



Photo Duhoux.

FIG. 1. — *Plantation de Filao (Casuarina equisetifolia) sur le littoral sénégalais.*

AMÉLIORATION DE LA FIXATION D'AZOTE CHEZ LE FILAO (*Casuarina equisetifolia*) PAR SÉLECTION CLONALE

par B. SOUGOUFARA (1), E. DUHOUX (2), M. CORBASSON (3) et Y. DOMMERGUES (3)

SUMMARY

IMPROVEMENT OF NITROGEN FIXATION BY *CASUARINA EQUISETIFOLIA* THROUGH CLONAL SELECTION

Two individual seedlings of Casuarina equisetifolia exhibiting conspicuous differences in their nodule numbers were identified in a preliminary screening experiment. Then, these individuals were vegetatively propagated as cuttings. One of the clones thus

- (1) Direction des Eaux et Forêts et ORSTOM, BP 1386, Dakar, Sénégal.
- (2) Université Paris 7, laboratoire des membranes biologiques, et BSSFT.
- (3) BSSFT (CTFT/ORSTOM/CNRS), Nogent-sur-Marne.

obtained was shown to fix 1.6 times more nitrogen and produce a biomass 2.6 times higher than the other clone, the inoculation having been achieved with the same strain of Frankia. To avoid plagiotropism and other defects observed in cuttings, we devised an original method of micropropagation based on the use of immature female inflorescences as explants.

RESUMEN

MEJORA DE LA FIJACION DE NITROGENO EN *C. EQUISETIFOLIA* POR SELECCIÓN CLONAL

En un muestreo preliminar se han identificado dos brotes de *Casuarina* que exhiben marcadas diferencias en el número de sus nódulos.

Estos individuos fueron multiplicados vegetativamente por esqueje uno de estos clones, así obtenido, muestra que fijó 1.6 veces más nitrógeno y produce 2.6 veces más biomasa que el otro.

La inoculación ha sido llevada a cabo con la misma cepa de Frankia.

Para evitar el plagiotropismo y otros defectos observados debido al medio de propagación por esqueje hemos puesto a punto un método original de micropropagación basado en el uso de inflorescencias femeninas inmaduras como material de partida.

INTRODUCTION

Il y a de nombreuses années que l'on a reconnu le rôle de la plante hôte dans les symbioses fixatrices d'azote chez les légumineuses cultivées (CALDWELL et VEST, 1977).

Cependant, c'est seulement récemment que quelques groupes de chercheurs ont tenté d'exploiter cette donnée pour améliorer le potentiel fixateur d'azote de ces plantes (ex. ATTEWELL et BLISS, 1985 ; PHILIPPS et TEUBER, 1985 ; GRESSHOFF *et al.*, 1985). Dans le cas des plantes ligneuses fixatrices d'azote (légumineuses ligneuses ou plantes actinorhiziennes), cette possibilité n'avait pas encore été explorée jusqu'à présent.

Au cours de nos recherches récentes sur la fixation d'azote par *Casuarina equisetifolia* (GAUTHIER *et al.*, 1985), nous avons remarqué que les semis de cette

espèce présentaient des variations considérables dans leur vitesse de croissance et dans leur nodulation. C'est pourquoi nous avons entrepris de faire un criblage ayant pour objet l'identification d'individus caractérisés par des potentiels fixateurs d'azote différents. Parallèlement, nous avons mis au point une méthode de micropropagation spécialement adaptée au cas de *Casuarina equisetifolia*, en vue d'assurer la multiplication à grande échelle de clones sélectionnés pour leur potentiel fixateur d'azote élevé.

Nous présenterons successivement ici une étude comparative du potentiel fixateur d'azote de deux clones de *Casuarina equisetifolia* identifiés récemment et une méthode originale de micropropagation de *Casuarina equisetifolia* (Fig. 1).

COMPARAISON DE DEUX CLONES DE *CASUARINA EQUISETIFOLIA*

Au cours d'une expérience de criblage préliminaire, nous avons identifié deux plants issus de semis présentant des aptitudes différentes à la nodulation. On a multiplié ces deux individus par bouturage en utilisant des explants de 4-5 cm. L'enracinement a été satisfaisant. Les clones ainsi obtenus ont été appelés α et β . On a étudié leur aptitude à noduler et à fixer l'azote en les cultivant sur un sol déficient en azote. Un lot de boutures a été inoculé avec la souche de *Frankia* ORS021001 (DIEM *et al.*, 1983), alors que l'autre lot n'a pas été inoculé. Les mesures effectuées sur les boutures âgées de 7 mois (Tableau 1) ont montré que les deux clones α et β -non inoculés poussaient aussi mal l'un que l'autre. En revanche, dans le cas où l'on avait procédé à l'inoculation, la croissance des plantes a été satisfaisante. Il est apparu des différences importantes entre les deux clones inoculés. La biomasse (exprimée en poids sec et en azote total) du clone β a été 2,6 fois plus importante

que celle du clone α . Parallèlement le poids des nodules et l'activité fixatrice d'azote, exprimée en activité réductrice d'acétylène (ARA) par plante, du clone β ont été significativement 1,6 fois plus élevés que les caractéristiques homologues du clone α . Il est intéressant de noter que l'activité fixatrice d'azote spécifique (ARA exprimée en fonction du poids de nodule) des deux clones n'a pas été significativement différente. On pouvait s'attendre à un tel résultat, puisque cette dernière caractéristique est probablement sous la dépendance du génotype de la souche de *Frankia* utilisée.

Cette expérience montre clairement que la différence de potentiel fixateur d'azote qui existe entre les clones α et β est fortement liée à l'aptitude à la nodulation des clones eux-mêmes. Des essais au champ actuellement en cours semblent bien confirmer la supériorité du clone β en ce qui concerne son potentiel fixateur d'azote.

TABLEAU 1
COMPARAISON DE DEUX CLONES DE *CASUARINA EQUISETIFOLIA* (1)
(BOUTURES ÂGÉES DE 7 MOIS)

	Parties aériennes			Nodules, poids sec (mg/plante)	ARA (2) par	
	poids sec (mg/plante)	N %	N total (mg/plante)		plante	g nodule
Pas d'inoculation						
<i>Clone α</i>	130 a	0,73 a	0,95 a	0 a	0 a	0 a
<i>Clone β</i>	90 a	1,02 a	0,92 a	0 a	0 a	0 a
Inoculation avec <i>Frankia</i> (3)						
<i>Clone α</i>	660 b	1,71 b	11,29 b	54 b	2,88 b	54 b
<i>Clone β</i>	1.730 c	2,02 c	34,93 c	88 c	4,58 c	56 b

(1) Neuf répétitions.

(2) Activité réductrice d'acétylène exprimée en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ par plante ou par g de nodule (poids sec).

(3) Chaque bouture a été inoculée avec 2 ml d'une culture âgée de 4 semaines de la souche de *Frankia* ORS021001 (ce qui correspond à 20 μg de protéines microbiennes).

Les chiffres dans les mêmes colonnes suivis d'une même lettre ne diffèrent pas significativement pour $P = 0,05$ (poids des nodules, ARA) ou pour $P = 0,01$ (poids, teneur en N et N % des parties aériennes).

MICROPROPAGATION DE *CASUARINA EQUISETIFOLIA*

Depuis plusieurs années, on a eu recours au bouturage pour multiplier certaines espèces de *Casuarina* (SOMASUNDARAN et JAGADEES, 1977 ; HUSAIN et PONNUSWAMY, 1980 ; LUNDQUIST et TORREY, 1984 ; ELLAKANY et SHEPHERD, 1984). Les expériences que nous avons effectuées de notre côté ont montré que les boutures de *Casuarina equisetifolia* s'enracinaient facilement, mais nous avons trouvé que les boutures obtenues à partir d'arbres adultes présentaient souvent des degrés variables de plagiotropisme. C'est pourquoi nous avons tenté de mettre au point une méthode donnant des plants ne présentant pas ce défaut. Considérant avec BONGA et DURZAN (1982) que, chez la plupart des arbres, certaines zones conservent des caractères de juvénilité plus longtemps que d'autres zones, nous avons utilisé comme explants des inflorescences femelles immatures (IFI), en espérant que ces organes allaient conserver au moins partiellement leur caractère juvénile. Des IFI excisées d'un arbre adulte ont donné de multiples bourgeons après une incubation de 4 semaines sur milieu de Murashige et Skoog (1962) renfermant par litre 0,05 μmol d'acide α -naphtalène acétique (NAA) et 11,1 μmol de 6-benzylaminopurine (BAP). Les bourgeons axillaires ont donné des tiges de 4-5 cm de long 5 semaines après le transfert des IFI sur un milieu iden-

tique, mais enrichi en charbon actif, que nous avons appelé milieu de multiplication (Fig. 2). L'enracinement a été induit sur un troisième milieu sans BAP ni charbon mais additionné de NAA à la concentration de 2 μmol par litre, que nous avons appelé milieu d'enracinement (Fig. 3). Les plantules ainsi obtenues ont été ensuite transférées dans des pots renfermant un sol très sableux, sol Dior de Bel-Air, Dakar (GAUTHIER *et al.*, 1985), où leur croissance a été satisfaisante. On n'a décelé aucune tendance à la plagiotropie (DUHOUX *et al.*, 1986).

Les IFI semblent donc constituer de bons explants lorsque l'on a affaire à des *Casuarina equisetifolia* adultes. Il est probable que les IFI pourront être utilisés aussi pour d'autres Casuarinacées. Il est intéressant de noter que la période pendant laquelle on peut récolter les IFI sur les arbres peut être considérablement allongée en arrosant les pieds mères.

Des recherches sont en cours pour améliorer la production des bourgeons et le développement des racines sur les microboutures, pour déterminer la période optimale d'excision des IFI et pour vérifier l'aptitude à noduler des plantules lors de leur transfert dans les pots.

CONCLUSION

Pour accroître la fixation d'azote, on cherche habituellement à sélectionner les souches associées de *Rhizobium* ou de *Frankia* en fonction de leur effectivité mais

on néglige très généralement l'approche qui consiste à sélectionner la plante hôte en fonction de ses performances symbiotiques. Les résultats préliminaires pré-

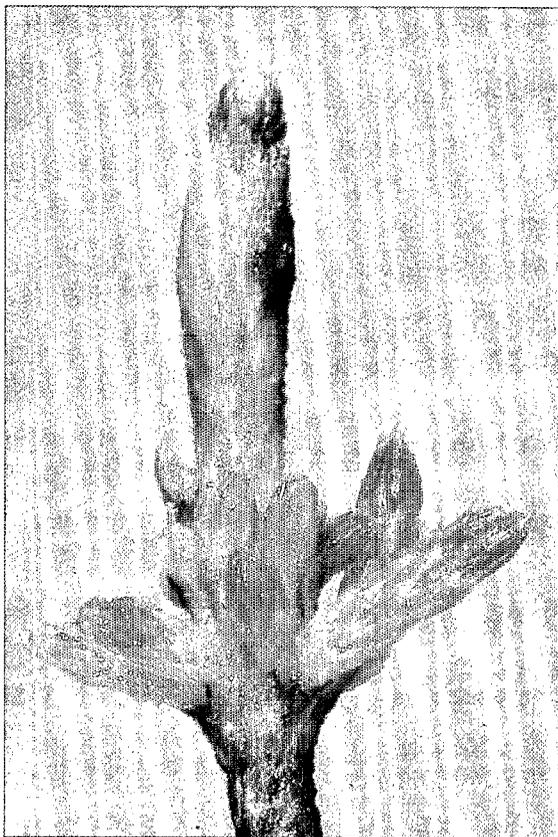


FIG. 2. — Nombreux rameaux néoformés à la base de l'inflorescence immature (IFI) après 5 semaines de culture sur le milieu de multiplication.

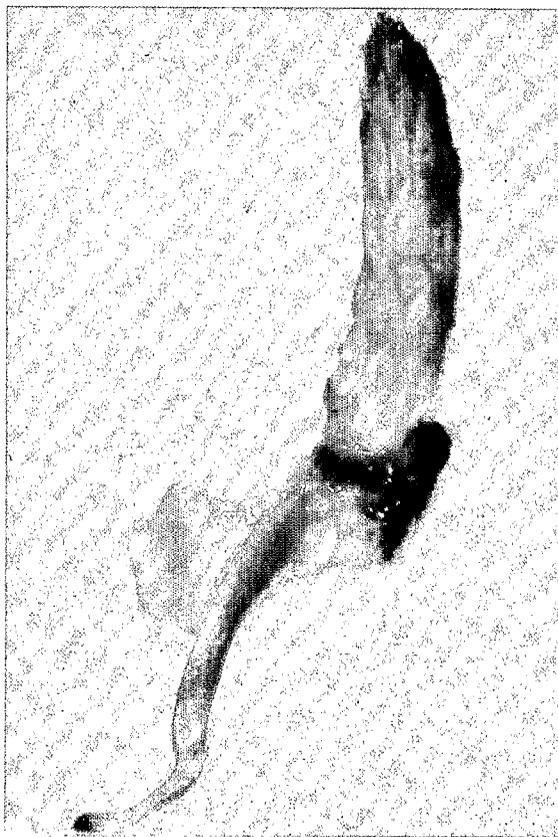


FIG. 3. — Rhizogénèse sur une microbouture placée 2 semaines dans le milieu d'enracinement.

sentés ici indiquent clairement que la deuxième approche est particulièrement prometteuse dans le cas d'espèces caractérisées par une grande variabilité génétique, comme *Casuarina equisetifolia*. Nous avons montré que cette variabilité concernait non seulement la vitesse de croissance, mais aussi le potentiel fixateur d'azote.

L'exploitation de cette variabilité fondée sur le repérage des génotypes les plus intéressants devrait permettre d'obtenir des augmentations de rendement substantiel-

les dans les plantations effectuées dans des sols déficients en azote.

La sélection des génotypes supérieurs doit obligatoirement être associée à l'amélioration des méthodes de multiplication végétative, permettant ainsi la production massive et régulière de plants de qualité. Les progrès récents réalisés dans la technique de micropropagation de *Casuarina equisetifolia* vont permettre la diffusion dans le monde entier des clones caractérisés par un pouvoir fixateur d'azote élevé.

RÉFÉRENCES

- ATTEWELL (J.) and BLISS (F. A.), 1985. — Host plant characteristics of common bean lines selected using indirect measures of N_2 fixation, pp. 3-9, in : H.J. EVANS, P. J. BOTTOMLEY and W. E. NEWTON eds., *Nitrogen fixation research progress*. Nijhoff/Junk, The Hague.
- BONGA (J. M.) and DURZAN (D. J.), (eds.), 1982. — *Tissue culture in forestry*. Nijhoff/Junk, The Hague.
- CALDWELL (B. E.) and VEST (H. G.), 1977. — Genetic aspects

- of nodulation and dinitrogen fixation by legumes : the macrosymbiont, pp. 557-573, in : R. W. F. HARDY and W. S. SILVER eds., *A treatise on dinitrogen fixation*. Wiley and sons, New York.
- DIEM (H. G.), GAUTHIER (D.) and DOMMERGUES (Y.), 1983. — An effective strain of *Frankia* from *Casuarina*. *Canadian Journal of Botany*, 61, 2815-21.
- DUHOUX (E.), SOUGOUFARA (B.) and DOMMERGUES (Y.),

1986. — Propagation of *Casuarina equisetifolia* through axillary buds of immature female inflorescences cultured *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 3, 161-164.
- EL-LAKANY (M. H.) and SHEPHERD (K. R.), 1984. — Preliminary observations on stump propagation in *Casuarina cunninghamiana*. *Australian Forest Research*, 14, 243-7.
- GAUTHIER (D.), DIEM (H. G.) and DOMMERGUES (Y. R.), 1985. — Assessment of N₂ fixation by *Casuarina equisetifolia* inoculated with *Frankia* ORS21001 using ¹⁵N methods. *Soil Biology and Biochemistry*, 17, 375-9.
- GRESSHOFF (P. M.), DAY (D. A.), DELVES (A. C.), MATHEWS (A. P.), OLSSON (J. E.), PRICE (G. D.), SCHULLER (K. A.) and CARROLL (B. J.), 1985. — Plant host genetics of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in pea and soybean, pp. 19-25, in : H. J. EVANS, P. J. BOTTOMLEY and W. E. NEWTON eds., *Nitrogen fixation research progress*. Nijhoff/Junk, The Hague.
- HUSAIN (A. M. M.) and PONNUSWAMY (P. K.), 1980. — Propagation of *Casuarina junghuhniana* by planting shoots and root suckers. *Indian Forester*, 106, 298-9.
- LUNDQUIST (R.) and TORREY (J. G.), 1984. — The propagation of *Casuarina* species from rooted stem cuttings. *Botanical Gazette*, 145, 378-84.
- MURASHIGE (T.) and SKOOG (F.), 1962. — A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 473-97.
- PHILLIPS (D. A.) and TEUBER (L. R.), 1985. — Genetic improvement of symbiotic nitrogen fixation in legumes, pp. 11-18, in : H. J. EVANS, P. J. BOTTOMLEY and W. E. NEWTON eds., *Nitrogen fixation research progress*. Nijhoff/Junk, The Hague.
- SOMASUNDARAN (T. R.) and JAGADEES (S. S.), 1977. — Propagation of *Casuarina equisetifolia* Fors. by planting shoots. *Indian Forester*, 103, 734-8.