LES CASUARINAS à NODULES AÉRIENS

par Yves PRIN (1), Emile DUHOUX (2), Hyppolite KODJA (2), Yvon DOMMERGUES (2), Christine LE ROUX (1) et Yves ROEDERER (1)

(1) C.T.F.T. - (2) B.S.F.T. (C.T.F.T.-ORSTOM)

RÉSUMÉ

LES CASUARINAS À NODULES AÉRIENS

À la suite de la découverte de nodules aériens, formés au sein de protubérances nodulaires sur les troncs de Casuarina cunninghamiana, *au nord de l'île de la Réunion, on a entrepris une étude expérimentale en vue de reproduire la formation de cette structure remarquable sur des plants de* Casuarina cunninghamiana *de 1 an cultivés en serre ou de 4 mois cultivés* in vitro. *Des racines adventives se sont formées sur les tiges de toutes les plantes chaque fois que ces tiges ont été maintenues humides. Moins d'un mois après leur inoculation avec des nodules broyés provenant du champ ou avec une culture pure de* Frankia *ORS 021001, des nodules aériens sont apparus sur les racines adventives. Les résultats expérimentaux obtenus confirment que la nodulation aérienne apparaît seulement si les trois facteurs suivants sont réunis : pluies abondantes et humidité atmosphérique élevée, aptitude des arbres à émettre des racines adventives et former un rhytidome, qui constitue une niche permettant la formation des protubérances nodulaires, et omniprésence de* Frankia. *Seules de nouvelles recherches permettront de mettre au point la nodulation artificielle chez* Casuarina.

MOTS-CLÉS : NODOSITÉ ; SYMBIOSE ; *CASUARINA CUNNINGHAMIANA ;* FRANKIA ; RÉUNION ; ILE.

ABSTRACT

AERIAL NODULATION IN CASUARINAS

Following the discovery of aerial nodules, harboured in nodular protuberances, on the trunks of Casuarina cunninghamiana *in the North of Reunion island, an experimental study was initiated to mimic the formation of this unique structure on* Casuarina cunninghamiana *plants grown in a glasshouse (1-year-old plants) and* in vitro *(4-month-old plants). Adventitious roots were formed on the stems of all plants provided that the stems were kept moist. Within 1 month after inoculation with crushed nodules from the field or with a pure culture of* Frankia *strain ORS 021001, aerial nodules appeared on the adventitious roots. The experimental results confirm that the conjunction of the following factors is of paramount importance in inducing aerial nodulation : abundant rain and high air humidity, the ability of the trees to emit adventitious roots and produce a rhytidome, which is a niche allowing the establishment of the protuberances harbouring the nodules, and omnipresence of* Frankia. *Further investigations are required to develop artificial aerial nodulation on* Casuarina.

KEY-WORDS : NODULATION ; SYMBIOSIS ; *CASUARINA CUNNINGHAMIANA ;* FRANKIA ; REUNION ; ISLAND.

RESUMEN

LAS CASUARINAS DE NÓDULOS AÉREOS

A raíz del descubrimiento de nódulos aéreos, formados en protuberancias nodulares en los troncos de Casuarina cunninghamiana, *al norte de la isla de la Reunión, se emprendió un estudio experimental para reproducir la formación de esta estructura extraordinaria en plantones de* Casuarina cunninghamiana *de 1 año cultivados* in vitro. *En las ramas de totas las plantas se formaron raíces adventicias mientras se mantuvieron húmedas. Menos de un mes después de su inoculación con nódulos triturados procedentes del campo o con un cultivo puro de Frankia ORS 021001, aparecieron nódulos aéreos en las raíces adventicias. Los resultados experimentales obtenidos confirman que la nodulación aérea aparece únicamente si se reúnen los tres factores siguientes : lluvias abundantes y humedad atmosférica elevada, aptitud de los árboles a formar raíces adventicias y a ritidoma, que constituye un nicho que permite la formación de protuberancias nodulares, y la omnipresencia de Frankia. Sólo las nuevas investigaciones permitirán elaborar un método de nodulación artificial de la Casuarina.*

PALABRAS CLAVE : NODULACIÓN ; SIMBIOSIS ; *CASUARINA CUNNINGHAMIANA ;* FRANKIA ; REUNION ; ISLA.

Au cours d'une visite à la Réunion, au mois de décembre 1989, Y. DOMMERGUES a pu observer la présence de nodules aériens sur les troncs de quelques *Casuarina cunninghamiana* dans la plantation dite des « Hauts de Moka » (photo p. 64) située au nord de l'île, à 5 km à vol d'oiseau au sud de l'aéroport de Saint-Denis-Gillot. Cette observation fut rapportée au « II^e^ Atelier International sur Casuarina » qui s'est tenu au Caire au mois de janvier 1990.

Aucun des spécialistes des Casuarinacées participant à cette conférence (18 pays étaient représentés) n'avait eu auparavant connaissance de l'existence de tels nodules (photo ci-contre). Il s'agissait donc bien d'une découverte originale. C'est pourquoi il fut décidé de monter une mission pour approfondir sur place l'étude de ce type de nodulation aérienne encore mystérieux. La mission composée de trois chercheurs (Y. PRIN, Y. ROEDERER et Y. DOMMERGUES) s'est rendue à la Réunion au mois de juin 1990. L'objectif de cet article est de synthétiser les résultats de l'étude de terrain réalisée au cours de cette mission et des recherches préliminaires conduites ultérieurement au laboratoire commun ORSTOM/CIRAD C.T.F.T. de Nogent-sur-Marne.



Nodules de *Casuarina cunninghamiana*. Station La Ressource à la Réunion.

ÉTUDE SUR LE TERRAIN

A la suite de l'exploration d'une trentaine de stations de *Casuarina cunninghamiana* distribuées sur toute la surface de l'Ile à une altitude supérieure à 400 m, il est apparu que les peuplements comportant des arbres porteurs de nodules aériens étaient localisés exclusivement dans le secteur nord-nord-est de l'île, et généralement à une distance de la mer inférieure à 10 km. Dans ce secteur, le climat est caractérisé par une humidité atmosphérique élevée (les seuls mois secs étant août et septembre) et un régime pluvial irrégulier, de type cyclonique, pouvant atteindre jusqu'à 3 000 mm par an. Les pluies même modestes provoquent sur le tronc de ces arbres un ruissellement (stem flow) abondant qui contribue au maintien de l'humidité du rhytidome.

Un deuxième fait à souligner est que, même dans les stations situées dans le secteur favorable que l'on vient de définir, seulement 1 à 10 % des arbres portent des nodules aériens. Le nombre et la distribution des nodules sur les arbres sont très irréguliers. Dans les cas où la nodulation est abondante, les nodules se développent sur les troncs jusqu'à une hauteur supérieure à plus de 6-7 m. Ces nodules peuvent occuper jusqu'à 20 % de la base du tronc (photo p. 64). Les arbres jeunes (moins de 10-20 ans), donc dépourvus de rhytidome, ne portent pas de nodules.

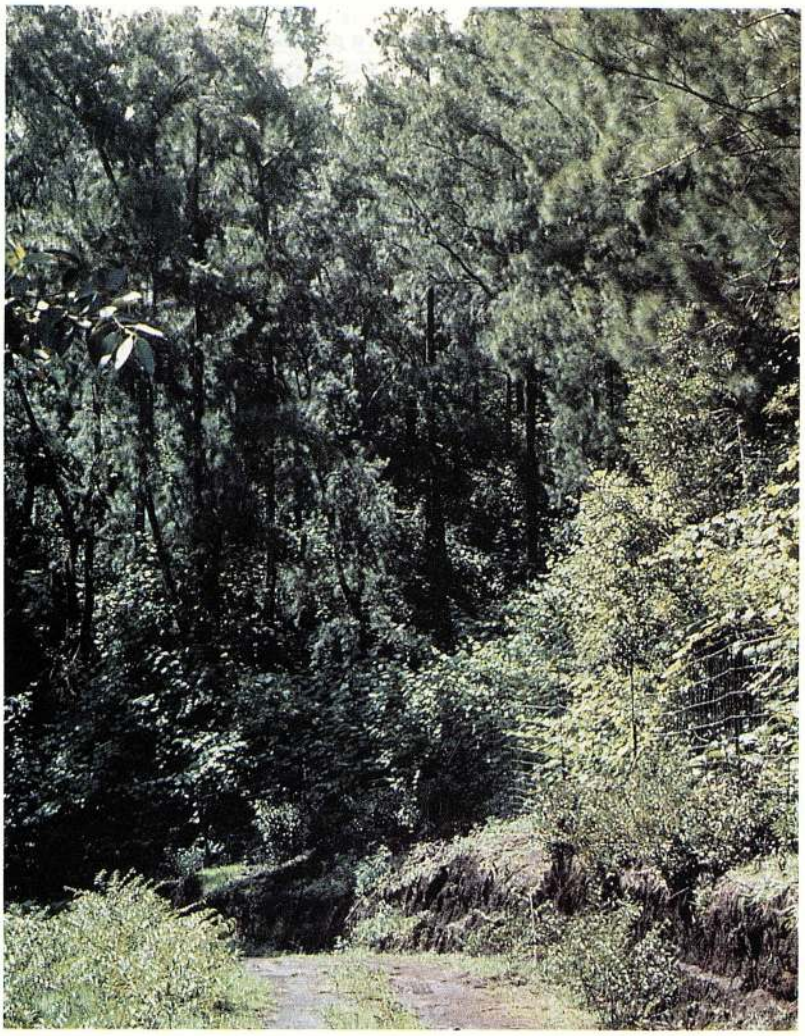
Il est à noter que dans une des stations étudiées (Hauts de Moka) on a observé quelques nodules sur un *Casuarina glauca* en bordure d'un peuplement de *Casuarina cunninghamiana*.

Les nodules aériens se présentent comme des protubérances du rhytidome ; ils ont en général de 10 à 30 cm de diamètre et de 4 à 8 cm d'épaisseur (photo ci-contre). Le terme de nodule aérien doit ici s'entendre au sens large et, pour des raisons que nous exposerons plus loin, il serait préférable d'utiliser le terme de protubérances nodulaires. Ces protubérances adhèrent fortement au tronc mais peuvent, cependant, en être détachées contrairement aux protubérances ligneuses avec lesquelles il ne faut pas les confondre. Ces dernières protubérances sont en fait des excroissances des tissus ligneux du tronc ; elles se forment aussi bien sur les *Casuarina* que sur d'autres espèces d'arbres telles les *Cryptomeria*.

Les protubérances nodulaires sont constituées de tissus morts provenant du rhytidome dans lequel se sont développées des racines adventives issues du tronc. Ces racines portent elles-mêmes les nodules fixateurs d'azote *sensu stricto* (photo p. 65).



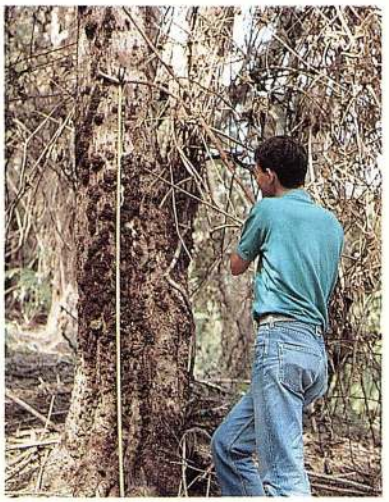
Cellule de nodule aérien infectée par *Frankia*.



***Casuarina cunninghamiana* et sous-bois graminéen pris à Moka de Palmas (la Réunion).**

Ces derniers nodules sont de petite taille (moins d'un cm) et présentent la morphologie coralloïde caractéristique des nodules actinorhiziens, les lobes de ces nodules étant pourvus à leur apex de racines nodulaires comme les lobes de nodules souterrains de Casuarinacées. Pendant la saison des fortes pluies (décembre à février), les lobes des nodules sont jaunes, apparemment en bonne santé alors que, pendant la saison moins pluvieuse et plus froide (juin), une partie des nodules est desséchée ou en cours de décomposition, contribuant ainsi à l'accumulation de matière organique morte à l'intérieur même de la protubérance. On suppose que de nouveaux nodules se forment lors du retour des pluies abondantes. En d'autres termes, au cours de l'année, il y aurait un renouvellement (turn-over) des nodules *sensu stricto* au sein de chaque protubérance nodulaire. Dans les rapports précédents (DOMMERGUES *et al.*, 1990 ; PRIN *et al.*, 1991) nous avions désigné les protubérances entières sous le terme de nodules aériens. Compte tenu du fait que les nodules fixateurs d'azote proprement dits sont inclus dans les protubérances dont ils ne constituent qu'un élément, il serait plus exact de désigner les protubérances elles-mêmes sous le terme de protubérances nodulaires. Cependant, dans un but de simplification, nous continuerons à désigner ces protubérances sous le nom de nodules aériens.

Pour répondre à la question de savoir si les nodules aériens fixent l'azote, on a effectué sur place des



Nodules de *Casuarina cunninghamiana*.

prélèvements et mesuré l'activité réductrice d'acétylène de ces échantillons. Cette méthode indirecte de détection de l'activité fixatrice d'azote, qui a le mérite d'être utilisable sur le terrain, nous a permis de confirmer que dans toutes les stations étudiées les nodules des protubérances aériennes fixaient l'azote. En revanche, aucune activité fixatrice d'azote ne s'est manifestée dans les échantillons de rhytidome en dehors des protubérances. Comparée à l'activité fixatrice d'azote des nodules souterrains (que l'on trouve normalement chez tous les Casuarinacées), l'activité des nodules aériens est sensiblement plus faible, probablement parce qu'à l'époque où les mesures ont été effectuées (juin) les nodules étaient sénescents, la température ambiante et l'hygrométrie relativement faibles ; en outre, il était difficile de séparer les nodules fixateurs d'azote *sensu stricto* des tissus morts de la protubérance nodulaire.

ÉTUDES AU LABORATOIRE

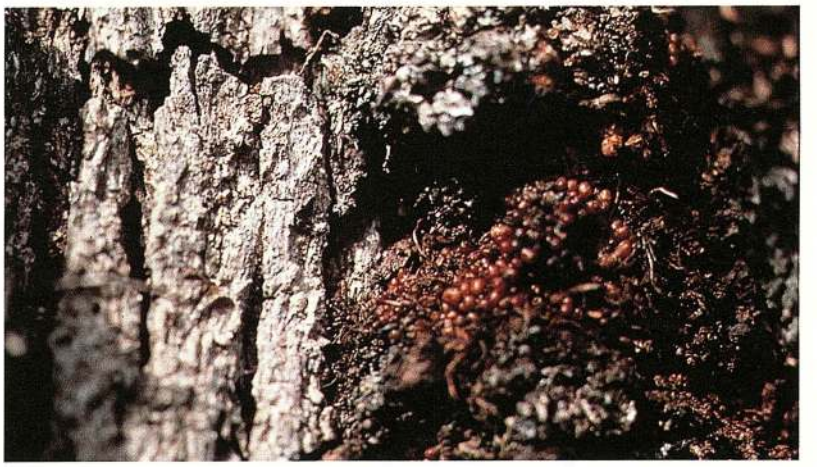
Les examens histologiques des coupes de nodules *sensu stricto* ont montré la présence de nombreuses cellules infectées dans le parenchyme (photos pp. 63 et 65). Le micro-organisme fixateur d'azote responsable de l'infection est très probablement un *Frankia* comme c'est la règle chez

toutes les plantes actinorhiziennes (dont les Casuarinacées font partie). Mais c'est seulement lorsque l'on aura isolé et cultivé *in vitro* cet endophyte que l'on pourra affirmer qu'il s'agit bien d'un *Frankia*.

On a pu induire, en moins de 2 mois, l'émission de racines adventives aériennes par immersion des tiges de jeunes semis de *Casuarina cunninghamiana* âgés de 4 mois et cultivés *in vitro*, le pourcentage de succès étant de l'ordre de 25 %. Les racines adventives ainsi obtenues sont caractérisées par un géotropisme positif, une croissance rapide, des poils absorbants de petite taille (visibles seulement à la loupe).

On a également obtenu l'émission de racines adventives sur les tiges de *Casuarina cunninghamiana* âgés de plus d'un an, cultivés en serre, en maintenant les tiges humides à l'aide d'une mèche dont la partie inférieure était immergée dans l'eau.

Quel que soit le système d'induction des racines adventives aériennes, il a toujours été possible d'obtenir des nodules sur ces racines, soit que l'inoculation ait été réalisée par infection de ces racines avec des broyats de nodules aériens en provenance de la Réunion, soit qu'on ait utilisé la culture pure de la souche de *Frankia* ORS021001, isolée de nodules racinaires de *Casuarina junghuhniana*.



On a gratté le rhytidome du nodule pour voir les lobes.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les nodules aériens de *Casuarina cunninghamiana* rappellent les nodules aériens des Légumineuses décrits notamment dans le cas de *Sesbania rostrata* ou *Aeschynomene afraspera* (DREYFUS et DOMMERGUES, 1981 ; TSIEN *et al.*, 1983 ; DREYFUS *et al.*, 1984 ; DUHOUX, 1984). Mais ils en diffèrent par les caractères suivants : le micro-organisme symbiotique fixateur de N_2 impliqué n'est pas un rhizobium mais un actinomycète, très probablement un *Frankia ;* le site d'infection est une racine adventive parfaitement développée, alors que chez les Légumineuses ce site est constitué par un primordium de racine adventive qui reste à l'état latent ; la morphologie du nodule *sensu stricto* est typiquement de type actinorhizien et non du type rhizobien ; les nodules *sensu stricto* sont inclus avec les racines adventives dans la masse de tissus sénescents ou morts remplissant une partie de la protubérance nodulaire, alors que les nodules de Légumineuses sont isolés et à l'air libre ; les nodules fixateurs d'azote proprement dits subissent un turn-over à l'intérieur de la protubérance qui les abrite, alors que les nodules aériens de Légumineuses disparaissent de la tige après quelques semaines de fonctionnement.

La conjonction des facteurs suivants semble nécessaire pour induire la nodulation aérienne :

- Pluies abondantes réparties sur une assez longue saison des pluies ; humidité atmosphérique élevée tout au long de l'année.

- Aptitude des arbres à émettre facilement des racines adventives et à former un rhytidome qui constitue une niche favorable à la formation des protubérances, le pourcentage des plantes ayant ces propriétés particulières étant faible (1 à 10 %).

- Omniprésence de *Frankia* dans les écosystèmes, la nodulation observée jusqu'à une hauteur de 6-7 m ne s'expliquant que par l'abondance de *Frankia* dans les différentes strates de la végétation jusqu'à cette hauteur



Lobe de nodule aérien pris au microscope électronique à balayage.

grâce à une active dissémination par les pluies, le vent ou des vecteurs animaux. L'omniprésence de *Frankia* dans tous les sols de la Réunion, y compris les sols des coulées de lave récentes (par exemple Grand Brûlé), est surprenante, étant donné que les *Frankia* sont des micro-organismes à croissance lente et non mobiles, qui n'ont pas tendance à coloniser rapidement les différents compartiments des écosystèmes.

Pourquoi l'existence des nodules aériens de *Casuarina* n'a-t-elle pas été signalée avant nos prospections à la Réunion ? Une première raison en est que ces structures se confondent avec l'écorce des arbres. La seconde résulte probablement du fait que la nodulation aérienne ne s'exprime pas souvent car elle dépend de la conjonction rarement réalisée des trois groupes de facteurs définis ci-dessus.

Quel peut être l'intérêt de la nodulation aérienne fixatrice d'azote pour les arbres ? De même que la nodulation aérienne chez les Légumineuses (DREYFUS *et al.*, 1984 ; BECKER *et al.*, 1986), la nodulation aérienne chez *Casuarina cunninghamiana* et *C. glauca* confère probablement à la plante-hôte un potentiel fixateur d'azote élevé et surtout son indépendance vis-à-vis des contraintes du sol, notamment acidité et excès d'azote combiné. Il est donc prévisible que les arbres à nodules aériens continuent à fixer l'azote une grande partie de leur vie, contribuant à enrichir le sol pendant de longues années, alors que les arbres pourvus exclusivement de nodules souterrains fixent l'azote seulement pendant les premières années suivant la plantation, cette activité cessant dès que la teneur en azote du sol atteint un certain seuil.

Sera-t-il possible à l'avenir de maîtriser la nodulation aérienne chez les plantes actinorhiziennes, notamment les Casuarinacées ? On peut répondre affirmativement à cette question. En effet, les expériences préliminaires conduites au laboratoire montrent qu'il est possible d'induire la formation de nodules aériens non seulement sur *Casuarina cunninghamiana* mais aussi sur *Casuarina equisetifolia* en utilisant une souche de *Frankia,* pourvu qu'elle soit *Casuarina*-compatible (ORS 021001).

Il est évident que de telles recherches devront être approfondies pour en transférer les résultats en forêt. Il sera en particulier nécessaire :

- de sélectionner et micropropager les clones possédant (spontanément ou par suite de manipulations génétiques) la propriété d'émettre facilement des racines adventives même dans des milieux à hygrométrie relativement faible,
- de disposer d'une méthode fiable d'inoculation des troncs avec des souches de *Frankia* hautement performantes sélectionnées dans ce but. ■

REMERCIEMENTS

Cette étude a pu être menée à bien grâce à une aide financière accordée par l'ORSTOM et le CIRAD (C.T.F.T.) et aux moyens mis localement à notre disposition par l'Office National des Forêts. Nous tenons, en outre, à remercier tout particulièrement M. B. DE PALMAS dont la plantation des Hauts de Moka a été le lieu de la découverte initiale, ainsi que MM. Michel BORDÈRES et Olivier SOULÈRES qui ont grandement facilité notre tâche, sans oublier nos collègues du CIRAD de la Réunion qui nous ont accueillis dans leurs laboratoires.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BECKER (M.), ALAZARD (D.) et OTTOW (J. C. G.), 1986. — Mineral nitrogen effect on nodulation and nitrogen fixation of the stem-nodulated legume *Aeschynomene afraspera*. Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd. 149, 485-491.

DOMMERGUES (Y.), DIEM (H. G.) et SOUGOUFARA (B.), 1990. — Nitrogen fixation in *Casuarinaceae :* quantification and improvement. *In* Advances in *Casuarina* research and Utilization. Second International Casuarina Workshop (M. H. Lakany, J. W. Turnbull & J. L. Brewbaker eds.), pp. 110-121. Desert Development Center, American University in Cairo, Egypt.

DREYFUS (B.) et DOMMERGUES (Y.), 1981. — Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. FEMS Microbiol. Lett. 10, 313-317.

DREYFUS (B. L.), ALAZARD (D.) et DOMMERGUES (Y. R.), 1984. — Stem-nodulating *rhizobia*. *In* Current Perspectives in Microbial Ecology (M. J. Klug, C. A. Reddy eds.), pp. 161-169. American Society for microbiology, Washington, D.C.

DREYFUS (B.) et DOMMERGUES (Y.), 1984. — Non-inhibition de la fixation d'azote par l'azote combiné chez une légumineuse à nodules caulinaires, *Sesbania rostrata*. C. R. Acad. Sci. Paris, 291 D, 767-770.

DUHOUX (E.), 1984. — Ontogenèse des nodules caulinaires du *Sesbania rostrata* (légumineuse). Can. J. Bot. 62, 982-994.

PRIN (Y.), DUHOUX (E.), DIEM (H. G.) et DOMMERGUES (Y.), 1991. — Aerial nodules *in Casuarina cunninghamiana*. Appl. Environ. Microbiol. 57, 871-874.

TSIEN (H. C.), DREYFUS (B. L.) et SCHMIDT (E. L.), 1983. — Initial stages in the morphogenesis of nitrogen-fixing stem nodules of *Sesbania rostrata*. J. Bacteriol. 156, 888-897.