



PHOTO 1. — *Parcelle de Casuarina equisetifolia sur une dune du littoral sénégalais (âge : 5 ans).
Les plants ont été inoculés en pépinière avant d'être transplantés (cliché E. Duhoux).*

Le laboratoire de biotechnologie des systèmes symbiotiques forestiers tropicaux de Nogent-sur-Marne ⁽¹⁾

RESUMEN

EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LOS SISTEMAS SIMBIÓTICOS FORESTALES TROPICALES (BSSFT) DE NOGENT-SUR-MARNE

El Laboratorio de Biotecnología de los Sistemas Simbióticos Forestales Tropicales (BSSFT) de Nogent-sur-Marne fue creado fundamentalmente con el objeto de estudiar la biología de las simbiosis fijadoras de nitrógeno en diversas especies leñosas tropicales, adoptando simultáneamente el método microbiológico (mejora del microorganismo simbiótico) y vegetal (mejora de la planta huésped).

(1) Adresse postale : 45bis, avenue de la Belle Gabrielle, 94736 Nogent-sur-Marne, Cedex, France.
Téléphone : (1) 43 94 40 00.
Télex : CETEFO 211085 F.

En este laboratorio se estudian tres tipos de asociaciones simbióticas :

- a) Simbiosis actinomicorizicas, especie modelo Casuarina equisetifolia*
- b) Leguminosas leñosas de zona húmeda, especie modelo Acacia Mangium.*
- c) Leguminosas leñosas de zona seca.*

El personal permanente de dicho Laboratorio está formado por cinco investigadores, más otros siete que se encuentran preparando sendas tesis. Además, el BSSFT acepta cursillistas franceses o extranjeros procedentes de los países de la CEE o de los países en vías de desarrollo.

Además de los invernaderos y de las cámaras de incubación para microorganismos y cultivos de tejidos perfectamente reguladas, el laboratorio de BSSFT cuenta con un equipo de microbiología convencional, formado principalmente por autoclaves, microscopios (fluorescente, microscopio invertido), un cromatógrafo en fase gaseosa, centrifugadoras, campanas de flujo laminar, dos tipos originales de fermentadores y un ultramicrotomo.

Dos de los resultados obtenidos hasta la fecha son muy alentadores. El primero está relacionado con la inoculación de Casuarina equisetifolia con frankia : las pruebas efectuadas en el campo demostraron que esta inoculación constituye la condición sine qua non del establecimiento de esta especie en las dunas desprovistas de nitrógeno. El segundo ejemplo se refiere a la posibilidad de aumentar la fijación de nitrógeno de los árboles por medio de la selección clonal : mediante dicho procedimiento fue posible duplicar la fijación de nitrógeno en la Casuarina equisetifolia en un lapso de tiempo reducido.

Actualmente, el BSSFT está desarrollando un nuevo procedimiento de acondicionamiento de los inóculos en matrices de polímeros

Depuis une dizaine d'années on assiste, dans le domaine de l'agriculture, au développement d'une deuxième révolution verte ayant pour objectifs l'obtention d'un matériel végétal caractérisé non seulement par des rendements plus élevés mais aussi par une résistance accrue aux agents pathogènes, une meilleure adaptabilité aux contraintes de l'environnement et des exigences réduites en éléments fertilisants. L'approche adoptée pour atteindre ces objectifs repose sur la création et la propagation rapide de cultivars possédant les caractéristiques requises au moyen de techniques fondées sur les cultures de tissus d'organes végétaux, de cellules et de protoplastes et aussi, depuis peu, aux techniques de recombinaison génétique.

Dans le domaine forestier, cette deuxième révolution verte, que l'on désigne aussi maintenant sous le nom de révolution biotechnologique, est à peine ébauchée. En ce qui concerne plus particulièrement les arbres vivant en association symbiotique avec des bactéries fixatrices d'azote (arbres fixateurs d'azote) ou des champignons mycorrhiziens (toutes les espèces forestières), l'amélioration des rendements, dans les conditions édaphiques et climatiques marginales, doit être fondée non seulement

sur des méthodes modernes d'amélioration du matériel végétal que nous venons d'évoquer mais aussi sur une meilleure exploitation des associations symbiotiques.

La laboratoire de Biotechnologie des Systèmes Symbiotiques Forestiers Tropicaux (BSSFT) de Nogent-sur-Marne a été créé à la fin de l'année 1985 pour étudier plus particulièrement la biologie des symbioses fixatrices d'azote chez des espèces ligneuses tropicales, en adoptant simultanément l'approche microbienne (amélioration du microorganisme symbiotique) et végétale (amélioration de la plante hôte).

Le BSSFT a pu être mis en place grâce à l'effort conjugué de cinq organismes : d'une part, le Ministère de l'Agriculture qui a pris en charge la rénovation des locaux sis à Nogent-sur-Marne, d'autre part, le CIRAD (CTFT), l'ORSTOM, le Ministère de la Recherche et le CNRS (contrat de recherche libre pour les années 1985 et 1986) qui ont contribué à l'équipement scientifique de base.

Compte tenu du délai nécessaire à la réalisation des travaux immobiliers, de l'acquisition du matériel et de la constitution des équipes, le BSSFT, n'a été vraiment fonctionnel qu'à partir de la fin de l'année 1986.

PROGRAMME DE RECHERCHE

La maîtrise des symbioses forestières tropicales en vue de leur application dans le cadre des projets de développement forestier, requiert le développement préalable de nos connaissances de base sur la biologie de ces associations. C'est pourquoi le programme du BSSFT réserve une large place aux recherches fonda-

mentales sur l'écologie, la physiologie et, prochainement, la génétique des deux partenaires des symbioses forestières tropicales. L'originalité du BSSFT réside dans le fait que les résultats de ces recherches fondamentales pourront d'autant plus facilement être exploités dans le cadre des programmes de recherches appli-

quées que chercheurs fundamentalistes et appliqués se côtoient dans le laboratoire. Le CTFT participe activement aux recherches appliquées, non seulement en mettant à la disposition du BSSFT un matériel végétal bien défini, mais aussi en mettant en place les expérimentations précises en milieu tropical.

De même que le CTFT et l'ORSTOM ont été associés à la mise en place et au développement du BSSFT, les programmes de recherche du BSSFT à Nogent, du laboratoire de l'ORSTOM à Dakar sont étroitement imbriqués et parfaitement complémentaires. Dans les deux laboratoires, on a focalisé les recherches sur certaines espèces ligneuses fixatrices d'azote qui constituent des modèles expérimentaux à partir desquels on extrapolera les résultats à des espèces voisines et qui, bien entendu, sont des espèces considérées comme particulièrement prometteuses pour les opérations de reforestation. Trois types d'associations symbiotiques sont étudiés.

1. Symbioses actinorhiziennes, espèce modèle *Casuarina equisetifolia*

Il s'agit là de systèmes fixateurs d'azote encore peu connus sur le plan académique et sur le plan des applications potentielles. Le groupe du BSSFT ayant dans ce domaine une avance indiscutable sur le plan mondial, nous avons tout naturellement mis l'accent sur l'étude de la biologie des *Frankia*, actinomycètes fixateurs d'azote, associés aux Casuarinacées. Les recherches entreprises portent sur les points suivants : croissance en batch ou en culture continue, mécanismes impliqués dans la sénescence précoce des cultures (protéases, produits de métabolisme), genèse et développement des différents types de structures (hyphes, sporanges, vésicules, hyphes toruleux reproductifs), écologie et mécanisme de l'infection des racines.

Parallèlement, on a démarré les études sur l'embryogénèse somatique de plantes-hôtes (*Casuarina equisetifolia* et *Allocasuarina stricta*), le but étant d'obtenir des semences artificielles sélectionnées et génétiquement identiques. On tentera aussi de construire de nouveaux systèmes fixateurs d'azote en faisant appel aux cultures de protoplastes et aux transformations génétiques.

En se fondant sur les résultats obtenus avec *Casuarina equisetifolia*, on initiera des investigations sur *Allocasuarina decaisneana*, Casuarinacée particulièrement prometteuse en zone semi-aride en raison de sa résistance remarquable à la sécheresse. Ces dernières investigations devraient porter à la fois sur le *Frankia* spécifique associé à cette espèce (souche non encore isolée) et la méthodologie de la multiplication végétative. Ultérieurement, on tentera d'améliorer la fixation d'azote chez *Casuarina cristata*, dont certaines provenances semblent particulièrement prometteuses en Afrique de l'Ouest en raison de leur bonne tolérance à l'aridité.

Parallèlement, sont entreprises au laboratoire ORSTOM de Dakar, qui regroupe également des équipes du



PHOTO 2. — Nodules de *Casuarina equisetifolia* prélevés dans un reboisement âgé de 7 ans également installé sur les dunes du littoral sénégalais. Contrairement aux nodules des légumineuses annuelles, les nodules des Casuarinacées sont pérennes et peuvent atteindre jusqu'à 20 cm de diamètre. Les nodules figurant sur le cliché ont un diamètre de l'ordre de 5 cm (cliché H. G. Diem).

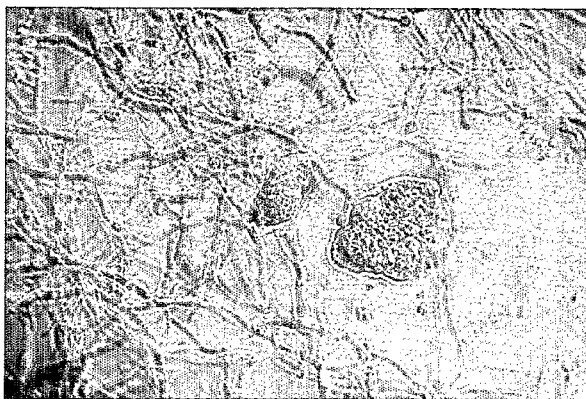


PHOTO 3. — La préparation des inoculum pour Casuarinacées requiert la maîtrise de la culture des *Frankia*, actinomycètes spécifiques responsables de la fixation d'azote au sein des nodules. Le cliché représente une culture *in vitro* de *Frankia*, avec ses structures dont les plus caractéristiques sont les hyphes filamenteux et les sporanges. Un des objectifs du BSSFT est précisément de perfectionner la technologie de la fabrication des inoculum correspondants en vue de faciliter leur utilisation en pratique forestière (cliché H. G. Diem).

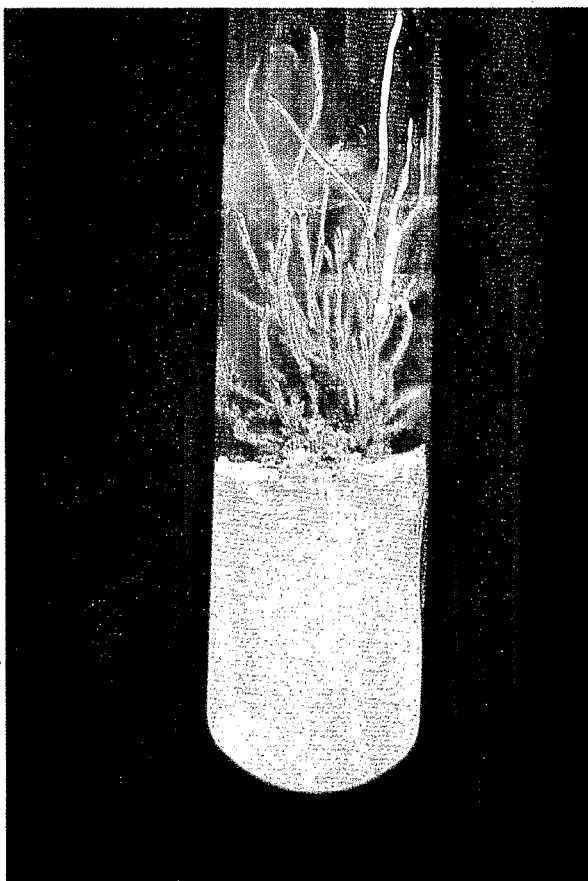


PHOTO 4. — Dans le cadre de son programme de multiplication végétative, le BSSFT a commencé à mettre au point des techniques originales de micropropagation des Casuarinacées. Le cliché ci-dessus montre les premiers résultats obtenus pour une espèce de *Casuarina* sensu stricto : après 1 mois de culture, chaque explant fournit 30 à 60 rameaux néoformés qui constituent autant de microboutures (l'explant original, qui est en cours de dessèchement, est bien visible à droite de la touffe de rameaux) (cliché E. Duhoux).

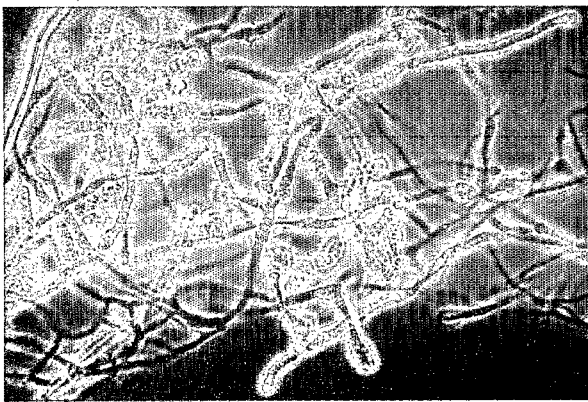


PHOTO 5. — Contrairement à Rhizobium, Frankia peut former des structures de résistance, spores et hyphes toruleux (RTH), permettant d'assurer la survie du microorganisme dans des conditions environnementales défavorables. Au microscope en contraste de phase, les hyphes toruleux apparaissent très réfringents en comparaison avec les hyphes végétatifs normaux (cliché H. G. Diem).

CTFT et de l'ISRA (Institut Sénégalais de Recherches Agricoles), des recherches portant sur (1) les ectomycorhizes de *Casuarina equisetifolia*, (2) la sélection clonale de *Casuarina equisetifolia* et *Allocasuarina decaisneana* (3), la fixation d'azote potentielle et réelle chez ces deux espèces, en faisant appel aux méthodes isotopiques (enrichissement en ^{15}N et abondance naturelle de ^{15}N).

2. Légumineuses ligneuses de zone humide, espèce modèle *Acacia mangium*

Acacia mangium est probablement l'une des espèces d'Acacia les plus prometteuses pour la production de biomasse en zone tropicale humide. En effet, cette légumineuse à croissance très rapide est à la fois peu exigeante sur le plan nutritionnel (alors que les *Leucaena* sont très exigeants) et probablement excellente fixatrice d'azote, le potentiel correspondant pouvant certainement être considérablement amélioré par sélection du rhizobium et par sélection de la plante-hôte elle-même.

Au BSSFT, les recherches portent en particulier sur la sélection de la plante-hôte en fonction de sa nodulation et de son potentiel fixateur d'azote. Pour atteindre ce dernier objectif, on fera appel aux techniques de micropropagation et d'embryogenèse somatique.

Au Centre ORSTOM de Dakar, les recherches sur *Acacia mangium* portent (1) sur la sélection et la génétique des rhizobiums (2) sur l'association ectomycorhizienne.

Quant à l'évaluation de la fixation d'azote *in situ*, on prévoit qu'elle pourra être effectuée dans des dispositifs d'essai du CTFT outre-mer, notamment au Congo, en faisant éventuellement appel à l'évaluation de l'abondance naturelle en ^{15}N .

Les recherches sur *A. mangium* seront ultérieurement extrapolées à d'autres acacias du même groupe, notamment *A. aulacocarpa* et *A. auriculiformis* qui semblent mieux adaptés à certaines situations que *A. mangium* lui-même.

3. Légumineuses ligneuses de zone sèche

Dans ce domaine, l'activité du BSSFT est essentiellement limitée à la mise au point des techniques de micro-

propagation d'*A. albida* en collaboration avec l'Université de Dakar.

Au Centre ORSTOM de Dakar, et en association avec le CTFT et l'ISRA, les investigations sur *Acacia senegal* et certaines autres espèces d'acacias sahéliens concernent la taxonomie et les propriétés symbiotiques des rhizobiums. Le programme de recherche qui

sera lancé prochainement en association avec le CTFT aura pour objet la sélection d'*Acacia senegal* en fonction de la fixation d'azote et de la production de gomme. Parallèlement à ces investigations sur les acacias sahéliens, on a initié les investigations sur les acacias australiens de zone sèche. Des recherches sur les variations inter- et intraspécifiques du potentiel fixateur d'azote ont été entreprises au Sénégal depuis un an.

MOYENS

L'effectif des chercheurs permanents est actuellement de cinq, les salaires correspondants étant supportés par le CTFT (2 chercheurs), le CNRS (2 chercheurs) et l'Université (1 enseignant-chercheur). A ces chercheurs, il convient d'ajouter sept thésards.

Le BSSFT accueille en outre des stagiaires français ou étrangers en provenance de la CEE ou des pays en voie de développement (le nombre est actuellement plafonné à quatre par an pour des raisons financières et d'encadrement).

En dehors des serres et des chambres d'incubation pour microorganismes et cultures de tissus parfaitement régulées, le laboratoire de BSSFT dispose d'un équipement de microbiologie classique comprenant notamment des autoclaves, des microscopes (fluorescence, microscope inversé), un chromatographe en phase gazeuse, des centrifugeuses, des hottes à flux laminaire, deux types de fermenteurs originaux, un spectrophotomètre, un sonicateur, un congélateur à -80°C , un lyophilisateur de grande capacité. Cet équipement est

PHOTO 6. — Parcelle d'*Acacia mangium* dans un dispositif de comparaison de provenances mis en place à la station CTFT de Loandjili au Congo. Les arbres sont âgés de 2 ans (cliché Y. Dommergues).



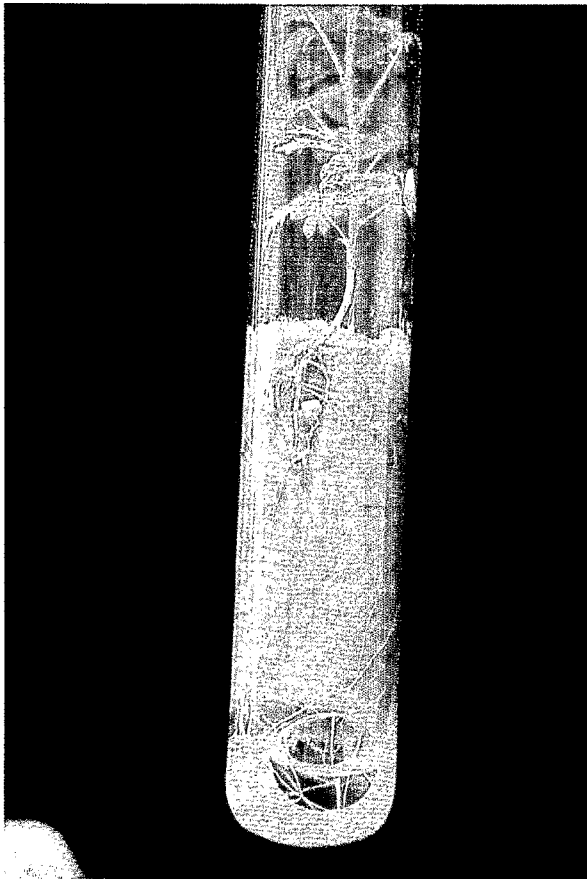


PHOTO 7. — L'amélioration de la fixation de l'azote chez les Légumineuses forestières est fondée, en partie, sur la sélection des souches de Rhizobium. Afin de faciliter cette opération, on vient de mettre au point au BSSFT une technique originale de culture aseptique d'Acacia mangium permettant de tester les souches de Rhizobium dans des conditions rigoureuses. Cette méthode pourrait aussi être utilisée pour le criblage des clones d'Acacia mangium les plus performants en ce qui concerne leur aptitude à fixer l'azote en association avec des souches de Rhizobium sélectionnées (cliché A. Galiana).

PHOTO 8. — Test en serre d'effectivité de Rhizobium d'Acacia mangium : à gauche, souche effective ; à droite, souche non effective (cliché A. Galiana).



actuellement suffisant pour mener à bien les recherches entreprises mais ne permettra pas de développer les recherches prévues ultérieurement impliquant des techniques plus élaborées en ultramicroscopie et biochimie. L'équipement actuel a été complété récemment par l'acquisition d'un ultramicrotome (pour la préparation des coupes), les observations étant effectuées sur un microscope électronique appartenant à un autre laboratoire.

Dans les programmes définis ci-dessus, le CTFT est amené à intervenir à deux niveaux : en amont, en fournissant un matériel génétique défini grâce à sa banque de germoplasme d'espèces ligneuses, et en aval, en effectuant des expérimentations au champ, telles que comparaisons de provenances ou essais d'inoculation en vue des applications aux projets de développement forestier.

Les études conduites au BSSFT Nogent et à l'ORSTOM Dakar aboutiront à l'obtention de souches performantes de *Frankia* ou *Rhizobium* et de champignons mycorrhiziens qui serviront de base à la fabrication des inoculums. Sous l'égide de l'ORSTOM et de l'ANVAR, le BSSFT est engagé dans un contrat d'innovation avec un industriel, ce contrat portant sur le développement d'un nouveau système de culture de microorganismes symbiotiques et d'un nouveau procédé de conditionnement des inoculums en matrices polymériques.

AVENIR DU BSSFT

Les premiers résultats obtenus dans le domaine de la biotechnologie forestière sont très encourageants. Rappelons deux d'entre eux. Le premier concerne l'inoculation des *Casuarina equisetifolia* avec *Frankia* : les essais conduits au champ ont prouvé que cette inoculation était la condition sine qua non de l'établissement de cette espèce sur les dunes carencées en azote. Le deuxième exemple concerne la possibilité d'accroître la fixation d'azote des arbres par sélection clonale : par ce procédé, il a été possible, en un laps de temps réduit, de doubler la fixation d'azote chez *Casuarina equisetifolia*. Ces résultats sont particulièrement prometteurs et montrent qu'à court terme, il est possible d'accroître fortement la production forestière en faisant appel à des biotechnologies actuellement en plein essor.

Compte tenu de l'installation récente du laboratoire du BSSFT, il n'est pas encore possible de développer à Nogent de recherches fondamentales sur les champignons mycorrhiziens. Par contre, des recherches, typiquement de nature appliquée, ont démarré depuis quelques années sur le terrain dans le cadre d'une collaboration CTFT/INRA, ces recherches portant notamment sur les ectomycorhizes au Congo (Pin, Eucalyptus) et sur les endomycorhizes au Burkina Faso (Acacia).

Dans un avenir plus lointain, il est possible d'envisager le recours aux techniques de génétique classique (notamment pour les champignons ectomycorhiziens) ou de recombinaison génétique à la fois chez la plante-hôte et chez le microorganisme associé, techniques qui devraient permettre l'obtention de nouveaux systèmes fixateurs d'azote, ou de nouveaux systèmes mycorhiziens plus efficaces non seulement dans les conditions optimales, mais aussi en présence des contraintes particulièrement sévères en milieu tropical, telles qu'acidité, alcalinité, salinité, aridité ou attaques de pathogènes divers.

On peut espérer que les organismes de tutelle qui jusqu'à présent ont donné au BSSFT leur appui (CIRAD, ORSTOM, CNRS) continueront à soutenir l'effort de ce jeune laboratoire dont la vocation est à la fois de faire progresser nos connaissances fondamentales indispensables sur les symbioses forestières et de promouvoir le transfert aux pays du Tiers Monde de biotechnologies qui devraient contribuer à résoudre progressivement le problème de leur auto-suffisance énergétique et même alimentaire par le biais du développement de l'agroforesterie.

BSSFT, a laboratory for tropical nitrogen-fixing trees

(CTFT/ORSTOM/CNRS)
NOGENT-SUR-MARNE, FRANCE (1)

PRESENTATION OF MAIN OBJECTIVES

1. Actinorhizal symbioses

Casuarinaceae number among the promising exotic species because they are adaptable to a wide range of environments including infertile, dry, and saline sites (Fig. 1 and 2, p. 41 and 43), and offer interesting research challenges not only to foresters and agronomists (contributing to the reforestation of adverse sites, and the establishment of agroforestry systems), but also to basic research scientists (unlike *Rhizobium-legume* symbioses, actinorhizal symbioses, especially in the tropics, are still insufficiently studied).

On the one hand, the BSSFT program concentrates on the following aspects of the biology of Frankia, the symbiotic nitrogen-fixing microorganism: growth in batch, continuous culture, the mechanisms of early senescence of cultures (role of proteases and diverse specific metabolites), genesis and development of the different types of structures (hyphae, sporangia, vesicles and reproductive torulose hyphae) (Fig. 3 and 5, p. 43 and 44), population dynamics in the soil. In addition, a new type of inoculum will be devised.

On the other hand, studies on the host plant highlight the selection and micropropagation of elite trees

(1) 45 bis, avenue de la Belle-Gabrielle, 94736 Nogent-sur-Marne Cedex, France. Phone: (1) 43 94 43 00. Telex: CETEFO 211085 F.