



D. LESUEUR
CIRAD-Forêt

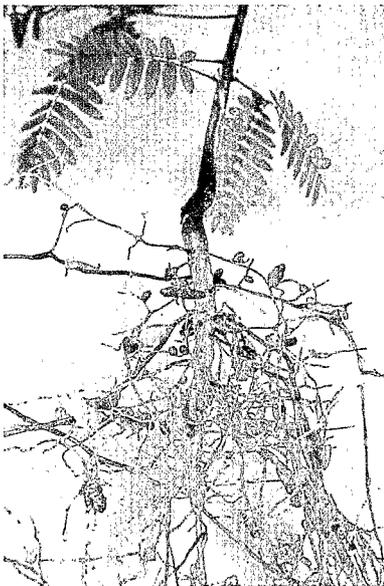
J. TASSIN
CIRAD-Forêt

M.-P. ENILORAC
CIRAD-Forêt/ICRAF

J.-M. SARRAILH
CIRAD-Forêt

R. PELTIER
CIRAD-Forêt

LA SYMBIOSE *CALLIANDRA CALOTHYRSUS*-RHIZOBIUM



▲ Nodules observés sur le système racinaire d'une plante de *Calliandra calothyrsus* inoculée en serre trois mois plutôt avec une souche de *Rhizobium* originaire de La Réunion.

Nodules observed on the root system of plants of Calliandra calothyrsus inoculated in greenhouse three months before by a Rhizobium strain native from Reunion Island.

Fleur de *Calliandra calothyrsus*.
Calliandra calothyrsus flower.





L'auteur décrit, dans cet article, la spécificité de la plante-hôte pour noduler et fixer l'azote tout en montrant les caractéristiques phénotypiques et symbiotiques du partenaire microbien.

La restauration et le maintien de la fertilité des sols est un problème environnemental crucial. Ce problème est plus particulièrement marqué dans les pays tropicaux et subtropicaux où les sols pauvres en matière organique sont fortement lessivés par les pluies, ce qui accentue leur carence en éléments nutritifs. L'utilisation dans les pays du Sud des arbres fixateurs d'azote comme *Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia sepium* et *Acacia mangium*, pour améliorer la fertilité et la stabilité des sols agricoles, s'est intensifiée ces dernières années

C. calothyrsus (Mimosacée) est un arbuste non épineux de taille moyenne appartenant à la famille des Légumineuses et originaire d'Amérique centrale et du Mexique ; c'est une espèce très utilisée dans son aire d'origine mais aussi dans d'autres pays tropicaux où elle a été introduite avec succès. Dans les systèmes agroforestiers, *C. calothyrsus* a des usages nombreux et variés : production de bois d'usage ou de feu, biomasse pour l'utilisation en mulch, haies anti-érosives pour fixer les talus de terrasse, ombrage des cultures (cacao, café...). Ainsi en Indonésie plus de 170 000 hectares ont-ils été plantés avec succès autour de villages dont les sols sont très érodés et peu fertiles (National Academy of Sciences, 1983). KAN et HU (1987) ont également décrit comment l'installation de haies de *C. calothyrsus* limite l'érosion des sols grâce à un système racinaire profond et à une intense ramification latérale. De leur côté à la Réunion, TASSIN *et al.* (1995) ont montré que la porosité du sol augmente au fur et à mesure que l'on s'approche des haies de *C. calothyrsus* ; PEUSSOU (1993) a, quant à lui, fait la preuve de la bonne valeur fourragère de l'espèce, très appréciée en tant qu'appoint riche en protéines, pour nourrir les caprins dans les petites exploitations des Hauts de l'île. *C. calothyrsus* présente aussi un

grand intérêt agroforestier en Afrique de l'Est (Burundi, Rwanda et Kenya), à Madagascar et en Nouvelle-Calédonie.

Comme d'assez nombreuses légumineuses ligneuses, *C. calothyrsus* peut s'associer avec rhizobium pour former des nodules au sein desquels l'azote atmosphérique est fixé. Dans beaucoup de sols tropicaux, la présence de souches locales peu effectives avec l'espèce de légumineuses que l'on souhaite introduire est un facteur limitant pour la fixation biologique de l'azote (SINGLETON *et al.*, 1992). C'est pourquoi, dans ces sols, l'inoculation des arbres avec des souches sélectionnées de rhizobium est fortement recommandée (GANRY, DOMMERGUES, 1995). Actuellement, très peu de souches de rhizobium de *C. calothyrsus* sont disponibles ; seules quelques souches de *Rhizobium sensu stricto* figurent dans la collection du NifTAL (HALLIDAY et SOMASEGARAN, 1984). C'est très insuffisant car il est nécessaire de disposer d'une large collection de souches de rhizobium spécifiques de *C. calothyrsus* afin de pouvoir identifier celles qui sont les plus appropriées pour s'associer efficacement avec la plante-hôte suivant les caractéristiques écophysiologicals du sol.

Les objectifs de notre travail sont les suivants :

- Confirmer ou infirmer les résultats de TURK et KEYSER (1992) et ceux de LAJUDIE *et al.* (1994), d'où il ressort que *C. calothyrsus* est nodulé uniquement par des *Rhizobium sensu stricto*.
- Réunir une collection de souches isolées de nodules de *C. calothyrsus* poussant dans trois zones géographiques différentes (La Réunion, le Kenya et la Nouvelle-Calédonie), en effectuer la caractérisation phénotypique afin de vérifier si ces souches appartiennent à trois groupes phénotypiques distincts.
- Comparer l'effectivité de ces souches avec des souches de collec-



tion connues afin de découvrir éventuellement des souches plus performantes que les souches de références classiquement utilisées.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

□ Matériel végétal

Au cours de cette étude, nous avons utilisé la provenance de *C. calothyrsus* Suchitepequez originaire du Guatemala (référence n°92/9599 du CIRAD-Forêt). Les graines sont scarifiées mécaniquement : à l'aide d'un scalpel, on sectionne une portion du tégument dans la zone opposée de celle où se trouve l'embryon (MACQUEEN, 1993). Les graines, une fois scarifiées et imbibées dans l'eau, sont mises à germer en serre dans un mélange de perlite et de vermiculite ; c'est à partir de ces semis que les expériences 1 et 3 sont réalisées.

□ Souches de rhizobium

A partir de chaque lot de nodules récoltés à La Réunion, au Kenya et en Nouvelle-Calédonie, nous avons effectué un réisolement des rhizobiums présents dans les nodules. Pour cela, les nodules ont été écrasés dans de l'eau distillée puis inoculés à de jeunes plantes de *C. calothyrsus* cultivées en serre. Après deux mois de culture, les plantes sont déracinées, et les jeunes nodules formés sont prélevés. Après une désinfection de surface (éthanol à 95 °C pendant 10 secondes, puis 2 minutes dans HgCl₂ à 0,1 %) et plusieurs rinçages dans de l'eau distillée stérile, les nodules sont écrasés dans de l'eau physiologique stérile et le tout est étalé à l'aide d'une anse de platine dans une boîte de Pétri contenant du milieu Yeast Extract Mannitol ou YEM (VINCENT, 1970) ; après plusieurs repiquages, on dispose ainsi de cultures pures de rhizobium. L'ensemble des souches de rhizobium ainsi isolées est présenté dans le tableau I.

TABLEAU I
ORIGINE DES SOUCHES DE RHIZOBIUM DE CALLIANDRA CALOTHYRSUS
UTILISÉES AU COURS DE NOS EXPÉRIENCES

N° de la souche	Groupe	Origine géographique
TAL 1	1	NiFTAL, Hawaïi
TAL 33	1	NiFTAL, Hawaïi
CCR1	2	La Réunion (Cocatre)
CCR2A	2	La Réunion (Saint-Paul)
CCR2B	2	La Réunion (Saint-Paul)
CCR3	2	La Réunion (Pongary)
CCR4	2	La Réunion (Saint-Pierre)
CCR6	2	La Réunion (Station des Colimaçons)
CCR8	2	La Réunion (Station des Colimaçons)
CCR9	2	La Réunion (Station des Colimaçons)
CCR10	2	La Réunion (Station des Colimaçons)
CCR11	2	La Réunion (Station des Colimaçons)
CCR12	2	La Réunion (Station des Colimaçons)
CCR13	2	La Réunion (Station des Colimaçons)
CCR14	2	La Réunion (Station des Colimaçons)
CCR17	2	La Réunion (Station des Colimaçons)
CCR18	2	La Réunion (Station des Colimaçons)
CCR20A	2	La Réunion (Station des Colimaçons)
CCR20B	2	La Réunion (Station des Colimaçons)
CCK1	3	Kenya (Embu)
CCK2	3	Kenya (Embu-Kianjokama)
CCK3	3	Kenya (Embu-Kianjokama)
CCK4	3	Kenya (Embu-Manyatta)
CCK5	3	Kenya (Embu)
CCK6	3	Kenya (Embu)
CCK7	3	Kenya (Embu-Runyerus)
CCKS1	3	Kenya (Embu)
CCKS2	3	Kenya (Embu)
CCK8	3	Kenya (Kisumu-Maseno)
CCK9	3	Kenya (Kisumu)
CCK10	3	Kenya (Kisumu-Maseno)
CCK11	3	Kenya (Kisumu-Maseno)
CCK12	3	Kenya (Mombasa-Mtwapa)
CCK13	3	Kenya (Mombasa-Mtwapa)
CCK14	3	Kenya (Mombasa-Mtwapa)
CCNC1	4	Nouvelle-Calédonie (Port-Laguerre)
CCNC2	4	Nouvelle-Calédonie (Lifou)
CCS1	5	Singapour
CCS2	5	Singapour

NiFTAL, Nitrogen Fixation for Tropical Agriculture Legumes. Références des souches : HALLDAY et SOMASEGARAN (1984).

EXPÉRIENCE 1

Afin de déterminer si *C. calothyrsus* nodule avec des souches de *Rhizobium* et/ou de *Bradyrhizobium*, de jeunes plantules âgées de 8 jours sont transplantées dans des pots en plastique de 12 x 8 cm contenant un mélange de sable et de vermiculite. Les 8 souches de *Rhizobium* et les 6 souches de *Bradyrhizobium* qui sont testées au cours de cette expérience sont présentées dans le tableau II, p. 48. Elles sont cultivées dans le milieu YEM à 28 °C pendant 5 jours. L'inoculation des plantes est effectuée au moment de la mise en place des jeunes semis ; elle consiste à verser sur la zone du collet 500 µl de la culture bactérienne âgée de 5 jours et contenant 10⁹ cellules par ml. Pour chacune des 14 souches testées et pour la série de plantes non inoculées, nous avons 12 répétitions. Les plantes sont arrosées en alternance avec de la solution nutritive sans azote

(BROUGHTON, DILWORTH, 1971) et de l'eau distillée.

Après 12 semaines de croissance, on dénombre les plantes qui sont nodulées avec les différentes souches de rhizobium testées. Chez les plantes nodulées, on estime que la symbiose est efficiente lorsqu'elles sont très développées et que leur feuillage est bien vert. Dans le cas contraire, si le développement des plantes est réduit et que les feuilles sont jaunes, on parle alors de symbiose inefficente.

EXPÉRIENCE 2

Au cours de cette expérience, nous avons utilisé 39 souches de rhizobium : 37 sont des souches isolées à partir de nodules de *C. calothyrsus* récoltés à La Réunion (Groupe géographique 2), au Kenya (Groupe géographique 3), en Nouvelle-Calédonie (Groupe géographique 4) et à Singapour (Groupe géogra-

phique 5), et deux (TAL 1 et TAL 33) sont des souches issues de la collection du NifTAL (Hawaii, USA) (cf. tableau I). Des tests biochimiques et métaboliques sont utilisés afin d'évaluer la diversité au sein de notre collection de souches de rhizobium de *C. calothyrsus*.

- **Croissance en milieu YEM contenant 25 mg l⁻¹ de bleu de bromothymol** : chacune des souches testées est mise en culture dans des boîtes de Pétri contenant du milieu YEM gélosé additionné de bleu de bromothymol qui est un indicateur coloré de pH. Après cinq jours d'incubation à 28 °C, on note si la souche de rhizobium a acidifié (couleur jaune) ou alcalinisé (couleur bleue) le milieu de culture (cf. photo p. 49). Dans le cas d'une acidification, on parle de souche de *Rhizobium sensu stricto* (rhizobiums à croissance rapide) et, dans le cas d'une alcalinisation, on parle de souches de *Bradyrhizobium* (rhizobiums à croissance lente ; JORDAN, 1984).

- **Test d'hydrolyse de l'urée** : par la même procédure que celle décrite lors du test précédent, on détermine si les souches testées sont capables d'hydrolyser l'urée. L'hydrolyse se manifeste par l'apparition d'une couleur rouge dans les boîtes de Pétri contenant du YEM, 2 % d'urée et 0,012 % de rouge phénol après cinq jours d'incubation à 28 °C (LINDSTRÖM, LEHTOMÄKI, 1988).

- **Croissance en présence de 8 % de KNO₃** : l'aptitude des souches à croître en présence de 8 % de KNO₃ a été réalisée dans du milieu YEM suivant la technique décrite par DREYFUS *et al.* (1988).

- **Tolérance à la salinité** : la résistance à la salinité de ces souches a été évaluée en les cultivant dans du milieu YEM gélosé dépourvu de NaCl, dans lequel on a ajouté res-



Expérimentations sur le contrôle de l'érosion des sols par des haies de *Pennisetum purpureum* et de *Calliandra calothyrsus* au sein de monocultures de maïs dans la station agroforestière du Kari à Embu (Kenya).
*Experimentation in the Kari agroforestry station in Embu (Kenya) on soil erosion control using hedgerows of *Pennisetum purpureum* and *Calliandra calothyrsus* in pure maize cultures.*



pectivement 1, 2 et 3 % (soit respectivement 172, 348 et 516 mM) de NaCl. Contrairement aux tests précédents, l'inoculation a été réalisée à l'aide d'un inoculateur multipoint qui permet de déposer en même temps quelques μl de 48 souches différentes à la surface d'un milieu gélosé.

• **Résistance intrinsèque aux antibiotiques** : la résistance intrinsèque à différents antibiotiques de chacune des souches a été déterminée en utilisant du milieu YEM gélosé sur lequel on a déposé les disques (Bio-mérieux) des antibiotiques suivants : Streptomycine (10 μg), Chloramphénicol (30 μg), Kanamycine (30 μg), Néomycine (30 μg), Ampicilline (10 μg) et Tétracycline (30 μg). Un ml de culture âgée de cinq jours contenant 10^9 cellules par ml est étalé sur du milieu YEM gélosé. Une fois que la surface du milieu de culture est parfaitement sèche, les disques d'antibiotiques sont déposés ; après cinq jours d'incubation à 28 °C, les souches sont dites résistantes si de la culture s'est développée tout autour du disque.

• **Résistance intrinsèque aux métaux lourds** : la résistance intrinsèque aux métaux lourds de chacune des souches a été déterminée en utilisant du milieu YEM gélosé. Les solutions stocks de métaux lourds sont stérilisées par filtration et ajoutées stérilement au milieu YEM aux concentrations suivantes :

CdCl_2 , 2 H_2O 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$;
 CuCl_2 , 2 H_2O 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$;
 ZnCl_2 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$;
 AlCl_3 , 6 H_2O 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$;
 HgCl_2 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$;
 $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$;
 BaCl_2 , 2 H_2O 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$;
 MnSO_4 , H_2O 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$;
 NiCl_2 , 6 H_2O 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

La technique d'inoculation utilisée est la même que celle décrite pour le test de tolérance à la salinité.

• **Utilisation de différents acides aminés comme seule source d'azote** : l'ap-

titude de ces souches à utiliser différents acides aminés comme source d'azote a été déterminée en utilisant du milieu M2 dont la composition est la suivante :

Mannitol 10 g l^{-1}
 NaCl 0,1 g l^{-1}
 K_2HPO_4 0,5 g l^{-1}
 FeCl_3 2 mg l^{-1}
 Biotine 10^{-3} mg l^{-1}
 Thiamine 0,4 mg l^{-1} .

Les acides aminés testés sont les suivants : DL-Phénylalanine, L-Isoleucine, Glycine, DL-Valine, DL-Cystéine, DL-Leucine, DL-Sérine, DL-Alanine, DL-Méthionine, DL-Lysine, DL-Histidine, Asparagine, DL-Thréonine, DL Tyrosine, L-Glutamine, L-Arginine, L-Proline. Le milieu M2 contenant du Glutamate de sodium est utilisé comme témoin positif, tandis que le milieu M2 sans source d'azote est utilisé comme témoin négatif. Les solutions stocks de chaque acide aminé sont stérilisées par filtration et ajoutées stérilement au milieu M2 à la concentration finale de 10 mM. La technique d'inoculation utilisée est la même que celle décrite pour le test de tolérance à la salinité.

• **Utilisation de différentes sources de carbone** : l'aptitude de ces souches à utiliser différentes sources de carbone est déterminée en utilisant du milieu M3 (milieu YEM sans mannitol et sans autres sources de carbone). Les solutions stocks de chaque source de carbone sont stérilisées par filtration et ajoutées stérilement au milieu M3 à la concentration finale de 0,2 %. Les sources de carbone testées sont les suivantes : Fructose, Dextrine, Rhamnose, Sorbitol, Arabinose, Citrate, Glucose, Galactose, Maltose, Mannose, Myo-inositol, Acétate de sodium, Poly-Ethylène-Glycol, Glycérol, Ribose, Xylose, Saccharose, Riboflavine. Comme lors du premier test, du bleu de bromothymol est ajouté au milieu M3 à la concentration de 25 mg l^{-1} . Le milieu YEM est utilisé comme témoin positif, alors que le témoin négatif correspond au milieu M3 sans aucune source de carbone. La tech-

nique d'inoculation utilisée est la même que celle décrite pour le test de tolérance à la salinité.

EXPÉRIENCE 3

Deux séries d'expériences en serre ont été réalisées afin d'étudier l'effet de l'inoculation avec 35 des 37 souches de rhizobium présentées dans le tableau 1 (les souches singapouriennes n'ont pu être testées) sur la croissance et la fixation d'azote de *C. calothyrsus* :

• La première série concerne les souches originaires de La Réunion ; elle s'est déroulée de 1^{er} mai au 31 juillet 1994.

• Au cours de la seconde série, ce sont les souches kenyanes qui ont été testées de janvier à mars 1995.

A titre de comparaison, lors des 2 séries, 3 souches de référence ont également été testées (la souche TAL 1 de *C. calothyrsus*, la souche TAL 1145 de *Leucaena leucocephala* et la souche TAL 1806 de *Gliricidia sepium* ; HALLIDAY, SOMASEGARAN, 1984) car ces souches sont recommandées par l'Oxford Forestry Institute et le NIFTAL pour l'inoculation au champ de *Calliandra*.

Pratiquement, de jeunes plantules de *C. calothyrsus* âgées de huit jours sont transplantées dans les mêmes pots que ceux utilisés lors de l'expérience 1, contenant cette fois-ci un mélange de perlite et de vermiculite. Toutes les souches testées sont cultivées dans du milieu YEM et incubées à 28 °C pendant cinq jours. L'inoculation est effectuée au moment de la mise en place des plantules suivant le même protocole que celui décrit pour l'expérience 1. Pour chacune des 37 souches testées, plus la série de plantes-témoins non inoculées, nous avons 12 répétitions. Comme lors de la première expérience, les plantes sont arrosées alternativement avec de la solution nutritive sans azote (BROUGHTON, DILWORTH, 1971) et de l'eau distillée.

Après trois mois de culture en serre, les plantes sont récoltées et leurs



parties aériennes sont mises à sécher à l'étuve (50 °C pendant deux jours) et pesées. Leur teneur en azote total est déterminée par la méthode de Kjeldahl (BREMNER, MULVANEY, 1982).

RÉSULTATS

EXPÉRIENCE 1 Tableau II

Au vu des résultats présentés dans le tableau II, on constate que *C. calothyrsus* n'est que peu ou pas nodulé par les différentes souches de *Bradyrhizobium* que nous avons testées. Les souches d'acacias australiens et d'*Albizia lebbbeck* n'ont induit la formation d'aucun nodule, seules les souches de *Bradyrhizobium* ORS 800 et TAL 72 en ont

formé quelques-uns ; mais ces nodules se sont avérés être non efficaces, ce qui explique pourquoi les plantes sont peu développées et que leur feuillage est jaune. En revanche, on s'aperçoit qu'un groupe de souches de *Rhizobium* est capable de noduler efficacement *C. calothyrsus* (100 % de plantes nodulées) et de former avec cette dernière une symbiose très fixatrice d'azote (plantes très développées et avec un feuillage très vert). Outre la souche TAL 1 de *C. calothyrsus*, on trouve la souche TAL 1145 de *Leucaena leucocephala*, la souche TAL 1806 de *Gliricidia sepium* et la souche PJ12 de *Prosopis juliflora*. En ce qui concerne les souches de *Rhizobium* de légumineuses annuelles, que ce soit la souche de pois-chiche,

de luzerne ou de trèfle, aucune n'est véritablement capable de noduler avec *C. calothyrsus* (cf. tableau II).

Conclusion de l'expérience 1 : on peut donc dire que *C. calothyrsus* est une plante-hôte spécifique en ce qui concerne la nodulation et l'aptitude à fixer l'azote.

EXPÉRIENCE 2 Tableau III

• **Croissance en milieu YEM** contenant 25 mg l⁻¹ de bleu de bromothymol : toutes les souches que nous avons isolées ont acidifié le milieu YEM gélosé au cours de leur croissance. Cette caractéristique est spécifique du genre *Rhizobium*, ce qui

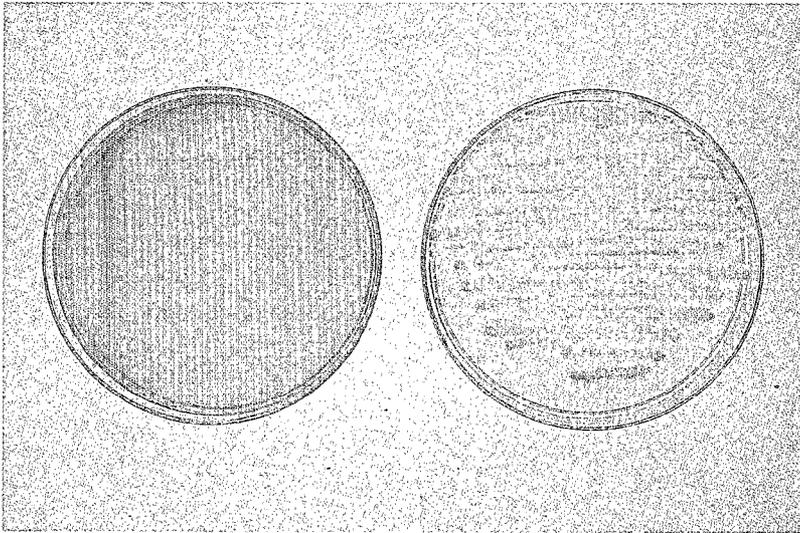
TABLEAU II
INFECTIVITÉ ET EFFECTIVITÉ DE SOUCHES DE RHIZOBIUM ET DE BRADYRHIZOBIUM
SUR CALLIANDRA CALOTHYRSUS

N° de la souche	Genre	Plante-hôte d'origine	Références	Nombre de plantes nodulées (n = 12) ^a	Effectivité des nodules formés
ILCG3	<i>Rhizobium</i>	<i>Cicer arietinum</i>	1	0	-
Rm 1021	<i>Rhizobium</i>	<i>Medicago sativa</i>	2	0	-
ORS 915	<i>Rhizobium</i>	<i>Albizia lebbbeck</i>	3	2	I
TAL 1145	<i>Rhizobium</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	4	12	E
TAL 1	<i>Rhizobium</i>	<i>Calliandra calothyrsus</i>	4	12	E
TAL 1806	<i>Rhizobium</i>	<i>Gliricidia sepium</i>	4	12	E
TrfR	<i>Rhizobium</i>	<i>Trifolium sp.</i>	5	1	I
PJ12	<i>Rhizobium</i>	<i>Prosopis juliflora</i>	6	12	E
TAL 362	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Albizia lebbbeck</i>	4	0	-
CGA1	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Acacia auriculiformis</i>	7	0	-
BayeIR	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Acacia mangium</i>	3	0	-
CGC1	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Acacia crasscarpa</i>	7	0	-
ORS 800	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Acacia holosericea</i>	3	5	I
TAL 72	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Albizia falcata</i>	4	2	I

^a n est le nombre de plantes nodulées.

I, inefficaces : les plantes sont nodulées mais ne sont pas plus développées que les plantes non inoculées ; E, efficaces : les plantes sont très développées par rapport aux plantes non inoculées.

1, BERRAHO B. (communication personnelle, 1990) ; 2, SCHWYN et NEILANDS (1987) ; 3, DREYFUS B. (communication personnelle, 1987) ; 4, HALLIDAY et SOMASEGARAN (1984) ; 5, Auteurs de l'article ; 6, DIAGNE (1988) ; 7, GALIANA (1990).



Acidification du milieu de culture YEM (coloration en jaune de la boîte de Pétri) par une souche de *Rhizobium* après 5 jours d'incubation à 30 °C.
Acidification of the YEM culture medium (staining in yellow of the Petri plate) by a *Rhizobium* strains after 5 days of incubation at 30 °C.

signifie que l'ensemble des souches isolées à la Réunion, au Kenya, en Nouvelle-Calédonie et à Singapour sont toutes des souches de *Rhizobium sensu stricto*.

- **Test d'hydrolyse de l'urée** : aucune des souches testées n'est parvenue à croître sur un milieu contenant de l'urée et donc à hydrolyser cette dernière.

- **Tolérance à la salinité** : dans l'ensemble, les souches de *Rhizobium* de *C. calothyrsus* sont assez sensibles à la salinité puisqu'en présence de 1 % de NaCl, la croissance des deux souches de collection (TAL 1 et TAL 33), ainsi que celle de la quasi-totalité des souches réunionnaises, est totalement inhibée. En présence de teneurs plus élevées en NaCl (2 et 3 %), on constate que la croissance des souches kenyanes et calédoniennes (groupes 3 et 4) est globalement inhibée. Mais, en revanche, les deux souches isolées à Singapour (groupe 5) résistent parfaitement à une teneur élevée en

NaCl puisqu'elles ne sont pas inhibées en présence de 3 % de NaCl dans le milieu de culture.

- **Résistance intrinsèque aux antibiotiques** : dans leur grande majorité, les cinq groupes géographiques de souches que nous avons testées sont sensibles à la Streptomycine, à l'Ampicilline et surtout à la Tétracycline et à la Kanamycine (cf. tableau III). En revanche, la présence de Néomycine dans le milieu de culture n'inhibe pas leur croissance. Le comportement de ces souches vis-à-vis du Chloramphénicol est intéressant car on constate que les souches de collection (groupe 1) et celles de La Réunion (groupe 2) sont résistantes à cet antibiotique, mais qu'en revanche 12 des 16 souches du Kenya (groupe 3) et les 4 souches de Nouvelle-Calédonie et de Singapour (groupes 4 et 5) ont leur croissance qui est inhibée.

- **Résistance intrinsèque aux métaux lourds** : les cinq groupes géographiques de souches testées sont

peu ou pas sensibles au baryum, au manganèse et au plomb. En revanche, la présence de nickel dans le milieu de culture inhibe totalement leur croissance. D'autres métaux lourds comme l'aluminium et le mercure ont des effets plus contrastés sur la croissance des souches car, pour chaque groupe, une partie des souches a une croissance inhibée par le métal. Comme dans le cas du test précédent, de tels résultats ne nous permettent pas de différencier nos cinq groupes géographiques de souches de *Rhizobium*. En revanche en présence de cadmium, de cuivre et de zinc, on constate que les résultats obtenus varient d'un groupe à un autre ; ainsi, les souches des groupes 1, 2 et 5 sont-elles toutes inhibées en présence de ces trois métaux (cf. tableau III) alors que la grande majorité des souches du groupe 3 et les deux souches du groupe 4 se sont développées normalement.

- **Utilisation de différents acides aminés comme seule source d'azote** : comme dans le cas des deux tests précédents, on constate que certains acides aminés sont utilisés par la majorité des souches testées (Glutamine, Asparagine, Arginine et Proline) et que d'autres, en revanche, ne sont que peu ou pas utilisés (Phénylalanine, Valine, Cystéine, Isoleucine et Leucine). Dans le cas de la Tyrosine, on constate que seules les souches des groupes 1 et 2 sont capables de l'utiliser, tandis qu'en ce qui concerne l'utilisation de la Glycine, seules les souches du groupe 5 sont capables de l'utiliser pour croître. Pour ce qui est des autres acides aminés testés, les résultats obtenus traduisent une plus grande variabilité au sein des groupes de souches mais également entre les cinq groupes, ce qui rend difficile leur interprétation pour permettre la différenciation des groupes de souches entre eux.



TABLEAU III
RÉSULTATS DES TESTS BIOCHIMIQUES ET MÉTABOLIQUES DE 39 SOUCHES
DE RHIZOBIUM DE CALLIANDRA CALOTHYRSUS

Caractéristiques	Groupe 1 (n = 2) ^a	Groupe 2 (n = 17)	Groupe 3 (n = 16)	Groupe 4 (n = 2)	Groupe 5 (n = 2)
Croissance en milieu YEM + Bleu de Bromothymol	Acidification	Acidification	Acidification	Acidification	Acidification
Hydrolyse de l'urée	-	-	-	-	-
Tolérance à la salinité (% ou mM)					
1 ou 172	-b	2	13	+	+
2 ou 344	-	1	1	1	+
3 ou 516	-	-	-	-	+
Résistance intrinsèque aux antibiotiques					
Streptomycine	-	3	1	-	-
Chloramphénicol	+	+	4	-	-
Kanamycine	-	1	1	-	-
Néomycine	+	+	+	+	+
Ampicilline	-	2	4	-	-
Tétracycline	-	1	-	-	-
Résistance aux métaux lourds					
Cd	-	-	13	1	-
Cu	-	-	12	+	-
Zn	-	-	13	+	-
Ni	-	-	-	-	-
Ba	+	+	13	+	+
Mn	+	+	13	+	+
Pb	+	14	12	+	+
Al	-	7	8	1	-
Hg	1	5	6	1	+
Utilisation de différents acides aminés comme source de N					
DL-Thréonine	-	1	6	+	-
DL-Tyrosine	+	16	-	-	-
L-Glutamine	+	16	+	+	+
DL-Phénylalanine	-	-	-	-	-
L-Isoleucine	-	5	1	-	+
Glycine	-	1	-	-	+
DL-Valine	-	1	-	-	-
DL-Cystéine	-	1	-	-	1
DL-Leucine	-	1	-	-	nd
DL-Serine	-	1	1	1	+
DL-Alanine	-	4	1	-	+
DL-Méthionine	-	2	-	-	+
DL-Lysine	-	-	-	-	+
DL-Histidine	-	-	-	-	+
L-Asparagine	+	+	+	+	+
L-Arginine	+	+	+	+	nd
L-Proline	+	+	+	+	+

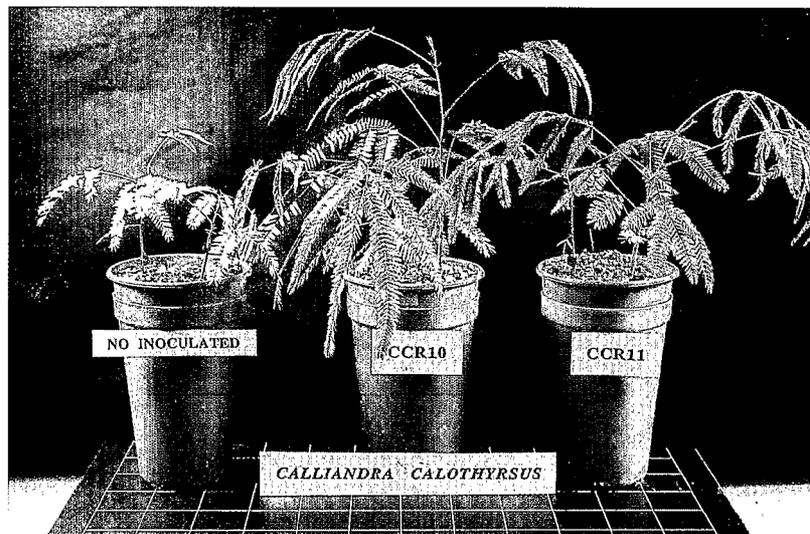
TABLEAU III (suite)

Utilisation de différentes sources de C					
Dextrine	-	-	15	1	-
Citrate	-	-	2	-	-
Arabinose	+	12	+	+	1
Fructose	+	+	15	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	3	2	1	+
Galactose	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+
Myo-Inositol	+	+	+	+	+
Acétate de Na	-	-	2	-	+
P.E.G.	-	-	4	1	+
Glycérol	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+	nd
Xylose	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+
Riboflavine	-	-	1	-	+

^a n est le nombre de souches testées.

^b « + » Toutes les souches ont poussé ; « - » Toutes les souches sont inhibées. Cependant dans le cas des tests sur l'aptitude des souches à utiliser différents acides aminés comme source d'azote et différentes sources de carbone pour croître, nous avons noté que quelques unes des souches testées étaient capables de pousser dans des milieux de culture sans carbone ou sans azote. Aussi pour ces deux tests, « + » signifie que la croissance des souches est meilleure que celle observée dans un milieu sans source de carbone ou d'azote. Les chiffres correspondent aux nombres de souches ayant répondu positivement.
nd : non déterminé.

• **Utilisation de différentes sources de carbone** : à l'exception du Citrate, de l'Acétate de Sodium, du PEG et de la Riboflavine, toutes les autres sources testées au cours de cette expérience sont utilisées par les souches des cinq groupes géographiques. Malgré tout, on distingue des différences entre les groupes : les souches des quatre premiers groupes n'ont utilisé globalement que 11 des 17 sources de carbone proposées (soit 65 %), alors que les souches singapouriennes en ont utilisé 81 %. D'un point de vue qualitatif, on constate également quelques différences intéressantes comme, par exemple, le cas de la Dextrine que seules 15 des 16 souches du groupe 3 et 1 des deux souches du groupe 4 sont capables d'utiliser comme source de carbone.



Effet de l'inoculation avec deux souches de *Rhizobium* natives de La Réunion (CCR10 et CCR11) sur la croissance en serre de *Calliandra calothyrsus*.
Effect of inoculation with two *Rhizobium* strains native from Réunion Island (CCR10 and CCR11) on the growth of *Calliandra calothyrsus* in greenhouse.

Conclusion de l'expérience 2 : nous avons vu que toutes les souches qui ont été isolées sont des souches de *Rhizobium sensu stricto*. Si l'on veut essayer de faire des regroupements entre les cinq groupes géographiques de souches, il semble possible de distinguer trois grands ensembles :

- Le premier regrouperait les groupes 1 et 2 (souches de collection et souches réunionnaises).
- Le second rassemblerait les groupes 3 et 4 (Kenya et Nouvelle-Calédonie).
- Enfin, le troisième correspondrait au groupe 5, soit les deux souches isolées à Singapour.

EXPÉRIENCE 3
Figures 1 et 2

• **Effet de l'inoculation sur la biomasse aérienne :** par rapport aux plantes-témoins non inoculées, on constate que toutes les souches testées ont amélioré significativement la croissance de *C. calothyrsus*. Cette amélioration varie cependant d'une souche à une autre ; c'est ainsi que les plantes inoculées avec les souches CCK5 et CCK8 ont produit 78% de biomasse aérienne en plus que les plantes non inoculées, alors que l'augmentation est de 369% chez les plantes inoculées avec la souche CCR17. Par rapport aux souches de référence, on constate

que la souche TAL 1 est peu efficiente avec *C. calothyrsus*. En effet, à l'exception de la souche CCR3, toutes les autres souches de la collection produisent des quantités de biomasse aérienne significativement supérieures à celles obtenues avec TAL 1 dans les deux séries. En ce qui concerne TAL 1145 et TAL 1806, on constate qu'elles ne figurent pas parmi les souches les plus efficaces. Ainsi comme on peut le voir sur la figure 1, toutes les souches qui ont permis une production de biomasse aérienne supérieure ou égale à celle de la souche CCR20B sont significativement plus efficaces que la souche TAL 1806 (Test de Duncan, $P < 0,05$) : Dans le

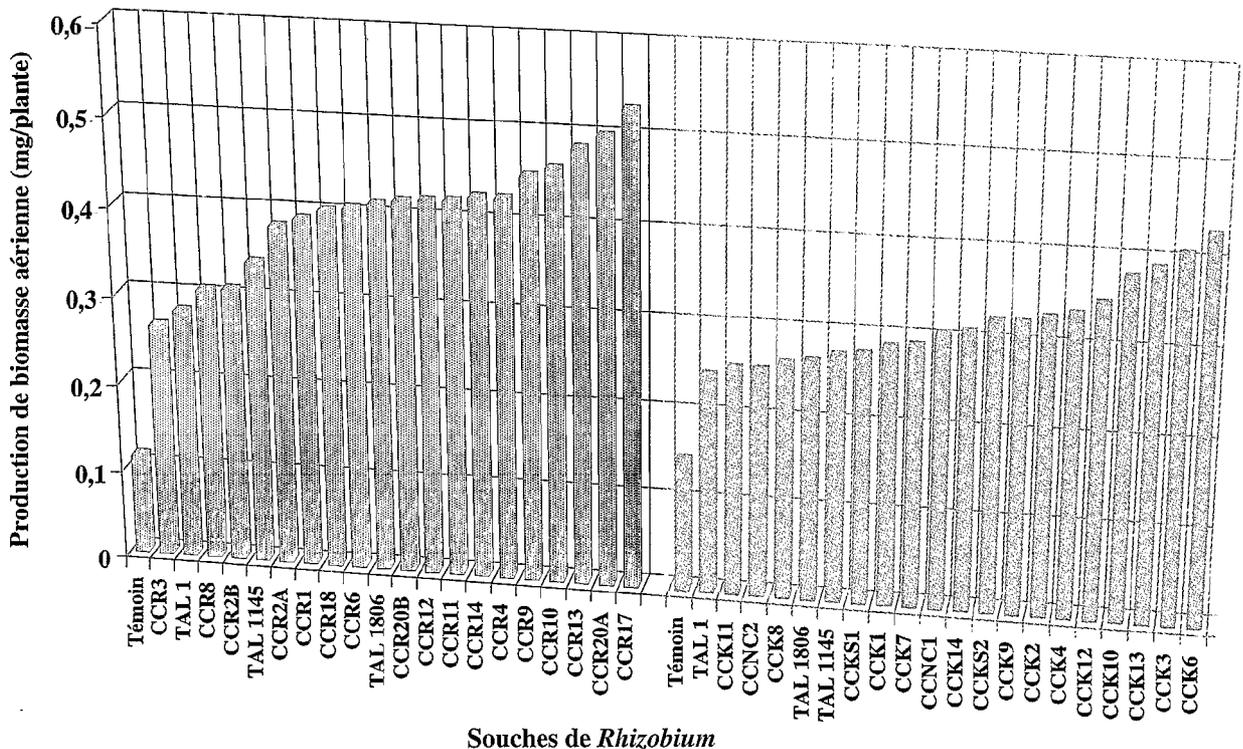


Figure 1. Effet de l'inoculation avec différentes souches de *Rhizobium* natives de La Réunion (CCR), du Kenya (CCK), de Nouvelle-Calédonie (CCNC) et avec trois souches de référence (TAL 1, TAL 1145 et TAL 1806) sur la production de biomasse aérienne de *Calliandra calothyrsus*.
Effect of inoculation with different *Rhizobium* strains native to Reunion Island (CCR), Kenya (CCK), New Caledonia, and with three reference strains (TAL 1, TAL 1145 and TAL 1806) on the shoot dry weight of *Calliandra calothyrsus*

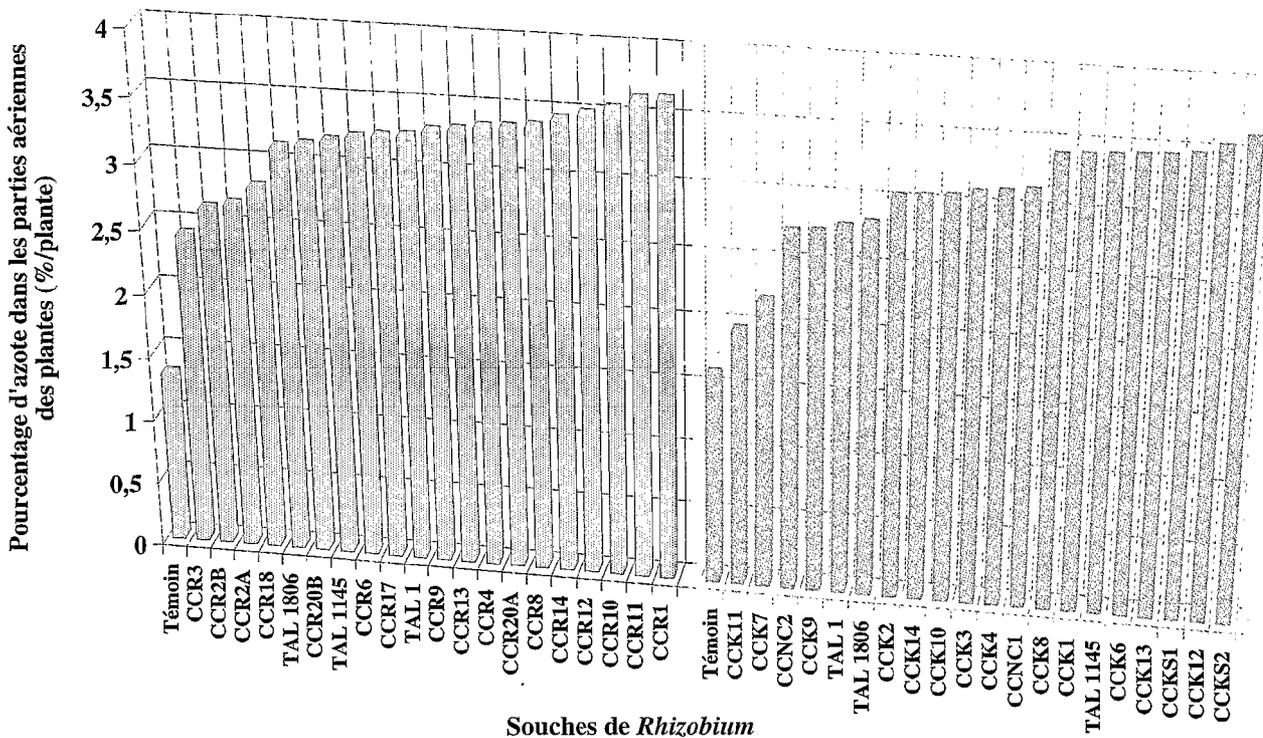


Figure 2. Effet de l'inoculation avec différentes souches de *Rhizobium* natives de La Réunion (CCR), du Kenya (CCK), de Nouvelle-Calédonie (CCNC) et avec trois souches de référence (TAL 1, TAL 1145 et TAL 1806) sur la teneur en azote total dans les parties aériennes de *Calliandra calothyrsus*.

Effect of inoculation with different *Rhizobium* strains native to Reunion Island (CCR), Kenya (CCK), New Caledonia, and with three reference strains (TAL 1, TAL 1145 and TAL 1806) on the total shoot nitrogen of *Calliandra calothyrsus*.

cas de la deuxième série, ce sont les souches qui ont permis une production de biomasse aérienne supérieure ou égale à celle de la souche CCK7 qui sont significativement plus efficaces que les souches TAL 1806 et TAL 1145 (Test de Duncan, $P < 0,05$). A noter que les productions de biomasse aérienne obtenues lors de la seconde série sont plus faibles que celles obtenues lors de la première série. Il est possible que la durée d'éclairage qui est moindre en hiver qu'en été soit responsable de cette différence, et ce malgré l'utilisation d'un éclairage artificiel visant à compenser cette carence lumineuse. Cependant, comme pour chacune des séries nous avons testé les trois souches de

référence, il est tout à fait correct de comparer entre eux les résultats d'une même série, à l'image de ce qui vient d'être discuté dans ce paragraphe.

Au vu de l'ensemble des résultats, on peut identifier huit souches qui semblent en serre améliorer le plus significativement la croissance de *C. calothyrsus*. Dans la première série, il s'agit des souches CCR10, CCR13, CCR20A et CCR17 et, dans la seconde, des souches CCK10, CCK13, CCK3 et CCK6. A noter que les deux souches calédoniennes n'ont pas donné des productions de biomasse aérienne très élevées, ce qui laisse présager qu'elles ne sont pas très efficaces avec *C. calothyrsus*.

• **Effet de l'inoculation sur la teneur en azote total dans les parties aériennes** : comme dans le cas de la biomasse aérienne, les teneurs en azote total dans les parties aériennes des plantes inoculées avec les différentes souches testées sont toutes significativement supérieures à celles obtenues chez les plantes-témoins non inoculées (fig. 2). Par rapport aux trois souches de collection, des souches comme CCR10, CCR11 et CCR1, dans la première série, et CCK12 et CCKS2 dans la seconde série donnent des teneurs en azote total dans les parties aériennes de la plante très significativement supérieures à celles obtenues avec TAL 1, TAL 1806 ou TAL 1145. Malheureusement leurs pro-

ductions de biomasse aérienne de parties aériennes sont très modestes par rapport aux huit souches citées précédemment. A propos de ces huit souches, on remarque que globalement elles donnent des teneurs en azote total moyennes à l'exception des souches CCR10 et CCK13, dont les teneurs en azote sont parmi les trois valeurs les plus élevées de leur série respective. Par conséquent, ces deux souches sont très intéressantes car elles permettent une importante production de tiges et de feuilles dont la teneur en azote est très satisfaisante.

Conclusion de l'expérience 3 : il ressort de notre étude que nous avons pu identifier huit souches de *Rhizobium* qui ont amélioré très significativement, par rapport aux trois souches de référence que nous avons testées, la production de biomasse aérienne chez *C. calothyrsus*. En terme de teneurs en azote total dans les parties aériennes, deux de ces huit souches donnent également des teneurs élevées significativement supérieures à celles obtenues avec les souches TAL 1, TAL 1145 et TAL 1806. Nous devons maintenant vérifier le bon comportement symbiotique de ces deux souches au champ et voir si elles peuvent être utilisées comme inoculum de référence pour l'inoculation de *Calliandra*.

DISCUSSION

□ Suite aux travaux de PEOPLES *et al.* (1989), TURK et KEYSER (1992) et LAJUDIE *et al.* (1994) qui ont abouti à des résultats contradictoires sur l'aptitude de *C. calothyrsus* à noduler effectivement avec une large gamme de souches de rhizobium, il nous est apparu nécessaire de disposer de données infirmant ou confirmant cette absence de spécificité pour la nodulation. Toutes les souches que nous avons isolées à partir de no-

dules de *C. calothyrsus* récoltés à La Réunion, au Kenya, en Nouvelle-Calédonie et à Singapour sont des souches de *Rhizobium sensu stricto*. De tels résultats laissent penser qu'au champ, *C. calothyrsus* est plutôt nodulé par des souches de *Rhizobium* que par des souches de *Bradyrhizobium*. Les résultats de l'expérience 1 montrent que seules quelques souches de *Rhizobium* forment avec *C. calothyrsus* une symbiose efficiente ; il s'agit des souches TAL 1145 de *L. leucocephala*, TAL 1806 de *G. sepium* et PJ12 de *P. juliflora*. En revanche, les autres souches de rhizobium que nous avons testées, que ce soient les souches de *Bradyrhizobium* d'acacias et d'albizia ou les souches de *Rhizobium* de légumineuses annuelles, ne nodulent pas ou peu avec *C. calothyrsus*, et les quelques nodules formés s'avèrent être inefficients (cf. tableau II). TURK et KEYSER (1992) ont montré que *C. calothyrsus* a les mêmes affinités symbiotiques vis-à-vis de rhizobium que *G. sepium* et *L. leucocephala*. DIAGNE (1988) a également montré que la souche de *Rhizobium* PJ12 est efficiente avec *L. leucocephala* et que *P. juliflora* forme une symbiose efficiente avec des souches de *Rhizobium* de *L. leucocephala* et de *G. sepium* isolées au Sénégal. Au vu de l'ensemble de ces résultats, il semble que *C. calothyrsus*, *G. sepium*, *L. leucocephala* et *P. juliflora* appartiennent au même groupe de légumineuses ligneuses qui sont à la fois spécifiques pour la nodulation mais aussi pour l'efficacité symbiotique (activité fixatrice d'azote).

□ La caractérisation phénotypique des souches de notre collection de *Rhizobium* de *C. calothyrsus* a permis la mise en évidence d'un certain nombre de points :

- Nous avons relevé une assez grande diversité parmi nos souches en termes de caractéristiques bio-

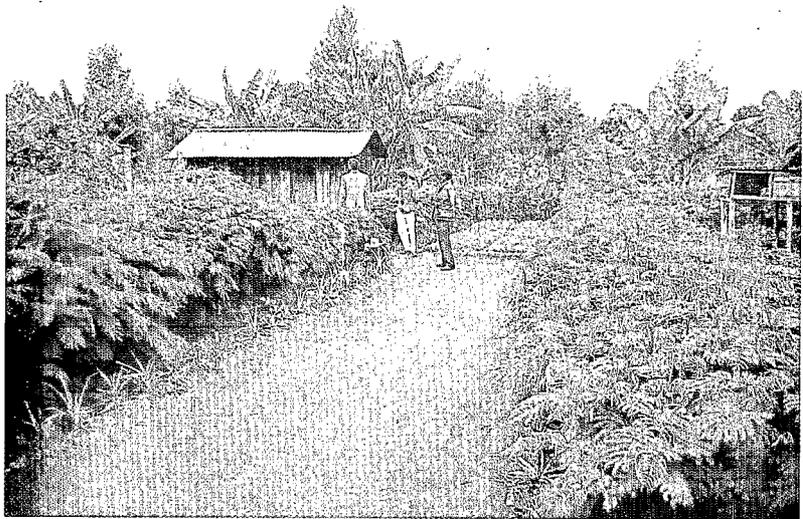
chimiques et métaboliques ; en particulier, des différences apparaissent entre certains des groupes géographiques de souches (La Réunion, Kenya, Nouvelle-Calédonie et Singapour).

- Malgré la variabilité évoquée plus haut, nous avons noté dans un même temps certaines similitudes phénotypiques entre les cinq groupes étudiés. Ainsi, les résultats obtenus suggèrent que l'on place dans un premier ensemble les souches des groupes 1 et 2, puis dans un second ensemble celles de groupes 3 et 4 et enfin, dans le troisième et dernier ensemble, les deux souches singapouriennes.

Cette répartition des souches de *C. calothyrsus* reste préliminaire car, pour ce genre de travail, il est nécessaire d'analyser les données à l'aide d'un logiciel du type de celui développé par la Société SAS (Méthode dite « Average-Linkage », VAX VMS) afin d'aboutir à l'élaboration d'un dendrogramme comme l'ont fait ZHANG *et al.* (1991) avec des souches d'*Acacia senegal* et de *Prosopis chilensis* isolées en Ethiopie. Cependant nous sommes obligés de constater que cette étude est incomplète ; en effet, cette collection de souches de *Rhizobium* de *C. calothyrsus* a été réalisée uniquement avec des nodules prélevés dans des pays où cette espèce a été introduite. Jusqu'à maintenant, nous n'avons pas de souches de l'aire d'origine de *C. calothyrsus*. Or, il est indispensable pour une étude comme la nôtre sur la diversité des rhizobiums de disposer de souches originaires du Honduras, du Mexique, du Costa Rica, du Nicaragua, afin de pouvoir comparer leur caractéristiques avec celles des souches isolées dans les zones d'introduction de *C. calothyrsus*. Actuellement, nous continuons de compléter notre collection avec des souches de rhizobium isolées dans de nou-

velles zones d'introduction de cette espèce (Côte-d'Ivoire, Burkina Faso, et quelques nouvelles souches de Nouvelle-Calédonie), mais il est très difficile pour le moment de se procurer des nodules et/ou des souches en provenance d'Asie ou d'Amérique centrale. Ce ne sera qu'après avoir comblé cette lacune qu'une étude globale de la diversité des souches de *C. calothyrsus* pourra être réalisée, et ainsi confirmer ou infirmer les résultats préliminaires présentés dans ce travail.

□ En ce qui concerne la nécessité d'inoculer *C. calothyrsus*, plusieurs auteurs estiment que les espèces de Légumineuses qui, comme *C. calothyrsus*, sont très spécifiques en terme de nodulation et de fixation d'azote doivent être systématiquement inoculées avec une souche de rhizobium sélectionnée au laboratoire, ceci afin d'éviter que les plantes soient peu ou pas nodulées (TURK, KEYSER, 1992 ; GANRY, DOMMERGUES, 1995). Mais une bonne nodulation ne signifie pas obligatoirement que la symbiose est efficace en terme de fixation d'azote (HALLIDAY, SOMASEGARAN, 1982). C'est pourquoi, une inoculation systématique des plantes avec des souches efficaces de rhizobium offre plus de garantie que la nodulation des plantes par les souches locales dont on ne sait rien sur leur efficacité symbiotique. Par cette approche d'inoculation systématique, la production d'*Acacia mangium* a pu être significativement améliorée en pépinière et au champ par rapport aux plantes naturellement nodulées par les souches locales de rhizobium (SOUVANNAVONG, GALIANA, 1990 ; GALIANA *et al.*, 1994 ; LESUEUR *et al.*, 1994). Dans chacun de ces essais, l'inoculation a été réalisée avec une souche australienne de *Bradyrhizobium* hautement efficace avec *A. mangium*, qui a été sélectionnée au laboratoire (GALIANA *et al.*, 1990). C'est



Haies de *Calliandra calothyrsus* dans une petite exploitation agricole située dans les environs d'Embu au Kenya.
Calliandra calothyrsus hedgerows in a small farm located in the vicinity of Embu in Kenya.

pour cette raison que nous avons adopté le même protocole pour optimiser la croissance et la fixation d'azote chez *C. calothyrsus*. Parmi notre collection de souches, nous avons ainsi identifié celles qui permettent à la fois les plus importantes productions de biomasse aérienne et les meilleures teneurs en azote total dans les parties aériennes (Expérience 3). Les figures 1 et 2 montrent que toutes les souches testées améliorent significativement les deux paramètres mesurés par rapport aux plantes-témoins non inoculées. Cela signifie que *C. calothyrsus* répond de manière satisfaisante à l'inoculation avec *Rhizobium*. Pour ces essais internationaux sur différentes provenances de *C. calothyrsus*, l'OFI et l'Université d'Hawaii (NIFTAL) recommandent aux utilisateurs d'inoculer systématiquement leurs semences avec différentes souches de *Rhizobium* de référence (MACQUEEN, 1993). C'est la raison pour laquelle nous en avons testé trois au cours de nos deux séries

d'expérimentations. Nous sommes parvenus ainsi à identifier deux souches de *Rhizobium* dont l'inoculation a permis d'obtenir des productions de biomasse aérienne et des teneurs en azote significativement supérieures à celles obtenues avec les trois souches de référence ; il s'agit des souches CCR10 et CCK13 (cf. fig. 1 et 2). Cependant, toutes nos expériences ont été réalisées en serre dans un substrat stérile (perlite-vermiculite). Au champ, les caractéristiques physico-chimiques du sol (pH, disponibilité en éléments minéraux, toxicité de certains éléments comme l'aluminium ou le manganèse...) jouent un rôle dans la survie des rhizobiums inoculés et dans les phénomènes de compétitivité entre les rhizobiums locaux et ceux inoculés pour noduler la plante-hôte et, par conséquent, influencent fortement le succès de l'inoculation des arbres (KOSSLAK, BOHLOOL, 1985 ; DOWLING, BROUGHTON, 1986 ; THIES *et al.*, 1992 ; LESUEUR *et al.*, 1995). La

prochaine étape de notre travail va donc consister à vérifier au champ si l'inoculation de *C. calothyrsus* avec les deux souches de *Rhizobium* que nous avons sélectionnées donne d'aussi bons résultats que ceux obtenus en serre (nous envisageons de mettre en place en Nouvelle-Calédonie et au Cameroun un ou deux essais d'inoculation de *C. calothyrsus*).

L'ensemble de tous ces résultats devrait nous fournir les éléments nécessaires pour pouvoir démontrer aux paysans utilisateurs de *C. calothyrsus*, que ce soit sous la forme de haies vives ou de haies fourragères, l'intérêt qu'ils peuvent avoir à inoculer leurs arbres pour augmenter la rentabilité de leurs exploitations agricoles. □

Remerciements : Les auteurs tiennent à remercier Marinette LIOUVILLE, ainsi que Robert PELLETIER et Brahim BAHJI pour leur assistance technique.

► Didier LESUEUR
Laboratoire de Biotechnologie
des Symbioses Forestières Tropicales
CIRAD-Forêt/ORSTOM
B.P. 5035
34032 MONTPELLIER CEDEX 1
France

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BREMNER J. M., MULVANEY C. S., 1982.
Nitrogen-total. In : Methods of Analysis, Part.2, Page A.L. Eds. Madison, Wisconsin, USA, American Society of Agronomy.

BROUGHTON W. J., DILWORTH M. J., 1971.
Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. Biochemistry Journal 125 :1075-1080.

DIAGNE O., 1988.
Rhizobium en symbiose avec *Prosopis juliflora* (Swartz) DC : Caractérisation et interaction avec la microflore antagoniste du sol. Thèse de l'Université de Lyon, France, 162 p.

DOWLING D. N., BROUGHTON W. J., 1986.
Competition for nodulation of legumes. Annual Review of Microbiology 40 : 131-157.

DREYFUS B. L., GARCIA J. L., GILLIS M., 1988.
Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., spp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. International Journal of Systematic Bacteriology 38 : 89-98.

GALIANA A., 1990.
La symbiose fixatrice d'azote chez *Acacia mangium*-rhizobium. Thèse de l'Université Paris VI, France, 246 p.

GALIANA A., CHAUMONT J., DIEM H. G., DOMMERGUES Y. R., 1990.
Nitrogen-fixing potential of *Acacia mangium* and *Acacia auriculiformis* seedlings inoculated with *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* spp. Biology and Fertility of Soils 9 : 261-267.

GALIANA A., PRIN Y., MALLET B., GNAHOUA G. M., POITEL M., DIEM H. G., 1994.
Inoculation of *Acacia mangium* with alginate beads containing selected *Bradyrhizobium* strains under field conditions : long-term effect on plant growth and persistence on the introduced strains in soils. Applied Environmental Microbiology 60 : 3974-3980.

GANRY F., DOMMERGUES Y. R., 1995.
Arbres fixateurs d'azote : champ ouvert pour la recherche. Agriculture et Développement 7 : 38-55.

GUTTERIDGE R. C., SHELTON H. M., 1994.
Forage tree legumes in tropical agriculture. Wallingford, U.K., CAB International, 389 p.

HALLIDAY J., SOMASEGARAN P., 1982.
Nodulation, nitrogen fixation and *Rhizobium* and strain affinities in the genus *Leucaena*. In : Proceedings of a Workshop *Leucaena* Research in the Asian-Pacific region, Singapore (23-26 November 1982), International Development Research Center (I.D.R.C.) and Nitrogen Fixing tree Association (N.F.T.A.) Eds, 27-32.

HALLIDAY J., SOMASEGARAN P., 1984.
The rhizobium germplasm resource at NIFTAL. Catalogue of strains. University of Hawaii, USA.

JORDAN D. C., 1984.
Rhizobiaceae, p. 234-245. In : N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. Baltimore, U.S.A., The Williams & Wilkins, Co.

KAN W. H., HU T. W., 1987.
Regeneration of deforested sites of coastal windbreaks by underplanting. Bulletin of the Taiwan Forestry Research Institute 2 : 1-15.

KOSSLAK R. M., BOHLOOL B. B., 1985.
Influence of environmental factors on inter-strain competition in *Rhizobium japonicum*. Applied and Environmental Microbiology 49 : 1128-1133.



- LAJUDIE P. de, WILLEMS A., POT B., DEWETTINCK D., MAESTROJUAN G., NEYRA M., COLLINS M. D., DREYFUS B., KERSTERS K., GILLIS M., 1994.
Polyphasic taxonomy of rhizobia : emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov. and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 44 : 715-733.
- LESUEUR D., TRAORE Y., GALIANA A., MALLET B., 1994.
Croissance et Nodulation d'*Acacia mangium* : Effet de l'inoculation avec rhizobium dans trois types de sol désinfectés de basse Côte-d'Ivoire. Bois et Forêts des Tropiques 241 : 29-38.
- LESUEUR D., CARRO DEL RIO M., DIEM H. G., 1995.
Modification of the growth and the competitiveness of a *Bradyrhizobium* strain obtained through affecting its siderophore-producing ability. In : Iron Nutrition in Soils and Plants, Abadia J. Ed. Dordrecht/Boston/London, Kluwer Academic Press, 59-66.
- LINDSTRÖM K., LEHTOMÄKI S., 1988.
Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* spp. (*Galega*) compared with other fast growing rhizobia. FEMS Microbiology Letters 50 : 277-287.
- MACQUEEN D. J., 1993.
Calliandra series *Racemosae* : Taxonomic information ; OFI seeds collections ; Trial design. U.K., Oxford Forestry Institute, 157 p.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 1983.
Calliandra : A versatile small tree for the humid tropics. Washington, D.C., National Academic Press, 52 p.
- PELISSOU F., 1993.
Valorisation du système agroforestier dans de petites exploitations diversifiées des Hauts de l'Ouest à La Réunion. DESS de l'Université Paris XII, 62 pages.
- PEOPLES M. B., FAIZAH A. W., RERKASEM B., HERRIDGE D. F., 1989.
Methods for evaluating nitrogen fixation in the field. Canberra, Australie, Australian Center for International Agriculture Research (ACIAR).
- SCHWYN D., NEILANDS J.B., 1987.
Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry 160 : 47-56.
- SINGLETON P. W., BOHLOOL B. B., NAKAO P. L., 1992.
Legume response to rhizobial inoculation in the tropics : myths and realities. In : Myths and Science of Soils in the Tropics, Lal R. and Sanchez P. Eds. Madison, U.S.A., American Society of Agronomy.
- SOUVANNAVONG O., GALIANA A., 1990.
Acacia mangium-rhizobium symbiosis : Selection and propagation of the host plant and the microorganism. In : Proceedings of a Workshop Research on Multipurpose tree Species in Asia, Los Baños (19-23 November 1990), Taylor D.A and MacDiken K.G. Eds. U.S.A. Winrock International Institute for Agriculture Development, p. 216-222.
- TASSIN J., PERRET S., CATTET R., 1995.
Modification de la porosité d'un andosol réunionnais sous une haie isohypse de *Calliandra calothyrsus*. Bois et Forêt des Tropiques 245 : 91-100.
- THIES J. E., BOHLOOL B. B., SINGLETON P. W., 1992.
Environmental effects on competition for nodule occupancy between introduced and indigenous rhizobia and among introduced strains. Canadian Journal of Microbiology 38 : 493-500.
- TURK D., KEYSER H. H., 1992.
Rhizobia that nodulate tree legumes : specificity of the host for nodulation and effectiveness. Canadian Journal of Microbiology 38 : 451-460.
- VINCENT J. M., 1970.
A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Biological Programme. Handbook n° 15. U.K. Blackwell, Oxford
- ZHANG X., HARPER R., KARSISTO M., LINDSTRÖM K., 1991.
Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. International Journal of Systematic Bacteriology 41 (1) : 104-113.

R É S U M É

LA SYMBIOSE *CALLIANDRA CALOTHYRSUS*-RHIZOBIUM

Depuis 1988, le Programme Agroforesterie du CIRAD-Forêt développée à la Réunion, au Burundi et en Nouvelle-Calédonie des recherches sur l'utilisation de *Calliandra calothyrsus* au sein de dispositifs agroforestiers. Afin d'optimiser le rendement de ces haies de *C. calothyrsus*, nous avons étudié les caractéristiques symbiotiques de cette espèce. Les résultats obtenus indiquent que *C. calothyrsus* est une plante-hôte spécifique en ce qui concerne la nodulation et l'aptitude à fixer l'azote. La caractérisation phénotypique de 37 souches de trois provenances géographiques (La Réunion, Kenya, Singapour et Nouvelle-Calédonie) a été effectuée. Un criblage en serre de ces souches a permis l'identification de huit souches dont l'effectivité (aptitude à fixer l'azote *in planta*) est supérieure à celle des meilleures souches de collection connues. La prochaine étape de ce travail va consister à vérifier au champ (Cameroun et Nouvelle-Calédonie), dans des conditions écophysiologiques aussi différentes que possible (que ce soit en terme de pH du sol, de température, de pluviométrie...), le bon comportement symbiotique des souches sélectionnées au laboratoire et à déterminer dans quelle mesure elles améliorent significativement la production de biomasse et surtout de fourrage, d'un point de vue qualitatif et quantitatif.

Mots-clés : *Calliandra calothyrsus*. *Rhizobium*. Fixation de l'azote. Efficacité symbiotique.

A B S T R A C T

CALLIANDRA CALOTHYRSUS-RHIZOBIUM SYMBIOSIS

Since 1988, the CIRAD-Forêt Agroforestry Programme has been carrying out several lines of research on the utilization of *Calliandra calothyrsus* within agroforestry systems on Reunion Island, in Burundi and in New Caledonia. In order to optimize the yield of *C. calothyrsus* hedges, we have investigated the rhizobium requirement of *C. calothyrsus* for forming nodules and fixing nitrogen. This species is shown to be a specific host plant in terms of nodulation and effectiveness. The phenotypical characterization of our 37 *Rhizobium sensu stricto* strains established from nodules of *C. calothyrsus* harvested on Reunion Island, and in Kenya, New Caledonia and Singapore shows that some significant differences have appeared between strains native to these four countries. When *C. calothyrsus* seedlings were inoculated with these *Rhizobium* strains, it was possible, after three months in the greenhouse, to identify eight strains which were able to improve significantly the growth (shoot dry weight) of *C. calothyrsus* in comparison with non-inoculated plants and plants inoculated with strains in the NifTAL collection. Two of these eight strains also significantly improved the total shoot nitrogen content of *C. calothyrsus*. The next step in our study will consist in verifying in field conditions (Cameroun and New Caledonia), the sound symbiotic behaviour of laboratory-selected *Rhizobium* strains, and determining how this inoculation can improve both the production and forage quality of *C. calothyrsus*.

Key words : *Calliandra calothyrsus*. *Rhizobium*. Nitrogen fixation. Symbiosis efficiency.

R E S U M E N

LA SIMBIOSIS *CALLIANDRA CALOTHYRSUS*-RHIZOBIUM

Desde 1988, el Programa Agroforestería del CIRAD-Forêt desarrolla, en colaboración con grupos agroforestales, una serie de investigaciones en La Reunión, Burundi y Nueva Caledonia, acerca de la utilización de *Calliandra calothyrsus*. Con el fin de optimizar el rendimiento de los setos de *C. calothyrsus*, hemos estudiado las características simbióticas de esta especie. Los resultados obtenidos indican que *C. calothyrsus* es una planta huésped específica en lo que concierne la nodulación y la aptitud para fijar el nitrógeno. Se realizó la caracterización fenotípica de 37 cepas de tres proveniencias geográficas (La Reunión, Kenia, Singapur y Nueva Caledonia). Un ensayo en invernadero de estas cepas ha permitido identificar ocho cepas cuya eficacia para fijar el nitrógeno in planta es superior a aquella de las mejores cepas de colección conocidas. La próxima etapa de nuestro trabajo consistirá en la verificación del buen comportamiento simbiótico de las cepas seleccionadas (Camerún y Nueva Caledonia), en condiciones ecofisiológicas tan diferentes como sea posible (en términos de pH del suelo, de temperatura, de pluviometría... etc.) y, a determinar en que medida ellas mejoran significativamente la producción de biomasa y, en particular, del forraje tanto del punto de vista cualitativo como cuantitativo.

Palabras clave : *Calliandra calothyrsus*. *Rhizobium*. Fijación del nitrógeno. Eficacia simbiótica.

SYNOPSIS

CALLIANDRA CALOTHYRSUS-RHIZOBIUM SYMBIOSIS

Specificity of the host plant for nodulation and nitrogen fixation

Phenotypical and symbiotic characterization of the microbial partner

D. LESUEUR, J. TASSIN, M.-P. ENILORAC, J.-M. SARRAILH and R. PELTIER

Calliandra calothyrsus is a small thornless fodder tree legume native to Central America and Mexico. It is utilized in its native range and in several tropical regions where it has been introduced with success. It is used in agroforestry systems for fuelwood, plantation shade, as an intercrop hedgerow and, more recently, as livestock forage. Like most leguminous trees, *C. calothyrsus* can form nodules and fix N₂ in symbiosis with rhizobia, a root nodule bacteria. Lack of information on the symbiotic characteristics of the microbial partner and the host plant do not allow the N₂-fixing capacity of *C. calothyrsus*-rhizobia symbiosis to be optimized in a « symbiotic way ». The objectives of this study were therefore as follows :

- As there is considerable confusion surrounding the rhizobia affinities of *C. calothyrsus* (PEOPLES *et al.*, 1989 ; TURK, KEYSER, 1992 ; LAUDIE *et al.*, 1994), we investigated the ability of this species to nodulate and fix N₂ when inoculated with a collection of rhizobia including both *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains.
- The establishment of a large collection of rhizobia isolated from nodules of *C. calothyrsus* harvested in Reunion Island, Kenya, New Caledonia and Singapore. The phenotypical characterization of these rhizobia was evaluated by biochemical and metabolic tests.
- The study of the response of *C. calothyrsus* to inoculation with the various isolates of rhizobia from Reunion Island, Kenya and New Caledonia.

MATERIALS AND METHODS

The provenance of *C. calothyrsus* under study was Suchitepequez in Guatemala (reference 92/9599). Seeds were supplied by the CIRAD-Forêt Department, Nogent/Marne, France. The mechanically scarified seeds were germinated on a perlite-vermiculite mixture under greenhouse conditions.

Experiment 1 : In order to investigate the affinity of *C. calothyrsus* with rhizobia, we have inoculated in greenhouse eight-day-old seedlings with eight strains of *Rhizobium sensu stricto* and 6 strains of *Bradyrhizobium* were inoculated in a greenhouse (Table II).

Experiment 2 : A total of 39 strains were used in this experiment. All these strains are listed in Table I. Several biochemical and metabolic tests were used to evaluate the diversity of these rhizobia from *C. calothyrsus* (Table III).

Experiment 3 : The aim of this experiment was to study the effect of inoculating *C. calothyrsus* with our thirty-seven rhizobia strains from Reunion Island, Kenya and New Caledonia, and to compare the results with those obtained with

non-inoculated plants, and with plants inoculated with strains of the NifTAL collection (HALLIDAY, SOMASEGARAN, 1984). We used the same experimental protocol as in experiment 1.

RESULTS

Experiment 1 : We can thus state that *C. calothyrsus* appears to be very specific not only in terms of nodulation but also effectiveness.

Experiment 2 : We observed that all the strains that were isolated were *Rhizobium* strains *sensu stricto*. If we try to make clusters among the five geographic groups of strains, it seems possible to distinguish 3 main arrangements : The first would contain groups 1 and 2 (strains of the collection and strains from Reunion Island). The second, would contain groups 3 and 4 (Kenya and New Caledonia). And lastly, the third would correspond to group 5 consisting of the 2 strains isolated in Singapore.

Experiment 3 : When *C. calothyrsus* seedlings were inoculated with the *Rhizobium* strains from our collection, it was possible, after three months in the greenhouse, to identify eight strains which were able to improve significantly the growth (shoot dry weight) of *C. calothyrsus* in comparison with non-inoculated plants and plants inoculated with strains in the NifTAL collection. Two of these eight strains also improved significantly the total shoot nitrogen content of *C. calothyrsus*.

DISCUSSION AND CONCLUSION

According to data in Table III, *C. calothyrsus* seems to be nodulated preferentially by *Rhizobium* strains rather than by *Bradyrhizobium* strains. Experiment 1 showed that *C. calothyrsus* was only nodulated effectively by *Rhizobium* strains from *L. leucocephala* (TAL 1145), *G. sepium* (TAL 1806) and *P. juliflora* (PJ12) (Table II). However, the several tested rhizobia strains isolated from other woody legumes, such as Australian acacias or *Albizia* species and from annual legumes such as chickpea, clover and alfalfa were unable to nodulate effectively with *C. calothyrsus*. Taking all these results with consideration, it seems that *C. calothyrsus*, *G. sepium*, *L. leucocephala* and *P. juliflora* belong to a common group of woody legumes which are specific for both nodulation and effectiveness.

Evaluation of the diversity within our collection of *Rhizobium* strains from *C. calothyrsus* has shown two important points : (1) *Calliandra* rhizobia in the five geographical groups are quite diverse with respect to their physiological and biochemical properties. This means that a natural diversity

may exist within the population of rhizobia from *C. calothyrsus* native to four countries in the world (Reunion Island, Kenya, New Caledonia and Singapore). (2) We have observed some similarity of features between certain groups of strains. The *Rhizobium* strains from our geographic groups 5 were thus distributed in three main arrangements. But our study is incomplete : indeed our collection of *Rhizobium* strains from *C. calothyrsus* has been established solely from nodules harvested in countries where this fodder tree legume has been introduced. So far, we have no rhizobia strains from the native area of *C. calothyrsus*. It is therefore essential for our study to have the types of strains native to Honduras, Mexico, Costa Rica, Nicaragua in order to compare their characteristics with those of the areas into which it has been introduced. We hope to solve these problems as soon as possible, and when our collection is complete, a global study on the diversity of rhizobia from *C. calothyrsus* will be carried out to ascertain whether or not our results presented in this report can be confirmed.

We have determined the effectiveness of *Rhizobium* strains from our collection in order to identify those which are the most effective (Experiment 3). Data from Figure 1 and 2 show the significant effect of inoculation with our *Rhizobium* strains on the shoot dry weight and the total shoot nitrogen of *C. calothyrsus* in comparison with non-inoculated plants. This means that *C. calothyrsus* responds satisfactorily to inoculation with *Rhizobium* strains. For these worldwide investigations on the trial performances of different seedlots of *C. calothyrsus*, OFI and the University of Hawaii recommended the use of several *Rhizobium* strains such as TAL 583, TAL 1145, TAL 1770, TAL 1806 and TAL 1887 for the inoculation of *C. calothyrsus* (MACQUEEN, 1993). Within our collection, we identified two interesting strains which give better results (high shoot dry weight and total shoot nitrogen content) than the three collection strains tested. These strains are : CCR10 and CCK13. This means therefore that some of our strains are more effective with *C. calothyrsus* than the collection strains. However, our experiment was carried out in a greenhouse and in a sterile mixture of perlite-vermiculite. Before spreading the inoculation of *C. calothyrsus* with one of these *Rhizobium* strains, we must verify whether they are also effective with *C. calothyrsus* when they are tested in field conditions (two field trials are in preparation for next year in New Caledonia). We will also be interested in the value of the forage produced depending on the provenances of *C. calothyrsus* and/or the *Rhizobium* strains tested.