] J. M. TRAPPE, in *Proceedings Workshop Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of temperate Forests*, J. C. GORDON, C. T. WHEELER et D. A. PERRY, éd., Forest Research Laboratory, Oregon State Univ., Corvallis, 1979, p. 160.

[3] S. H. ROSE, *Can. J. Bot.*, 58, 1980, p. 1149.

[4] H. G. DIEM, I. GUEYE, V. GIANINAZZI-PEARSON, J. A. FORTIN et Y. R. DOMMERGUES, *Æcol. Plantarum*, 2, 1981, p. 53.

[5] S. L. ROSE et C. T. YOUNGBERG, *Can. J. Bot.*, 59, 1981, p. 34.

-
- [6] E. J. HEWITT, *Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition Technical Communication*, n° 22, 2^e éd., Commonwealth Bureau, London, 1966, p. 431.
- [7] D. GAUTHIER, H. G. DIEM et Y. R. DOMMERGUES, *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 1981, p. 306.
- [8] D. GAUTHIER, H. G. DIEM et Y. DOMMERGUES, *Comptes rendus*, 293, Série III, 1981, p. 489.
- [9] J. A. MENGE, E. L. V. JOHNSON et V. MINASSIAN, *New Phytol.*, 82, 1979, p. 473.
- [10] M. L. JACKSON, *Soil Chemical analysis*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1958, p. 153.
- [11] J. M. PHILLIPS et D. S. HAYMAN, *Trans. Br. Myc. Soc.*, 55, 1970, p. 158.
- [12] D. B. DUNCAN, *Biometrics*, 11, 1955, p. 1.

O.R.S.T.O.M., C.N.R.S.,
Laboratoire de Microbiologie du Sol, B. P. n° 1386, Dakar, Sénégal.