

ÉTUDE AU CHAMP DE LA FIXATION
D'AZOTE PAR LE TRÈFLE BLANC
(*Trifolium repens* L.)

INTRODUCTION

LE TRÈFLE BLANC REPRÉSENTE LA LÉGUMINEUSE LA PLUS FRÉQUEMMENT RENCONTRÉE DANS LES PRAIRIES PERMANENTES FRANÇAISES (LAISSUS, 1981). OUTRE l'amélioration apportée à la qualité du fourrage (teneurs élevées en matières azotées, Ca et Mg), le trèfle blanc enrichit le sol en azote par l'intermédiaire des bactéries symbiotiques, fixatrices de l'azote de l'air. Des travaux déjà anciens de COPPENET (1963) mentionnent pour la Bretagne des quantités d'azote fixé équivalentes à 320 unités. A une époque où il est beaucoup question de relance des associations graminées-légumineuses, il nous a paru important de réaliser une étude fine des mécanismes intervenant dans la fixation de l'azote par le trèfle blanc.

Dans ce but, nous avons étudié au champ l'évolution de la biomasse aérienne du trèfle blanc et le devenir des réserves carbonnées de ses organes. La fourniture d'assimilats aux nodules constitue en effet le moteur essentiel de la fixation d'azote atmosphérique.

par A. Guckert,
J. Damay, L. Treillet,
J. Balandreau,
R. Bardin et A. Chalamet

L'activité fixatrice d'azote du trèfle blanc a été déterminée in situ à l'aide de la méthode de réduction de l'acétylène (A.R.A.) avec, comme objectif majeur, la mise en évidence du rôle respectif des paramètres du couvert végétal et des facteurs de l'environnement.

Un dernier volet a consisté à évaluer par l'intermédiaire de différentes méthodes (extrapolation des mesures d'A.R.A., techniques isotopiques) les quantités d'azote fixé par hectare et par jour au niveau de l'éco-système prairial.

I - ÉVOLUTION SAISONNIÈRE DE LA BIOMASSE AÉRIENNE DU TRÈFLE BLANC

A. Matériel et méthodes

Chaque mois, nous prélevons dix carottes de 10 cm de diamètre dans une prairie permanente installée à la ferme de la Bouzule (E.N.S.A.I.A.), située 15 km à l'Est de Nancy. Pour chaque carotte, le trèfle blanc est trié et réparti en folioles, pétioles et stolons. Les organes sont ensuite séchés (48 h à 80° C), puis pesés.

D'autres prélèvements de trèfle sont effectués en même temps dans la prairie afin de déterminer la teneur en glucides utilisables du végétal. Les échantillons sont immédiatement congelés à l'aide de neige carbonique et conservés à - 20° C. Après lyophilisation, ils sont homogénéisés au moyen d'un broyeur à bille.

Les sucres les plus importants rencontrés dans la fraction soluble chez le trèfle blanc sont le glucose, le fructose et le saccharose. Xylose, maltose, raffinose sont également représentés, mais en quantité moindre (VEZ, 1961 ; BEINHART, 1964). L'amidon constitue donc la forme de stockage des sucres chez le trèfle blanc (VEZ, 1961).

Ainsi, la méthodologie adoptée pour l'analyse des glucides utilisables du trèfle blanc nous permet de quantifier spécifiquement glucose, saccharose et amidon par un dosage reposant sur des réactions enzymatiques (glucose-oxydase, β -fructosidase, glucose-amylase, JOURDAN 1980).

B. Résultats

1. Évolution de la biomasse du trèfle

Les productions de matière sèche des différents organes aériens du trèfle sont représentés figure 1.

Nous pouvons noter d'emblée la très nette dominance de la biomasse des stolons qui montre une fluctuation saisonnière importante avec une augmentation marquée en automne - signalée aussi par VEZ (1961), BEINHART (1963) et CHARRIER (1963). La sensibilité du trèfle blanc aux conditions hivernales se traduit par une réduction importante de la masse des stolons. Une seconde période défavorable aux stolons correspond à la repousse printanière des limbes et des pétioles. Entre novembre et mars, on assiste ainsi à une chute de 58 % de la biomasse des stolons.

La masse des limbes et des pétioles évolue peu de mai à juillet 1980 du fait de mauvaises conditions météorologiques. A partir du mois d'août, le trèfle élabore activement folioles et pétioles avec un maximum en septembre. La biomasse décroît ensuite en période hivernale pour se stabiliser en janvier-février à un niveau minimum avec un aspect morphologique particulier : petites feuilles basses, incomplètement développées. Dès le mois de mars, la repousse intervient, marquée par l'élaboration majoritaire de folioles.

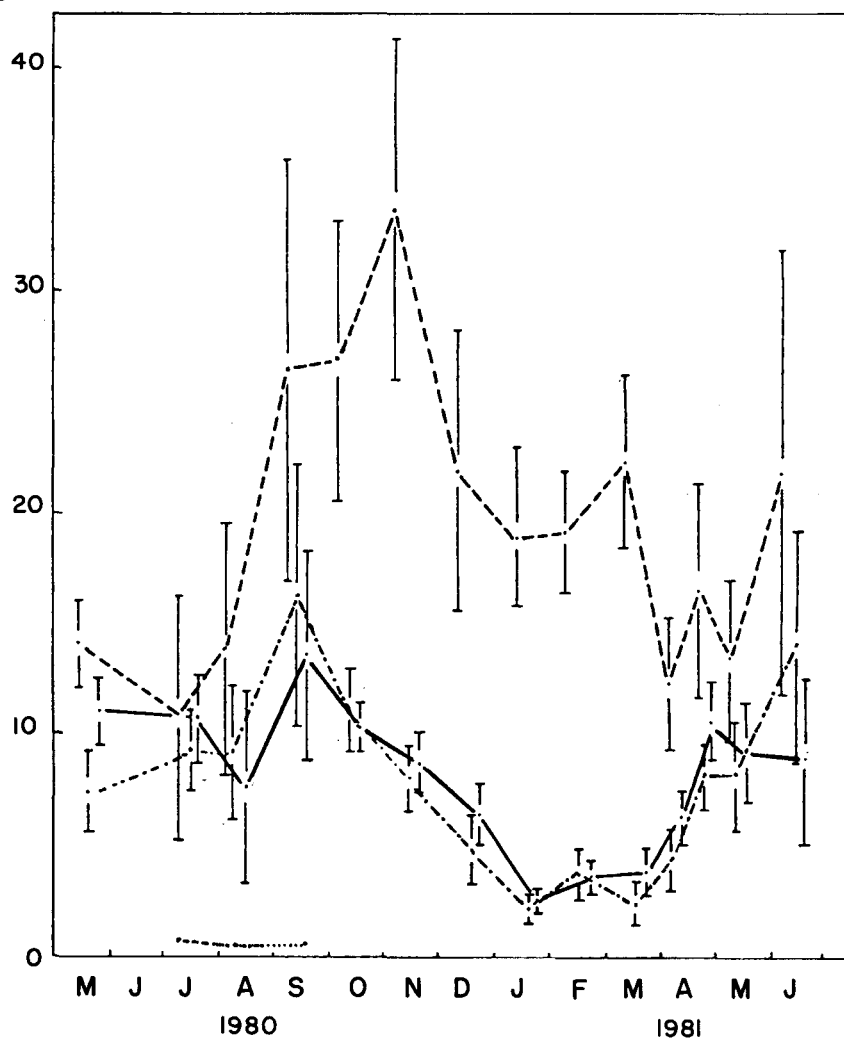
2. Évolution des réserves du stolon

Le rôle primordial joué par le stolon nous a incité à étudier l'évolution des réserves en hydrates de carbone de cet organe (figure 2).

L'amidon représenté de façon majoritaire subit un accroissement très substantiel en automne, correspondant à la mise en réserve des glucides à l'approche de l'hiver, au mois de novembre ; on enregistre ainsi 825 kg d'amidon à l'hectare. Au cours de l'hivernage, ces réserves carbonées sont consommées pour le maintien des structures végétales (activité respiratoire). La concentration en saccharose est en revanche nettement supérieure en février à celle observée en automne. Divers auteurs, BULA et al (1954), RUELKE et SMITH (1956) cités par VEZ (1961), considèrent l'augmentation de la teneur en sucres solubles en hiver comme une voie de protection

FIGURE 1
 FLUCTUATIONS SAISONNIÈRES
 DE LA BIOMASSE AÉRIENNE DU TRÈFLE BLANC
 (en grammes de matière végétale sèche par unité de surface du sol)

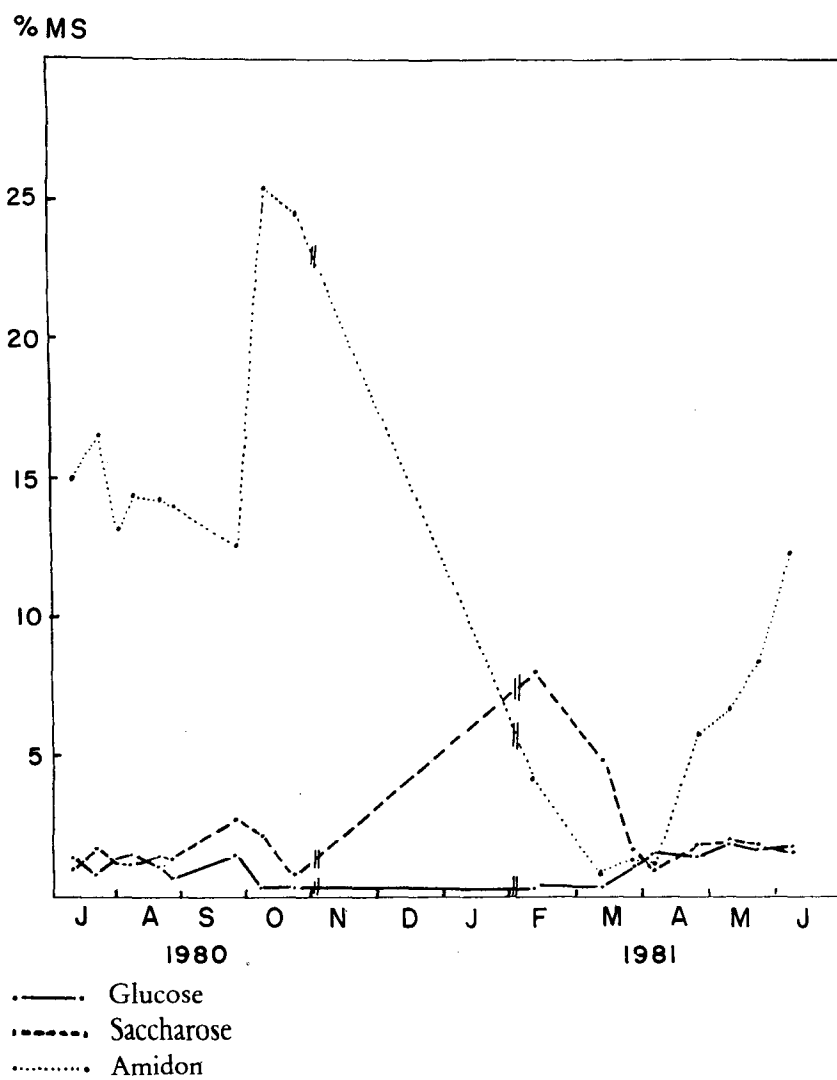
g/1000 cm²



- Fleurs
- Limbes
- · - · Pétioles
- - - - Stolons

┆ erreur standard

FIGURE 2
 FLUCTUATIONS SAISONNIÈRES
 DE LA TENEUR EN GLUCIDES
 UTILISABLES DES STOLONS
 (en pourcentage de la
 matière végétale sèche)



par le trèfle blanc

des plantes contre le gel (élévation de la pression osmotique des cellules par hydrolyse de l'amidon). Fin mars, la repousse s'effectue aux dépens des réserves encore présentes dans le stolon, d'où une décroissance marquée du saccharose. Dès le mois d'avril, l'accumulation de glucides reprend, suite à la mise en place de nouvelles structures foliaires.

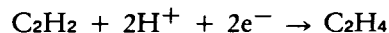
II - ÉTUDE DE LA FIXATION D'AZOTE PAR LE TRÈFLE BLANC

A. Matériel et méthodes

La méthode de mesure utilisée est basée sur la mesure de l'activité de la nitrogénase, enzyme responsable de la fixation de l'azote atmosphérique par les bactéries symbiotiques (*Rhizobium trifolii*) hébergées par les nodules du trèfle. La conversion réalisée par cette enzyme est la suivante :



De nombreux auteurs (SCHOLLHORN et BURRIS, 1966 ; DILWORTH, 1966) ont constaté que la nitrogénase pouvait assurer de la même manière la réduction de l'acétylène en éthylène suivant la réaction :



D'où l'idée (KOCH et EVANS, 1966) d'utiliser cette dernière propriété pour mesurer l'activité nitrogénasique, la technique consistant en des dosages de gaz (mesure de l'apparition d'éthylène à partir d'acétylène). La quantité d'azote fixée étant évaluée à partir du coefficient de conversion théorique $\text{C}_2\text{H}_2/\text{N}_2 = 3/1$.

Pour la mesure au champ de l'activité réductrice d'acétylène (A.R.A.), nous avons utilisé le dispositif proposé par BALANDREAU et DOMMERGUES (1973), adapté au trèfle blanc (J. DAMAY et al., 1983).

Le principe consiste à enfoncer dans le sol un cylindre métallique de 30 cm de diamètre, garni à sa partie supérieure d'une gorge servant de joint hydraulique et dans laquelle on dispose une cloche en matière plastique.

Après injection sous la cloche d'une quantité connue d'acétylène (10 % du volume), on prélève deux échantillons de l'atmosphère interne au bout de 20 et 40 minutes. La comparaison des teneurs en C_2H_4 de ces deux prélèvements permet de connaître l'activité réductrice d'acétylène (A.R.A.) et, par conséquent, d'évaluer la fixation d'azote. On utilise du propane comme gaz traceur.

Les dosages de gaz sont réalisés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse de type Girdel, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme.

● *Collecte des données*

- Les essais ont été réalisés sur des parcelles du domaine de la Bouzule (ENSAIA). Un trèfle blanc de type sauvage installé en prairie permanente et un trèfle blanc Ladino (variété *Régal*) semé en mai 1980 ont fait l'objet de notre étude.
- La fixation d'azote est évaluée par la méthode de réduction de l'acétylène décrite précédemment.
- Après les mesures de l'A.R.A., les parties aériennes et les stolons de trèfle sont récoltés, séchés à l'étuve (80 °C pendant 48 h) et pesés. Les parties aériennes de graminées éventuellement présentes dans les cylindres de mesures subissent le même traitement.
- Les données climatiques sont enregistrées (température de l'air et du sol, hygrométrie, rayonnement).
- L'humidité du sol est déterminée par prélèvement de carottes de sol et pesée.

● *Exploitation des données*

L'exploitation des données expérimentales a été réalisée avec comme objectif la mise en évidence de facteurs exerçant une action limitante sur le processus étudié. A cet effet, nous avons utilisé la méthode préconisée par WEBB (1971) et BALANDREAU et al. (1978, 1982) consistant à analyser les facteurs limitants par une méthode graphique basée sur le tracé de courbes enveloppes.

B. Résultats

Nous avons réalisé un grand nombre de mesures au champ au cours de plusieurs années de végétation sur des trèfles sauvages de prairie permanente et sur des trèfles semés (*Ladino Régale*) d'âge variable (A_0 , A_1 , A_2). Nous examinerons successivement la variation de la fixation d'azote au cours d'un cycle jour-nuit, les fluctuations sur une année puis nous essayerons de mettre en évidence les facteurs ayant une incidence sur le phénomène : paramètres propres au végétal et paramètres du milieu.

1. Évolution de l'A.R.A. au cours d'un cycle nyctéméral

Nous avons effectué, sur différents cycles jour-nuit, des mesures d'A.R.A. toutes les 3 heures (à l'aide de 4 cylindres de mesure).

La figure 3 illustre les résultats obtenus le 20-21 mai 1980 sur prairie permanente. Les valeurs de l'A.R.A. sont exprimées en nanomoles de C_2H_4 par heure et par cylindre de mesure.

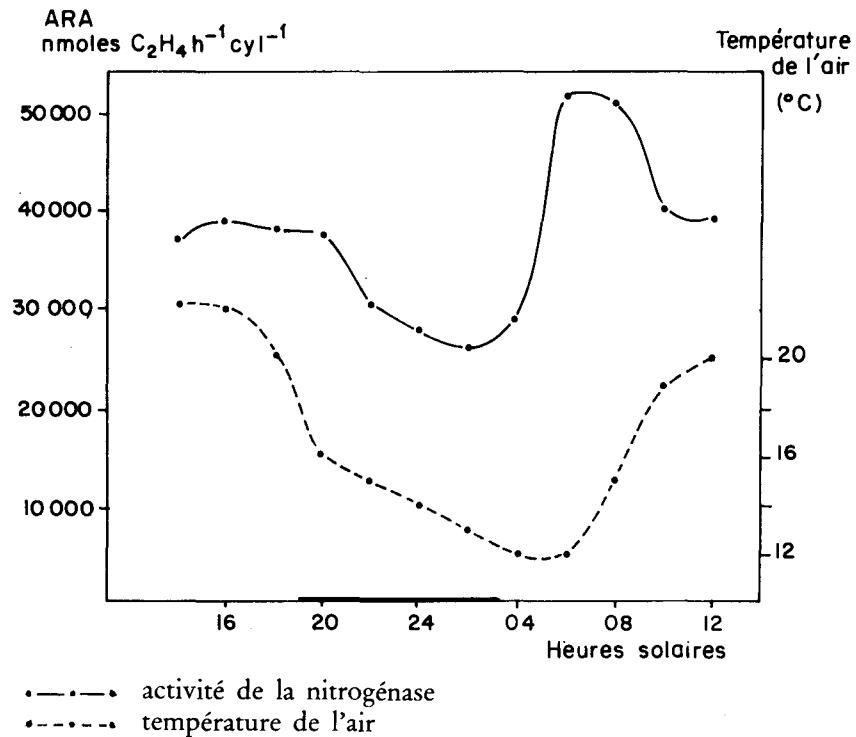
Les mesures réalisées de nuit montrent une décroissance de l'A.R.A., mais la fixation à l'obscurité se maintient néanmoins à un niveau élevé, contrastant ainsi avec le comportement des légumineuses annuelles où l'interruption de la photosynthèse provoque la suppression de la fixation. La valeur de la fixation nocturne représente sensiblement 60-70 % de la fixation diurne. Le trèfle blanc, grâce aux réserves accumulées dans le stolon, continue à fixer l'azote atmosphérique au cours de la nuit. La décroissance nocturne de l'A.R.A. est à relier essentiellement à une baisse notable de la température. Dès le lever du soleil et le relèvement de la température, la fixation croît rapidement.

2. Évolution de l'A.R.A. au cours d'une année de végétation

A partir de mesures échelonnées entre mai 1980 et avril 1981, nous avons calculé des valeurs moyennes mensuelles permettant de tracer la courbe représentée figure 4.

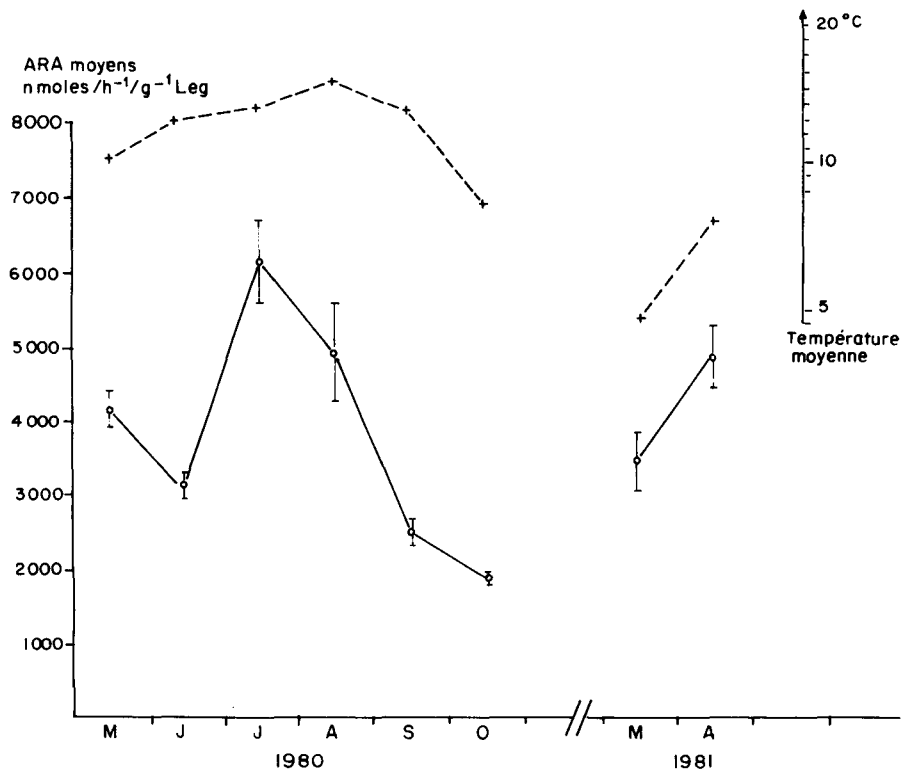
On observe un redémarrage de la fixation au mois de mars lorsque la température de l'air dépasse $5^{\circ}C$, puis une croissance avec un maximum estival et une diminution marquée en automne.

FIGURE 3
VARIATIONS NYCTHÉMÉRALES DE L'ACTIVITÉ
NITROGÉNASIQUE SOUS PRAIRIE PERMANENTE
ET DE LA TEMPÉRATURE DE L'AIR
 (20-21 mai 1980)



Nous avons pu montrer par ailleurs (DAMAY et al, 1983) qu'il n'y avait pas de relation directe entre photosynthèse et fixation d'azote lorsque les deux phénomènes sont mesurés simultanément. Par contre, on observe une corrélation entre les deux processus lorsque la photosynthèse est

FIGURE 4
 ÉVOLUTION DES VALEURS MOYENNES DE L'A.R.A.
 AU COURS D'UNE ANNÉE



déterminée une heure avant la mesure de fixation. Ce délai d'action entre photosynthèse et fixation d'azote est à relier au transfert des assimilats des organes aériens vers les nodules.

3. Étude des facteurs influant sur la fixation de l'azote

a) Rôle des paramètres du couvert végétal

La fourniture de substrats carbonés d'origine photosynthétique aux bactéries fixatrices jouant un rôle essentiel dans la fixation, nous avons tout d'abord envisagé de relier les mesures d'A.R.A. à la taille de l'appareil photosynthétique. Cette dernière est évaluée par la matière sèche foliaire, plus commode à déterminer que l'indice foliaire (L.A.I.) : nous avons pu montrer l'existence d'une relation linéaire entre L.A.I. et poids de feuilles (GUCKERT, et al., 1983).

Dans une deuxième étape, nous avons considéré le rôle des stolons, organes de réserve majeurs du trèfle blanc.

● Influence des parties aériennes

Le tracé des couples de valeurs (A.R.A., poids de feuilles) est représenté sur la figure 5. On obtient ainsi un nuage de points admettant une enveloppe limite que nous avons assimilée à un segment de droite ($y = Kx$). Nous considérons que les points situés sur cette droite limite correspondent aux situations expérimentales où l'A.R.A. a été limitée uniquement par le poids de feuilles. Les points situés en-dessous de la courbe représentent les mesures réalisées lorsque des facteurs autres que le poids de feuilles exercent une action limitante. On peut déterminer ainsi une A.R.A. maximale qui est fonction de la taille de l'appareil photosynthétique selon une équation (vérifiée au cours de 2 années de mesure) :

$$\text{Max. A.R.A.} = 8\ 400 \text{ P.F.}$$

La pente de la droite ainsi définie, appelée coefficient K, rend compte de l'efficacité du système fixateur. En effet, le coefficient K semble exprimer la capacité de la plante à allouer une fraction de ses assimilats aux organismes fixateurs.

D'autres investigations conduites récemment (GUCKERT et al., 1983) montrent que la valeur de K varie avec l'âge du trèfle. Le coefficient est d'autant plus élevé que le trèfle est jeune (et que les nodules sont efficaces) puis il décroît pour se stabiliser autour de 8 400 lorsque le trèfle a développé des stolons.

FIGURE 5

RELATION ENTRE L'ACTIVITÉ
FIXATRICE ET LE POIDS
DES FEUILLES CHEZ
LE TRÈFLE BLANC
(prairie permanente)

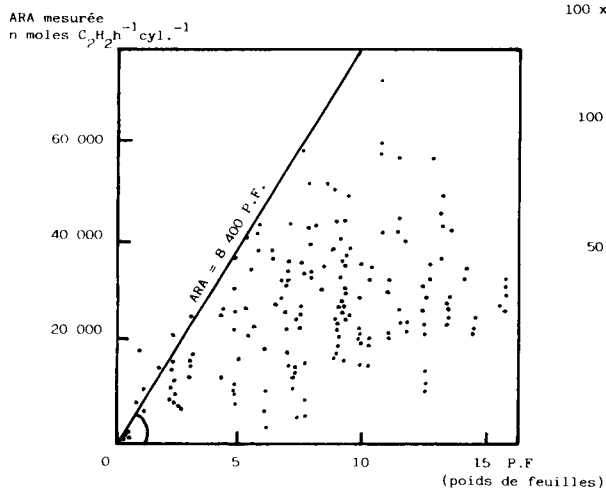
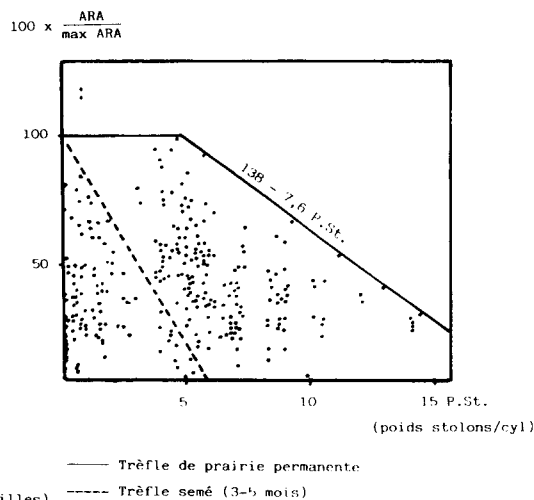


FIGURE 6

INCIDENCE DES STOLONS
SUR LA FIXATION D'AZOTE



● *Influence des stolons*

Nous avons montré plus haut le rôle de stockage des assimilats joué par les stolons. On peut donc admettre avec HARVEY (1970), HAYSTEAD et MARRIOT (1979) que les stolons constituent un « puits compétitif » à l'égard des assimilats pouvant être alloués aux nodules.

Pour appréhender cette influence des stolons sur la fixation d'azote, nous nous exprimé toutes les valeurs expérimentales d'A.R.A. en pour cent de Max A.R.A. L'utilisation des ordonnées réduites ($100 \times \frac{\text{A.R.A.}}{\text{Max A.R.A.}}$) nous permet ainsi de comparer des plantes différant par la taille de leur appareil photosynthétique.

Sur la figure 6, nous avons relié ce mode d'expression de l'A.R.A. au poids de stolons présents dans les cylindres de mesure. Le nuage de points obtenu comporte une limite supérieure présentant une pente négative : ce qui indique une baisse de l'A.R.A. consécutive à une augmentation de la masse des stolons. Il faut noter cependant que les pentes des droites obtenues pour les trèfles de prairies permanentes et les trèfles semés sont différentes. Dans le cas du trèfle jeune, la pente accusée indique une action dépressive marquée des jeunes stolons alors que pour le trèfle de prairie permanente des masses de stolons inférieures à 5 g/700 cm² ne semblent pas affecter la fixation.

Ces résultats conduisent à envisager l'existence de deux types de stolons (figure 7) :

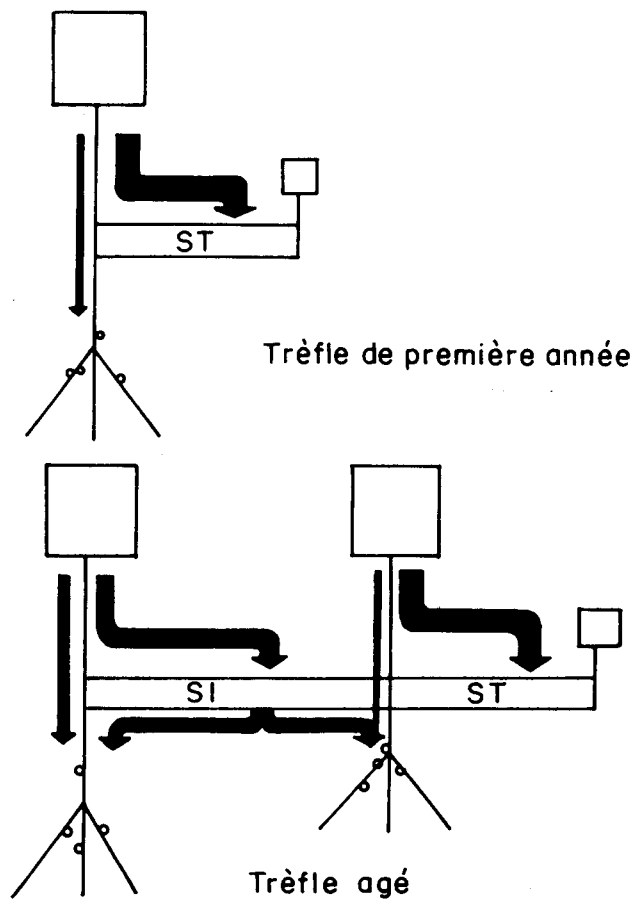
- la zone apicale ou « stolons terminaux » en cours de croissance, élaborant de nouvelles feuilles, important des assimilats d'où une action compétitive importante à l'égard du compartiment souterrain ;
- les stolons intermédiaires, plus anciens, mieux enracinés qui, outre leur fonction de mise en réserve du carbone, peuvent contribuer à l'approvisionnement énergétique des nodules des racines adventives.

Ces deux types de stolons n'exerceraient pas la même dépression sur la fixation d'azote. Cette hypothèse a été confirmée à l'aide de mesures fines réalisées sur différents types de stolons avant et après ablation des parties basales ou apicales (LAPERRIERE et MARQUET, 1982).

Les stolons terminaux, plus nombreux dans le cas d'un trèfle Ao et plus compétitifs à l'égard de la fixation d'azote que les stolons intermédiaires, expliqueraient les différences de pentes des deux droites limites de la figure 6.

L'équation de la droite limite obtenue dans le cas du trèfle de prairie permanente représente le coefficient dont il faudra effectuer le Max. A.R.A. pour déterminer l'A.R.A. potentielle (A.R.A. P.), c'est-à-dire l'A.R.A. définie par les paramètres propres au végétal :

FIGURE 7
REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE
DU RÔLE DES STOLONS



ST : Stolon terminal
SI : Stolon intermédiaire

La figure 6 montre que, pour des poids de stolons inférieurs à 5 g par cylindre, l'A.R.A. mesurée est voisine de Max. A.R.A.; P.S. n'exerce pas d'influence sur Max A.R.A.; $f(P.S.) = 1$ d'où :

$$A.R.A. P. = Max. A.R.A.$$

Pour des valeurs supérieures à 5 g, l'A.R.A. mesurée est toujours inférieure à Max. A.R.A. et en diffère d'autant plus que P.S. augmente d'où :

$$A.R.A. P. = Max A.R.A. \times \frac{138 - 7,6 P.S.}{100}$$

Nous aboutissons ainsi à un premier état d'un modèle simplifié permettant de définir le potentiel d'activité fixatrice d'azote :

$$\text{Si } P.S. < 5 \text{ g : } A.R.A. P. = 8\,400 \text{ P.F.}$$

$$\text{Si } 5 \text{ g} < P.S. < 15 \text{ g : } A.R.A. P. = 8\,400 \text{ P.F.} \times (1,38 - 0,076 P.S.)$$

b) Rôle des paramètres climatiques

En poursuivant la même démarche, nous avons cherché à déterminer dans quelle mesure le potentiel défini par les paramètres végétaux est influencé par les facteurs de l'environnement.

L'A.R.A. mesurée est exprimée en pourcentage de l'A.R.A. Potentielle et mise en relation avec les valeurs de la température de l'air, de la température du sol et de l'humidité du sol.

● *Rôle de la température de l'air*

Le nuage de points (figure 8) possède une limite supérieure assimilée à une droite ascendante : une augmentation de la température de l'air est donc favorable à la fixation de l'azote. Une température inférieure à 0° C semble arrêter totalement le processus, inversement une température de 17° C ne paraît plus limiter l'A.R.A. P. Ce facteur a été peu étudié, les auteurs intéressés par cet aspect proposent davantage des optima que des valeurs extrêmes. Pour MEYER & ANDERSON, 1959, l'optimum de fixation d'azote de *Trifolium subterraneum* se situerait entre 20 et 25° C.

FIGURE 8
RELATION ENTRE A.R.A. ET
TEMPÉRATURE DE L'AIR

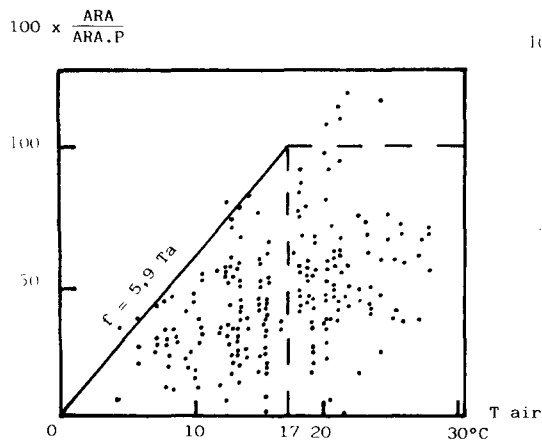
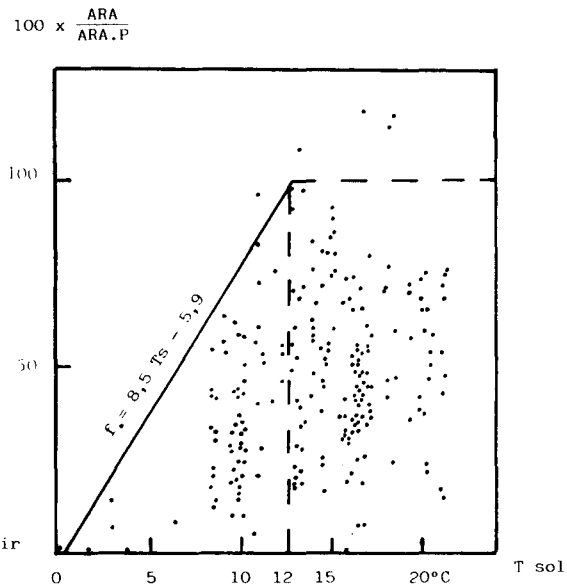


FIGURE 9
RELATION ENTRE A.R.A. ET
TEMPÉRATURE DU SOL



Ce résultat est en accord avec nos données. Il est regrettable que l'absence de températures élevées ne nous ait pas permis d'évaluer la valeur au-delà de laquelle la température de l'air diminue le niveau de l'A.R.A. P.

● *Rôle de la température du sol*

Ce facteur, souvent étudié, est étroitement lié au précédent mais intervient plus directement sur l'activité de la nitrogénase. Le nuage de points (figure 9) rend compte des différentes températures du sol et des valeurs de l'A.R.A. associées dans le cas d'un trèfle de prairie permanente. Le tracé de la courbe limite indique que la fixation s'annule pour une température du sol proche de 0° C. On note aussi que l'élévation des

températures s'accompagne d'une augmentation de l'A.R.A. ; au-delà de 12,5° C, l'activité de la nitrogénase semble indépendante de la température du sol.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de HALLIDAY & PATE (1976) montrant que la production d'éthylène est très amoindrie pour des températures du sol comprises entre 0 et 13° C et qu'une augmentation de température de 4,5 à 12,5° C, provoque une reprise importante de l'A.R.A. Selon ces auteurs, la température du sol serait le facteur limitant la fixation d'azote au printemps dans les prairies des régions tempérées. MASTERSON et MURPHY (1976) attribuent aussi à ce paramètre un rôle essentiel dans l'expression de l'activité de la nitrogénase.

● *Rôle de l'humidité du sol*

L'humidité du sol en deçà d'une valeur correspondant à 60-70 % de la capacité au champ semble exercer une action limitante sur la fixation d'azote. Nos mesures cependant, du fait de l'absence d'une sonde à neutrons, ne permettent pas de tirer des conclusions précises ; des études complémentaires sont en cours.

c) *Schéma du modèle proposé*

Le modèle simplifié peut être schématisé de la manière suivante :

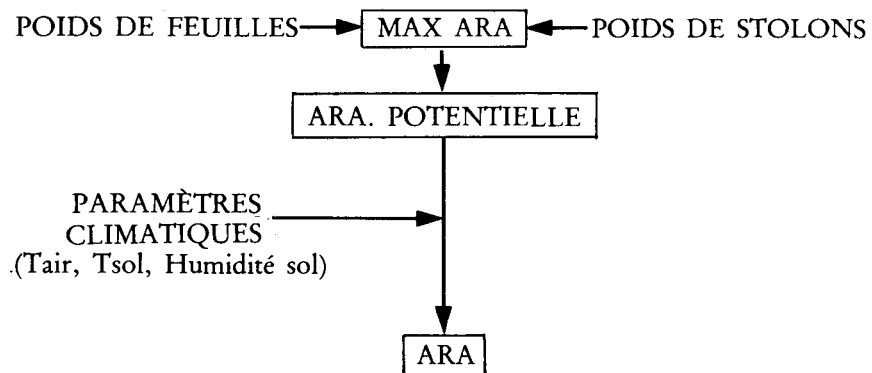
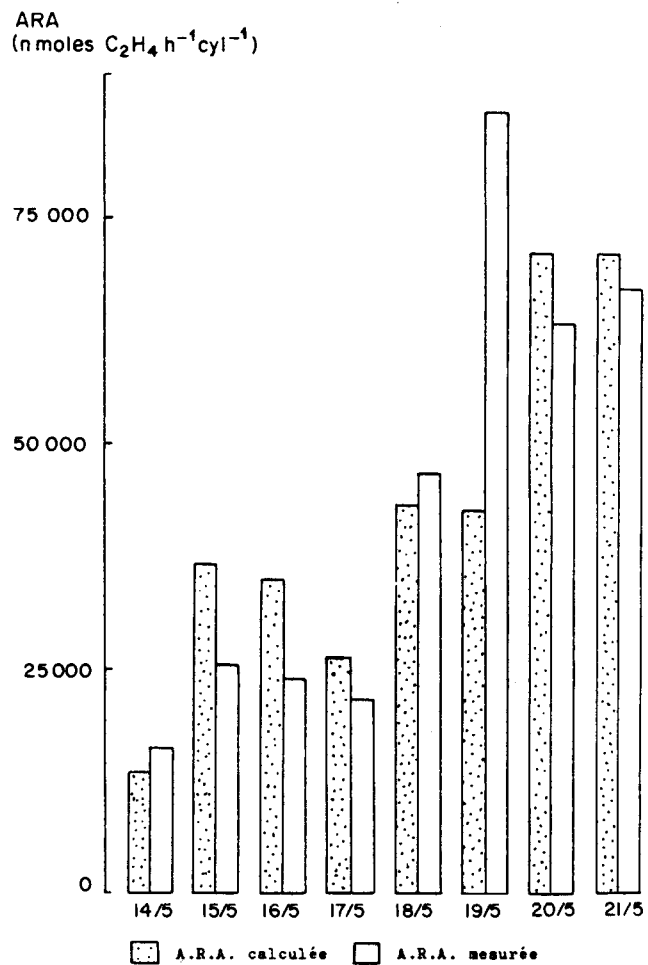


FIGURE 10

COMPARAISON DES MAXIMA DE FIXATION OBSERVÉS
ET CALCULÉS SUR UNE PÉRIODE DE 8 JOURS



En vue de tester la valeur prédictive du modèle élaboré, nous avons comparé les valeurs observées et les valeurs calculées sur une période de 8 jours allant du 14 mai au 21 mai (figure 10).

Malgré une adéquation relativement bonne pour certains jours, il subsiste encore des écarts notables entre valeurs réelles et valeurs théoriques. Ces écarts sont à relier à l'état incomplet du modèle et en particulier au facteur hydrique mal cerné et nécessitant des investigations complémentaires.

III - DÉTERMINATION DE LA QUANTITÉ D'AZOTE FIXÉ

Pour l'agronome et le praticien, il est important de compléter l'étude des mécanismes par un bilan en terme de quantités d'azote fixé par hectare de surface fourragère. On trouve dans la littérature des chiffres très variables en fonction des auteurs et des zones géographiques concernées.

MASTERSON & MURPHY (1976) observent en Irlande des fixations annuelles allant de 83 à 296 kg/ha de N. MORRISON (1973), cité par LAISSUS (1981), enregistre en Angleterre des valeurs de l'ordre de 160 kg. JACQUARD, MONNIER & CROISIER (1970) estiment que l'apport d'azote par le trèfle blanc est d'environ 90 kg. HAYSTEAD & LOWE (1977) évaluent la fixation du trèfle en prairie à 100 kg/ha de N.

Nous avons tenté une évaluation quantitative basée sur deux méthodes différentes :

- d'une part, une extrapolation des mesures ponctuelles d'A.R.A., avec toutes les restrictions et précautions qu'une telle démarche impose ;
- d'autre part, une estimation par la mise en œuvre des méthodes isotopiques.

A. Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Nous avons semé côte à côte 2 parcelles de 120 m² comportant respectivement :

- du trèfle blanc (*Ladino Régale*),
- du ray-grass anglais (*Hora*).

2. Analyse isotopique

Nous avons utilisé conjointement deux méthodes :

- l'utilisation d'engrais marqué au ¹⁵N,
- la mise en œuvre des rapports isotopiques naturels (BARDIN et al, 1977).

a) Apport d'engrais marqué

Le principe de base est le suivant : lorsque deux sources d'un même nutriment sont présentes dans le sol, une plante absorbera chacune d'elles en proportion des quantités respectives disponibles. On compare les rapports ¹⁵N/¹⁴N de plantes fixatrices (trèfle blanc) qui possèdent deux sources d'azote (l'air et le sol) avec des plantes témoins non fixatrices (ray-grass) n'utilisant que l'azote du sol.

Le taux d'azote fixé est calculé, dans le cas d'un apport d'engrais marqué par la formule de FRIED (MAC AUCLIFFE et al. 1958) :

$$\% \text{ N fixé} = \left(1 - \frac{\% \text{ }^{15}\text{N en excès dans la légumineuse}}{\% \text{ }^{15}\text{N en excès dans la plante de référence}} \right) \times 100$$

Nous avons appliqué l'équivalent de 50 kg/ha de N d'engrais marqué : ¹⁵NH₄ ¹⁵NO₃ (50 % ¹⁵N) sur une bande de 3 m² de ray-grass et 3 m² de trèfle blanc. Après 38 jours, les parties aériennes de ces parcelles sont récoltées, séchées et broyées. On détermine sur les poudres obtenues le taux d'azote total, et les teneurs en ¹⁵N à l'aide d'un spectromètre de masse Cameca 215 MI.

b) Abondances isotopiques naturelles

La fixation d'azote a été évaluée d'après la différence d'abondance naturelle de ^{15}N entre végétaux fixateurs et non fixateurs selon la formule proposée par BARDIN et al. (1977) :

$$\% \text{ N fixé} = \frac{\% \text{ }^{15}\text{N plante de référence} - \% \text{ }^{15}\text{N légumineuse}}{\% \text{ }^{15}\text{N plante de référence} - \frac{\% \text{ }^{15}\text{N air}}{\beta}} \times 100$$

$$\beta = \text{coefficient de fractionnement} = 1,004$$

Lors de la récolte des parcelles marquées (cf. ci-dessus), on prélève également des échantillons de trèfle blanc et de ray-grass n'ayant pas reçu de ^{15}N et situés à des distances suffisantes pour ne pas avoir été contaminés. Ces échantillons subissent les mêmes traitements et analyses que les précédents en vue de la détermination des abondances naturelles.

c) Estimation de l'azote fixé par extrapolation des mesures d'A.R.A.

Durant la période correspondant au marquage ^{15}N , nous avons réalisé un total de 90 mesures de fixation par la méthode A.R.A. dont plusieurs cycles nycthéméraux. Nous avons groupé les valeurs obtenues en classes et en tranches horaires, ce qui nous a permis de calculer des moyennes pondérées par tranche horaire puis d'effectuer une extrapolation à 24 heures.

B. Résultats

Les résultats obtenus pour deux années consécutives (1980 et 1981) sont reportés dans le tableau I.

Nous obtenons des valeurs d'azote fixé similaires par les deux méthodes isotopiques, comprises sensiblement entre 42 et 50 % de l'azote total du végétal. Nous pouvons en déduire ainsi que, lors des époques de mesure, la moitié de l'azote prélevé par le végétal transite par la nitratre-réductase et provient donc du pool de l'azote du sol.

TABLEAU I
ÉVALUATION DES QUANTITÉS
D'AZOTE FIXÉ

	Méthode	1980	1981
Azote fixé en %	¹⁵ N	41,8	48,9
	Abondance naturelle	42,3	/
Azote fixé en kg/ha/j	Mesures d'ARA extrapolées	1 ± 0,25	0,5-1,12
	¹⁵ N	1,03	1,81
	Abondance naturelle	1,04	/

Les quantités d'azote fixé par jour et par hectare fluctuent selon les méthodes utilisées et en fonction de l'année, la fourchette correspondant à 0,5 - 1,8 kg de N/ha/j.

Les plus fortes valeurs sont obtenues par la méthode ¹⁵N qui optimise vraisemblablement la fixation car la formule de FRIED utilisée pour le calcul ne tient compte que de la repousse des parties aériennes sans considérer les réserves azotées des racines et des stolons lors de cette repousse ; ces réserves contiennent essentiellement de l'azote 14 et leur utilisation se traduit donc par une fixation d'azote apparente.

Si on écarte les valeurs extrêmes on aboutit à une valeur moyenne de l'ordre de 1 kg de N/ha/j. En admettant une période de végétation et de

fixation active de l'ordre de 200 jours, on peut évaluer à 200 kg les quantités d'azote fixées annuellement dans nos conditions. Le trèfle blanc constitue par conséquent un pourvoyeur d'azote important dans les prairies permanentes et les associations graminées-légumineuses et mérite un intérêt accru de la part des agronomes et des éleveurs.

CONCLUSION

Parallèlement à l'étude de l'activité fixatrice d'azote, nous avons suivi sur deux cycles de végétation la répartition de la biomasse aérienne du trèfle blanc, mettant en évidence la place prépondérante des stolons. Une analyse biochimique fine de ces derniers souligne leur rôle d'organe de réserve : accumulation d'amidon en automne, et leur rôle dans la survie du trèfle en hiver (résistance au gel par l'intermédiaire du saccharose ?).

De nombreuses mesures réalisées au champ à l'aide de la méthode de réduction de l'acétylène ont permis de préciser un certain nombre de facteurs limitant la fixation d'azote et d'aboutir à une première ébauche d'un modèle prédictif. Dans son état actuel, ce modèle fournit une bonne représentation du rôle du matériel foliaire et des stolons, ces deux paramètres déterminant le potentiel de fixation de l'azote de la plante.

Les facteurs de l'environnement interviennent sur ce potentiel de fixation pour le minorer. Le rôle de la température de l'air et du sol ont ainsi été mis en évidence. L'insolation déterminée lors des mesures de fixation n'a pas d'action immédiate car il existe un décalage entre la fourniture d'assimilats photosynthétiques et l'activité fixatrice des nodules. Malgré de nombreuses mesures, le rôle du facteur hydrique n'est pas encore entièrement établi.

En liaison avec d'autres équipes, l'objectif de cette approche de modélisation est d'aboutir à un outil permettant à terme une meilleure gestion de l'écosystème pâturé.

Des expérimentations conduites à l'aide d'azote 15 et des extrapolations réalisées à partir des mesures d'activité réductrice d'acétylène permet-

tent de donner une première approximation des quantités d'azote fixé. Elles se situent dans nos conditions (plateau lorrain) dans une fourchette allant de 0,5 à 1,8 kg/ha/jour. En retenant une valeur moyenne de 1 kg/ha/jour et 200 journées favorables, on peut estimer la fixation annuelle à 200 kg/ha de N.

A. GUCKERT, J. DAMAY, L. TREILLET,

Phytotechnie, E.N.S.A.I.A., Nancy (Meurthe-et-Moselle) ;

J. BALANDREAU,

Écologie Microbienne, C.N.R.S.-C.P.B., Nancy (Meurthe-et-Moselle) ;

R. BARDIN et A. CHALAMET,

Biologie des Sols, Université de Lyon I (Rhône).

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre de la R.C.P. du C.N.R.S. n° 644 et de l'action pluridisciplinaire « Interface animal-végétal » subventionnée par la D.G.R.S.T.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BALANDREAU J. et DOMMARGUES Y. (1973) : « Assaying nitrogenase (C₂H₂) activity in the field », *Bull. Ecol. Res. Comm.* (Stockolm), 17, 247-254.

BALANDREAU J., DUCERF P., HAMAD-FARES I., WEINHARD P., RINAUDO G., MILLIER C. et DOMMARGUES Y. (1978) : « Limiting factors in grass nitrogen fixation », *Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics*, (J. Dobereiner, R. Burris, A. Hollaender, eds.), Plenum Press, 275-302.

BALANDREAU J., GUCKERT A. et WEINHARD P. (1982) : « Vers une modélisation de la fixation d'azote », *Acta Oecologica*, *Oecol. Gener.* 3, 1, 91-110.

BARDIN R., DOMENACH A.M. et CHALAMET A. (1977) : « Rapports isotopiques naturels de l'azote. II-Application à la mesure de la fixation symbiotique de l'azote in situ », *Rev. Ecol. Biol. Sol*, 14, 395-402.

- BEINHART G. (1963) : « Effects of environment on meristematic development, leaf area and growth of white clover », *Crop Sci.*, 3, 209-213.
- BEINHART G. (1964) : « Free sugar concentrations in white clover, *Trifolium repens* L., grown at different temperatures and light intensities », *Crop Sci.*, 4, 625-631.
- BULA R.J., SMITH D. et DALE (1954) : « Cold resistance and chemical composition in overwintering alfalfa, red clover and sweetclover », *Agron. J.*, 46, 397-401.
- CHARRIER A. (1963) : *Action de la lumière sur la croissance et le développement du trèfle blanc, au stade jeune*, rapport de stage de « fin d'études », E.N.S.A. Grignon.
- DAMAY J. (1981) : *Contribution à l'étude de la fixation d'azote par le trèfle blanc (Trifolium repens L.) : Aspects écologiques et agronomiques*, thèse Dr. Ing. I.N.P. de Lorraine.
- DAMAY J., TREILLET L., GUCKERT A. et BALANDREAU J. (1983) : « Mise au point d'un système de régulation thermique permettant la climatisation des enceintes de mesures in situ de la photosynthèse et de l'activité nitrogénasique », sous presse.
- DILWORTH M.J. (1966) : « Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations from *Clostridium pasteurianum* », *Biochim. Biophys. Acta*, 127, 285-294.
- GUCKERT A., DAMAY J., TREILLET L., BALANDREAU J., LAPERRIÈRE C. et MARQUET N. (1983) : « Influence de la taille de l'appareil photosynthétique sur la fixation d'azote par le trèfle blanc », sous presse.
- HARVEY H.J. (1970) : « Patterns of assimilate translocation in *Trifolium repens* », *White Clover Research*, Occ. Symp. 6th. Br. Grassld Soc., 181-186.
- HALLIDAY J. et PATE J.S. (1976) : « The acetylene reduction assay as a mean of studying nitrogen fixation in white clover under sward and laboratory conditions », *J. Br. Grassl. Soc.*, 31, 29-35.
- HAYSTEAD A. et LOWE A.G. (1977) : « Nitrogen fixation by white clover in hill pasture », *J. Br. Grassl. Soc.*, 32, 57-63.
- HAYSTEAD A. et MARRIOT C. (1979) : « Transfer of legumes nitrogen to associated grass », *Soil Biol. Biochem.*, 11, 99-104.
- JACQUARD P., MONNIER G. et CROISIER L. (1970) : « Étude des effets résiduels des cultures fourragères sur les cultures arables », *Ann. Agron.* 21.
- JOURDAN J. (1980) : *Variations saisonnières de la morphogénèse et de la croissance des systèmes aériens et souterrains chez le peuplier : leurs relations avec les glucides et les transferts minéraux*, thèse, Grenoble.

- KOCH B. et EVANS H.J. (1966) : « Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules », *Plant Physiology*, 41, 1748-1750.
- LAISSUS R. (1976) : « Avantages et inconvénients des associations trèfle blanc-graminées », *Fourrages*, 66, 93-102.
- LAISSUS R. (1981) : « Ajustement de la fertilisation azotée des prairies pâturées, en vue d'utiliser les potentialités du trèfle blanc », *C.R. Acad. Agri. France*, 67, 599-615.
- LAPERRIÈRE C. et MARQUET N. (1982) : *Contribution à l'étude de la fixation de l'azote par le trèfle blanc (Trifolium repens L.) : Rôle du compartiment réserve et du compartiment souterrain*, D.E.A. Sci. Agron. I.N.P. de Lorraine.
- MAC AUCLIFFE C., CHAMBLEE D.S., URIBE-ARANGO H. et WOODHOUSE W.W. (1948) : « Influence of inorganic nitrogen on nitrogen fixation by legumes as revealed by ^{15}N », *Agron. J.*, 50, 334-337.
- MASTERSON C.L. et MURPHY P.M. (1976) : « Application of the acetylene reduction technique to the study of nitrogen fixation by white clover in the field », *Symbiotic nitrogen fixation in plants*, (P.S. Nutman, ed.) Cambridge Univ. Press, 299-316.
- MEYER G. et ANDERSON A. (1959) : « Temperature and symbiotic fixation », *Nature*, 183, 61.
- MORRISON J. et al. (1973) : « Performance of white clover in different environments », *G.R.I. annual report*, p. 53 cit. LAISSUS (1981).
- RUELKE O.C. et SMITH D. (1956) : cités par VEZ (1961), *Plant Physiol.*, 31, 364.
- SCHOLLHORN R. et BURRIS R.H. (1966) : « Study of intermediates in nitrogen fixation », *Fed. Proc.*, 25, 710.
- TREILLET L. (1981) : *Contribution à l'étude de la fixation de l'azote par le trèfle blanc (Trifolium repens L.) : la plante et son environnement*, thèse de 3^e cycle, I.N.P.L. Nancy.
- TREILLET L., DAMAY J., GUCKERT A., BALANDREAU J., LAPERRIÈRE C. et MARQUET N. (1983) : « Effet de la stimulation de la photosynthèse par enrichissement en CO₂ sur la fixation d'azote par le trèfle blanc », sous presse.
- VEZ A. (1961) : « Étude du développement du trèfle blanc en relation avec les fluctuations de quelques substances organiques », *Bull. Soc. Bot. Suisse*, 71, 118-173.