

Le robinier, *Robinia pseudoacacia* L., une espèce fixatrice d'azote intéressante ?

A. MOIROUD et A. CAPELLANO

Département de Biologie végétale, Université Claude Bernard, Lyon I
43, boulevard du 11-novembre-1918, F 69622 Villeurbanne Cedex

Résumé

Le robinier, *Robinia pseudoacacia*, arbre répandu dans une grande partie de la France, est souvent utilisé pour valoriser les sols pauvres ou consolider les terrains meubles.

Il est capable de fixer l'azote atmosphérique grâce à des nodules racinaires dont le symbiote est un *Rhizobium* à croissance rapide, comme le prouvent l'étude des caractères biochimiques de la bactérie en culture pure et l'ultrastructure de la forme bactéroïde dans les nodules. A l'intérieur du nodule, l'envahissement des cellules méristématiques s'effectue grâce à des cordons d'infection dont certains persistent au cours de la mauvaise saison.

L'activité réductrice d'acétylène débute au moment du débourrement des bourgeons puis augmente progressivement pour être maximum au cours de la belle saison.

1. Généralités

Le robinier, *Robinia pseudoacacia* L. fut un des premiers arbres du continent américain à être introduit en Europe. En effet des graines de cet arbre, originaire de la partie méridionale des Monts Alleghanys, furent plantées par Robin, herboriste du roi Henri IV, en 1601 place Dauphine à Paris.

Après une période de stagnation, cet arbre s'est répandu dans toute l'Europe à partir du XVIII^e siècle. Espèce de grande souplesse écologique, le robinier s'est acclimaté dans pratiquement toute la France, à condition toutefois que l'altitude ne soit pas trop élevée car c'est avant tout une espèce des plaines et des collines.

Bien que la présence sur ses racines de nodules hébergeant une bactérie du genre *Rhizobium* soit connue depuis longtemps, la capacité fixatrice de cette espèce n'a pratiquement jamais été évaluée (CARPENTER & HENSLEY, 1979 ; TJEPKEMA & WINSHIP, 1980 ; MOIROUD & CAPELLANO, 1981). De même, les données précises sur la structure des nodules et les principales caractéristiques de l'endophyte bactérien sont très limitées (GOURRET, 1975 ; MOIROUD & CAPELLANO, 1981).

Aussi il nous a paru utile d'entreprendre une telle étude, d'autant plus que le robinier, qui a connu dans le passé un succès certain, semble actuellement délaissé au profit des espèces ligneuses à actinorhizes.

2. Répartition et écologie

Espèce très largement répandue en France, du Nord au Sud et de l'Est à l'Ouest, le robinier ne constitue pas pour autant une essence forestière. Il ne forme jamais de véritable forêt et rarement même des peuplements de superficie appréciable. C'est un colonisateur puissant qui s'accommode des sols les plus pauvres, comme les sables siliceux par exemple, ou les sols calcaires. Il convient bien aussi pour la consolidation des terrains meubles car il possède un système racinaire superficiel et traçant très développé. Bien que pouvant atteindre des dimensions et un âge respectables, le robinier n'est que rarement un bel arbre. Il est en effet le plus souvent exploité en taillis de courte révolution car sa croissance est rapide. Après la coupe il rejette puissamment de souche et drageonne abondamment. Cette exubérance de la végétation en fait une espèce envahissante et un concurrent très dangereux pour les autres espèces ligneuses avoisinantes. En outre, la persistance à la base des pétioles d'une paire d'épines robustes et très vulnérantes rend la manipulation de son bois dangereuse et le déprécie quelque peu.

Arbre dépourvu de feuilles une grande partie de l'année (il ne débourre que très tardivement, ce qui le protège des gelées tardives) le robinier ne donne que peu d'ombre et ne permet pas la constitution d'une couche humifère importante à la surface du sol.



PHOTO 1

Partie du système racinaire d'un jeune plant de Robinier.

Root system of young plant.



PHOTO 2

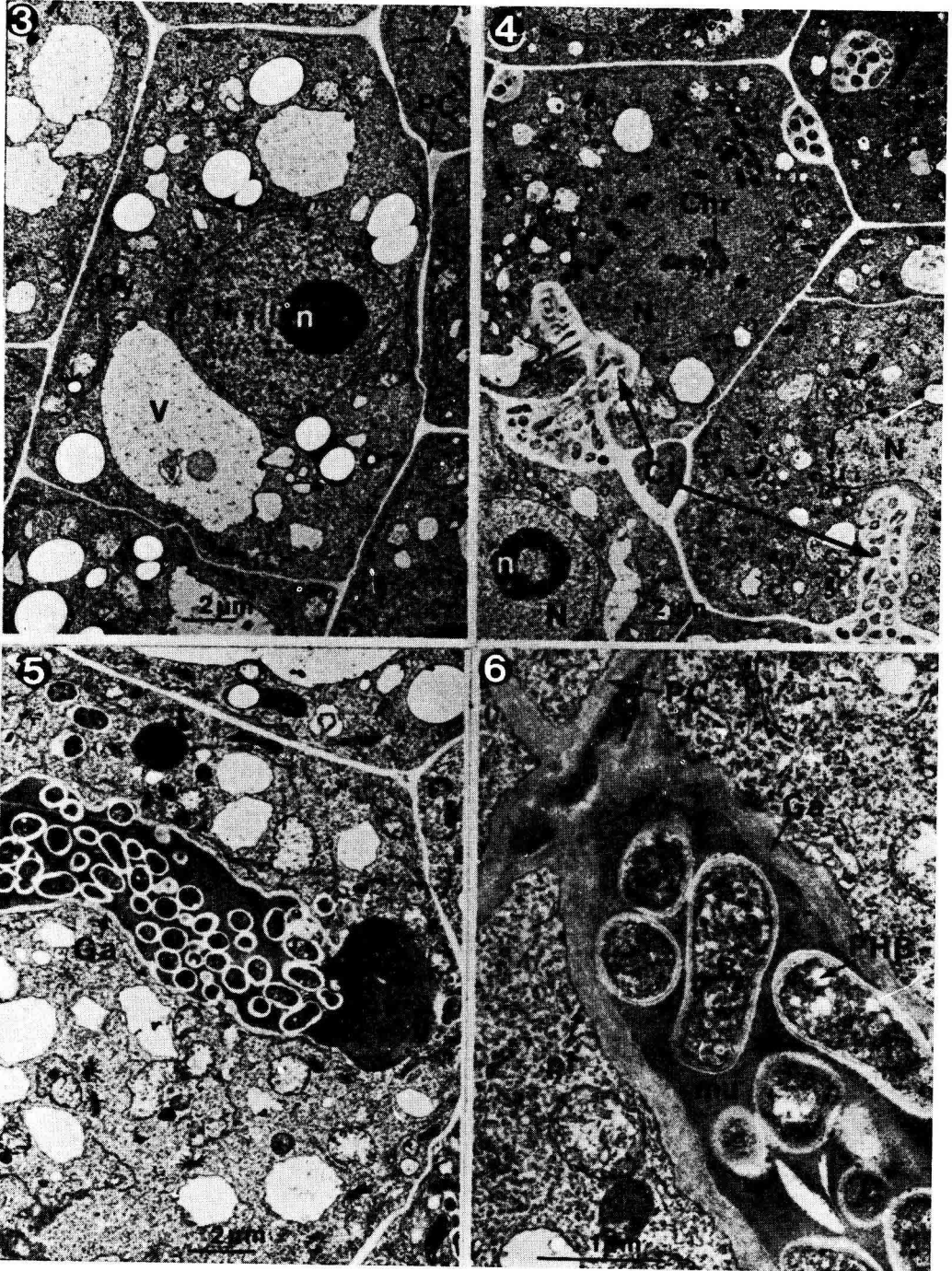
*Nodules de robinier récoltés dans la nature.
Noter la variabilité de la taille et de la forme de ces nodules.
Black locust nodules. Note variability in size and form.*

3. Nodulation et nodules

Dans la nature, les systèmes racinaires du robinier portent des nodules tout au long de l'année. Ils sont de forme et de taille très variées, dépassant souvent 15 mm de long (photo 1). Ils présentent fréquemment diverses ramifications et constrictions, simulant une croissance saisonnière (photo 2). En fait, l'obtention au laboratoire de jeunes plants nodulés nous a montré qu'il n'existait aucune corrélation entre la forme, la taille des nodules et leur âge.

4. Caractéristiques essentielles du *Rhizobium* infectieux

L'endophyte des nodules de robinier, qui est une bactérie appartenant au genre *Rhizobium*, se présente en culture pure sous la forme de bâtonnets droits, isolés ou par deux, de 1 μm de large pour 2 à 2,5 μm de long, mobiles à l'état jeune, gram négatif. Sur milieu nutritif liquide convenable, le temps de génération est de 4 h à 30 °C, de 6 h à 20 °C et de 75 h à 4 °C. Les souches isolées acidifient de nombreux sucres (MOIROUD *et al.*, 1981). Le *Rhizobium* infectif du robinier semble spécifique et apparaît comme un hôte habituel du sol, même en l'absence du symbiote végétal.



PHOTOS 3 à 6
 Nodules efficients - Efficient nodules.

5. Ultrastructure des nodules efficients

A l'intérieur du nodule en voie de développement, l'envahissement des cellules méristématiques (photos 3 et 4) par les bactéries s'effectue par l'intermédiaire de cordons d'infection, analogues à ceux décrits chez d'autres légumineuses (GOURRET, 1975), qui occupent une zone située juste en arrière de l'apex racinaire. Ces cordons d'infection qui naissent comme des invaginations de la paroi cellulaire de l'hôte (photo 4) présentent une gaine cellulosique, issue de la paroi de la cellule envahie, mais restent isolés du cytoplasme par le plasmalemme (photo 6). Les cordons renferment, noyées dans une matière dense aux électrons, de nombreuses bactéries à paroi typiquement gram négatif et présentant des inclusions de poly- β -hydroxybutyrate (photo 6). La libération des bactéries a lieu à l'extrémité des cordons qui bourgeonnent des ampoules (photo 5); ces dernières ne présentent plus de gaine cellulosique et les bactéries entrent dans le cytoplasme en repoussant devant elles la membrane cytoplasmique (photo 7) qui finit par englober entièrement les symbiotes dans une vacuole qui peut être considérée comme une vacuole d'endocytose (DIXON,

PHOTO 3 - Cellule méristématique non infectée de la zone sous-apicale.

Non-infected meristematic cell.

PHOTO 4 - Cellules méristématiques (noyau en division) envahies par les cordons d'infection.

Infection threads in meristematic cells.

PHOTO 5 - Cordon d'infection, entouré de sa gaine cellulosique, bourgeonnant une ampoule remplie de mucilage.

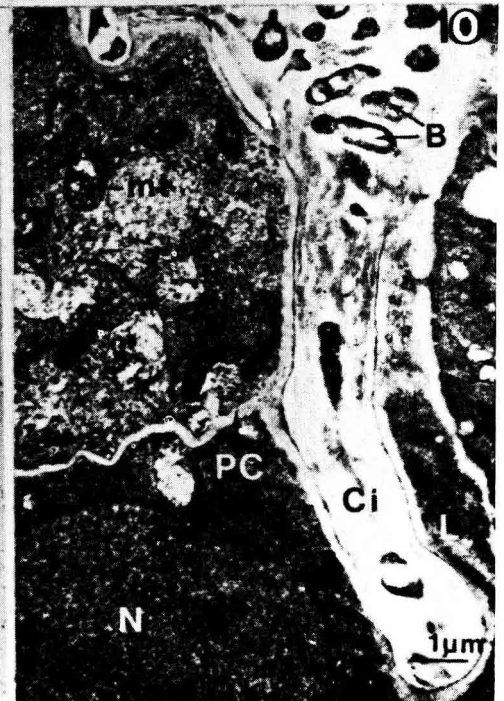
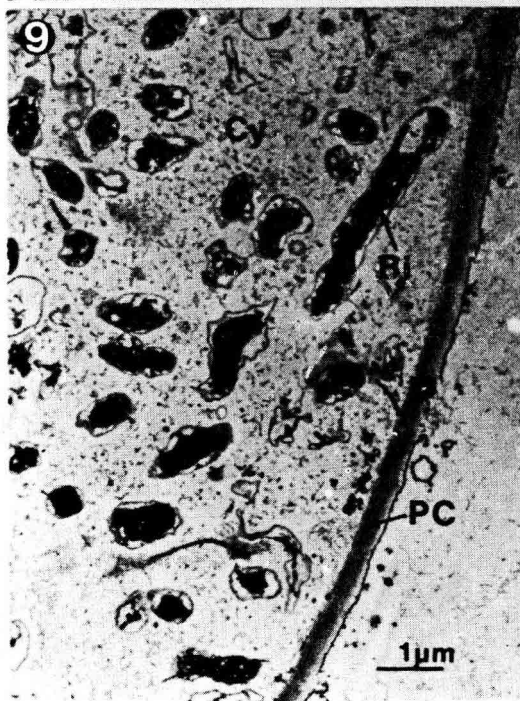
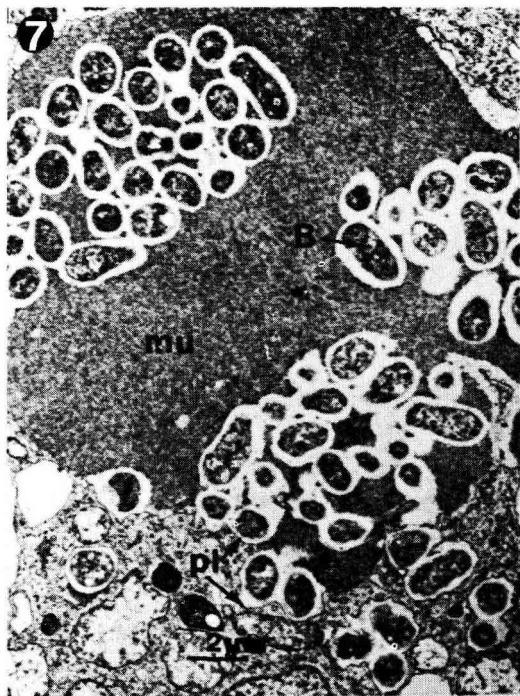
Bulge of infection thread filled with zooglaeal matrix.

PHOTO 6 - Cordon d'infection plus grossi montrant la gaine cellulosique en relation avec la paroi cellulaire de l'hôte et le plasmalemme isolant le cordon du cytoplasme de la cellule infectée.

Infection thread with sheath in relation to host cell wall.

ABRÉVIATIONS UTILISÉES :

B	Bactérie. <i>Bacteria.</i>	mu	Mucilage. <i>Zooglaeal matrix.</i>
Bi	Bactéroïde. <i>Bacteroids.</i>	N	Noyau <i>Nucleus.</i>
Chr	Chromosome. <i>Chromosome.</i>	n	Nucléole. <i>Nucleolus.</i>
Ci	Cordon d'infection. <i>Infection thread.</i>	PC	Paroi cellulaire. <i>Cell wall.</i>
Cy	Cytoplasme. <i>Cytoplasm.</i>	PHB	Polyhydroxybutyrate. <i>Polyhydroxybutyrate.</i>
Ga	Gaine du cordon d'infection. <i>Infection thread sheath.</i>	pl	Plasmalemme. <i>Plasmalemma.</i>
mt	Mitochondrie. <i>Mitochondrion.</i>	V	Vacuole. <i>Vacuole.</i>



PHOTOS 7 et 8

Nodules efficients - Efficient nodules.

PHOTOS 9 et 10

Nodules inefficients récoltés en hiver - Inefficient nodules collected in winter.

1964). Celle-ci contient soit un seul soit, après divisions, plusieurs cellules microbiennes (photo 8). La transformation de la bactérie en bactéroïde ne s'accompagne d'aucune modification majeure de la structure ; seule la taille augmente et, à maturité, le bactéroïde se présente sous la forme d'un bâtonnet de grande taille, à nucléoïde clair et dispersé (photo 8).

6. Activité réductrice

Elle a été mesurée par la méthode classique de réduction de l'acétylène sur des nodules excisés.

6.1. Variations saisonnières de l'activité réductrice

Pendant la période hivernale et jusque vers la mi-avril, l'activité réductrice des nodules demeure nulle (fig. 1). Du reste, au cours de cette période, l'examen de la zone à bactéroïdes, uniformément colorée en vert par les composés issus de la dégradation de la leghémoglobine, montre que les bactéroïdes et les principaux constituants de la cellule-hôte sont désorganisés et lysés (photo 9). L'activité réductrice ne reprend qu'assez tard au printemps, lors du débourrement. Comme chez d'autres espèces ligneuses symbiotiques, elle débute avant le développement de l'appareil photosynthétique (PIZELLE, 1975 ; MOIROUD & CAPELLANO, 1979). Le fonctionnement de la nitrogénase nécessitant de grandes quantités d'énergie, cette reprise de l'activité fixatrice ne peut se faire qu'aux dépens des réserves carbonées stockées dans la plante. Cette mobilisation des réserves au printemps provoque un afflux de sucres solubles dans les nodules, avec une teneur maximum peu avant la reprise nette de l'activité réductrice (fig. 1). Après cette période critique du débourrement, le développement des jeunes feuilles permet la reprise d'une activité photosynthétique suffisante pour que les produits carbonés synthétisés prennent le relai, assurant ainsi une activité réductrice plus importante. Cette reprise de la fixation nécessite également la reconstitution d'un nouveau tissu efficient. L'élaboration de ce nouveau tissu est grandement facilitée par la persistance, à l'intérieur même du nodule, de cellules demeurées à l'état méristématique et de cellules renfermant des cordons d'infection remplis de *Rhizobium* (photo 10) ce qui constitue une réserve de

PHOTO 7 - Ampoule, bourgeonnée par un cordon d'infection, libérant les bactéries dans des vacuoles d'endocytose.

Rhizobia released from bulge in membrane-bound vacuole.

PHOTO 8 - Cellule adulte de l'hôte contenant de très nombreux bactéroïdes.

Mature host cell with numerous bacteroids.

PHOTO 9 - Cellule adulte de la zone inefficace (verdâtre). Noter la désorganisation complète de son cytoplasme ainsi que la lyse des bactéroïdes.

Mature host cell from inefficient zone.

PHOTO 10 - Région méristématique présentant des cordons d'infection renfermant des bactéries.

Meristematic zone with infection threads containing bacteria.

symbiotes bactériens. Lors de la reprise de l'activité métabolique, la libération de ces *Rhizobium* dans la cellule-hôte et la constitution d'un nouveau tissu efficient peuvent être ainsi très rapides.

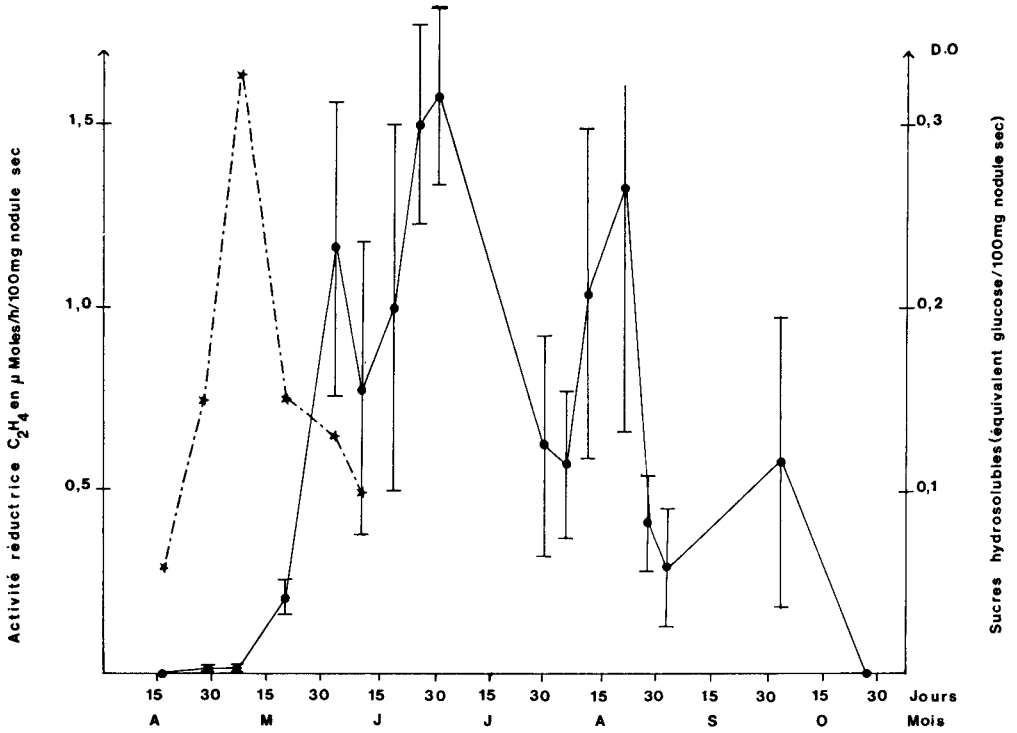


FIG. 1

Variations saisonnières de l'activité réductrice in situ et de la teneur en sucres hydrosolubles des nodules de Robinia pseudoacacia L. (chaque valeur correspond à la moyenne de 10 mesures ; les traits correspondent aux écarts à la moyenne).

Seasonal variations in nitrogen fixing activity in situ (—) and in soluble carbohydrates content (-----) of black locust nodules.

Courbe en trait plein : activité réductrice.

Courbe en trait interrompu : teneurs en sucres hydrosolubles.

C'est au cours de la période estivale que l'activité réductrice est la plus forte. C'est aussi au cours de cette période qu'elle présente ses plus grandes variations. Celles-ci semblent, au moins en partie, sous la dépendance des facteurs de l'environnement. On observe ainsi que les valeurs très basses d'activité fixatrice au début du mois d'août coïncident avec les plus faibles teneurs en eau du sol (tableau 1).

Toutefois ces relations activité réductrice - facteurs du milieu ne sont pas simples et un facteur défavorable, comme par exemple le facteur hydrique, peut entraîner des perturbations durables dans le fonctionnement de la symbiose qui ne s'atténueront que très progressivement après retour aux conditions optimales.

TABLEAU 1

*Variations de la teneur en eau du sol sous un bois de robiniers
au cours de l'été et de l'automne 1980.*

*Variation in water content of soil under black locust forest
in summer and autumn 1980.*

Dates des prélèvements	Teneurs en eau (% de terre humide)
5 août	7,4
11 août	17
21 août	11,8
28 août	22,4
2 septembre	19,6
3 octobre	16

L'activité réductrice est devenue nulle vers la fin du mois d'octobre. Ainsi, sur l'ensemble de l'année, la période effective de fixation peut être estimée à environ 180 jours.

6.2. *Activité réductrice spécifique*

Les valeurs d'activité réductrice les plus élevées que nous avons mesurées sont de l'ordre de 15 à 16 μ Moles de $C_2H_4/h/g$ de nodule sec. Elles ne représentent pas le maximum d'activité possible car les mesures ont toujours été effectuées tôt le matin (entre 8 h et 8 h 30), bien avant le maximum d'activité photosynthétique. De plus les valeurs obtenues se rapportent à des nodules considérés dans leur totalité. Or, pour les plus gros en particulier, le tissu efficace ne représente que le tiers ou, au plus, la moitié du poids total de nodule. L'activité fixatrice, exprimée par rapport au poids de tissu efficace, serait ainsi environ trois fois supérieure à celle calculée avec les nodules pris dans leur intégralité. Le robinier apparaît donc comme une espèce fixatrice intéressante. Son activité nitrogénasique, exprimée en μ /Moles de $C_2H_4/h/g$ nodule sec, est en effet supérieure à celle mesurée chez d'autres espèces du genre, comme *Robinia hispida* ou *R. fertilis* (MC NIEL & CARPENTER, 1974) ainsi que chez d'autres plantes ligneuses fixatrices comme *Alnus glutinosa* (Pizelle, 1975), *A. incana* (JOHNSRUD, 1978), *A. viridis* (MOIROUD & CAPELLANO, 1979). Elle est comparable à celle citée pour divers *Acacia* (NAKOS, 1977 ; LANGKAMP *et al.*, 1979) ou certaines lignées de soja (HAM *et al.*, 1976). Par contre elle est inférieure à celle mesurée chez le trèfle (MASTERTON & MURPHY, 1976).

7. Conclusions

Les anciennes utilisations nobles du bois de robinier — bois de construction dans certains types d'habitat, de charronnage ou de menuiserie — ont pratiquement disparu de nos jours. Actuellement le robinier a surtout une utilisation locale pour le chauffage domestique, la fabrication de piquets ou d'échalas et la nourriture des abeilles.

Avec la crise actuelle de l'énergie et les espoirs fondés dans la production de biomasse et les utilisations nouvelles du bois, le robinier pourrait redevenir une espèce digne d'intérêt. Capable de noduler dans pratiquement tous les sols, il se montre partout un fixateur d'azote efficace, d'autant qu'il contracte également des relations symbiotiques avec des champignons endomycorhiziens (MOIROUD *et al.*, 1981) et peut-être même ectomycorhiziens (BARSALI, cité par TRAPPE, 1962). C'est ainsi un colonisateur puissant qui peut contribuer à la valorisation des sols pauvres. La sélection des souches de *Rhizobium* symbiotique les plus efficaces et les mieux adaptées aux conditions d'environnement permettrait peut-être d'accroître encore le potentiel fixateur de cette espèce. Le robinier pourrait peut-être lui-même faire l'objet d'un travail de sélection en vue d'améliorer sa production et sa capacité à fixer l'azote atmosphérique. Sur sols convenables, c'est une espèce à croissance rapide et dont l'écorce est riche en tannins.

Ainsi le robinier, *Robinia pseudoacacia*, apparaît-il comme une espèce particulièrement digne d'intérêt et qui mériterait d'être étudiée de plus près.

Reçu pour publication en décembre 1981.

Summary

Is the black-locust a nitrogen fixing species of economic importance ?

Black locust, *Robinia pseudoacacia*, is widely cultivated on poor soils or as pioneer plant on eroded soils.

This species fixes atmospheric nitrogen in root nodules infected by *Rhizobium*. This rhizobium strain belongs to « fast grower » type. Ultrastructural studies of nodules showed that infection of meristematic host cell occurred by infection threads.

Nitrogen fixing activity, assayed by acetylene reduction method, started when buds opened; maximum values were reached in summer.

Références bibliographiques

- CARPENTER P., HENSLEY D.L., 1979. Utilizing N₂-fixing woody plant species for distressed soils and the effect of lime on survival. *Bot. Gaz.*, **140**, 76-81.
- DIXON R.O.D., 1964. The origin of the membrane envelope surrounding the bacteria and bacteroids and the presence of glycogen in clover root nodules. *Arkiv für Mikrobiologie*, **56**, 156-166.

- EVANS H.J., EMERICH D.W., MAIER R.J., HANUS F.J., RUSSELL S.A., 1979. Hydrogen cycling within the nodules of legumes and non-legumes and its role in nitrogen fixation. In : *Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forest*. Editeurs Gordon J.C., Wheeler C.T. et Perry D.A., pp. 196-206.
- GOURRET J.P., 1975. *Une étude ultrastructurale comparative des mycoplasmes pathogènes, des bactéries des nodules racinaires et des plastes*. Thèse de Doctorat ès Sciences, Université de Rennes, 297 p.
- HAM G.E., LAWN R.J., BRUN W.A., 1976. Influence of inoculation, nitrogen fertilizers and photosynthetic source-sink manipulations on field grown soybeans. In : *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. I.B.P. n° 2. Editeur Nutman P.S., pp. 239-253.
- JOHNSRUD S.C., 1978. Nitrogen fixation by root nodules of *Alnus incana* in a Norwegian forest ecosystem. *Oikos*, **30**, 475-479.
- LANGKAMP P.J., SWINDEN L.B., DALLING M.J., 1979. Nitrogen fixation (acetylene reduction) by *Acacia holoserica* on areas restored after mining at Groote Eylandt, Northern Territory. *Aust. J. Bot.*, **87**, 353-361.
- MCNIEL R.E., CARPENTER P.L., 1974. Nitrogen fixation by woody plant species as measured by the acetylene reduction assay. *Hortscience*, **9**, 381-382.
- MASTERSON C.L., MURPHY P.M., 1976. Application of the acetylene reduction technique to the study of nitrogen fixation by white clover in the field. In : *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. I.B.P. n° 7. Editeur Nutman P.S., pp. 299-316.
- MOIROUD A., CAPELLANO A., 1979. Etude de la dynamique de l'azote à haute altitude. I - Fixation d'azote (réduction de C_2H_2) par *Alnus viridis*. *Can. J. Bot.*, **57**, 1979-1985.
- MOIROUD A., CAPELLANO A., 1981. Fixation d'azote chez les espèces ligneuses symbiotiques. II - Reprise de l'activité fixatrice chez *Robinia pseudoacacia* L. au printemps. *Bull. Soc. bot. Fr.*, sous presse.
- MOIROUD A., CAPELLANO A., BARTSCHI H., 1981. Fixation d'azote par les espèces ligneuses symbiotiques. I - Ultrastructure des nodules, mycorhizes à vésicules et à arbuscules et activité réductrice de C_2H_2 de jeunes plants de *Robinia pseudoacacia* L. cultivés au laboratoire. *Can. J. Bot.*, **59**, 481-490.
- NAKOS G., 1976. Acetylene reduction (N_2 -fixation) by nodules of *Acacia cyanophylla*. *Soil Biol. Biochem.*, **9**, 131-133.
- PIZELLE G., 1975. Variations saisonnières de l'activité nitrogénasique des nodules d'*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn, d'*Alnus incana* (L.) Moench et d'*Alnus cordata*. *Lois. Desf., C.R. Acad. Sci., Sér. D : Sci. nat.*, **281**, 1829-1832.
- TJEPKEMA J.D., WINSHIP L.J., 1980. Energy requirement for nitrogen fixation in actinorhizal and legumes root nodules. *Science*, **209**, 279-280.
- TRAPPE J.M., 1962. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *Bot. Rev.*, 538-606