

LES BIOFERTILISANTS FIXATEURS D'AZOTE EN RIZICULTURE POTENTIALITES, FACTEURS LIMITANTS ET PERSPECTIVES D'UTILISATION*

Pierre A. ROGER

Programme de recherche ORSTOM/IRRI
sur la biomasse photosynthétique aquatique des rizières inondées.

INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT EN COOPERATION
Laboratoire de Microbiologie, Université de Provence, Case 87,
3, Place Victor Hugo, F-13331-Marseille Cedex 3, FRANCE.

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION

2. CARACTERISTIQUES GENERALES DE LA FIXATION D'AZOTE DANS LES RIZIERES

3. FIXATEURS DE N₂ HETEROTROPHES

- 3.1. Potentiel pour augmenter les rendements
 - 3.1.1. Potentiel comme source d'azote
 - 3.1.3. Potentiel estimé à partir des expériences d'inoculation
- 3.2. Utilisation actuelle, facteurs limitants, et perspectives

4. CYANOBACTERIES

- 4.1. Potentiel pour augmenter les rendements
 - 4.1.1. Potentiel comme source d'azote
 - 4.1.2. Autres effets favorables
 - 4.1.3. Potentiel estimé à partir des expériences d'inoculation
- 4.2. Utilisation actuelle, facteurs limitants, et perspectives

5. AZOLLA

- 5.1. Potentiel pour augmenter les rendements
 - 5.1.1. Potentiel comme source d'azote
 - 5.1.2. Autres effets favorables
 - 5.1.3. Effets sur le rendement en riz
- 5.2. Utilisation actuelle, facteurs limitants, et perspectives

6. LEGUMINEUSES

- 6.1. Potentiel pour augmenter les rendements
 - 6.1.1. Potentiel comme source d'azote
 - 6.1.2. Autres effets favorables
 - 6.1.3. Effets sur le rendement en riz
- 6.2. Utilisation actuelle, facteurs limitants, et perspectives

7. CONCLUSION

8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

*Roger PA (1993) les biofertilisants fixateurs d'azote en riziculture: potentialites, facteurs limitants et perspectives d'utilisation. Pages 327-348 in M. Raunet (ed.) Bas-fond et riziculture. Cirad CA BP 5035 34032, Montpellier cedex, France. 518 pages.

RESUME

La monoculture traditionnelle du riz a pu être pratiquée sans apport d'engrais azoté pendant des siècles en produisant, sans dégradation de la fertilité des sols, des rendements modestes (1-3 t ha⁻¹) mais constants. Ceci indique que l'azote exporté par les cultures est remplacé par différents mécanismes parmi lesquels la fixation biologique de l'azote est considérée comme étant le plus important. Les bilans de l'azote dans des sols de rizières non fertilisés varient de 19 à 98 kg N ha⁻¹ par cycle cultural. Les engrais verts fixateurs de N₂ (*Azolla* et légumineuses) ont été utilisés pendant des siècles dans certains pays rizicoles. Les recherches sur l'utilisation des fixateurs libres, cyanobactéries et bactéries hétérotrophes, se sont développées à partir de 1950.

L'article présente les estimations du potentiel azoté des principaux systèmes fixateurs de N₂ des rizières et fait le point sur leur potentiel d'utilisation dans les systèmes culturaux modernes.

La fixation de N₂ hétérotrophe a un potentiel bas, fréquemment inférieur à 10 kgN ha⁻¹. Les résultats des expériences d'inoculation avec des bactéries fixatrices de N₂ sont inconsistants et n'ont pas mis en relation l'augmentation du rendement avec celle de l'activité fixatrice de N₂ ou du bilan de l'azote. Les souches inoculées disparaissent généralement rapidement et ne se multiplient pas. Les connaissances actuelles ne permettent pas d'envisager actuellement l'utilisation pratique de l'inoculation bactérienne en riziculture. Par contre, la sélection de variétés de riz qui favorisent le développement d'une flore fixatrice de N₂ est une approche récente qui mérite d'être approfondie.

Les cyanobactéries fixatrices de N₂ ont un potentiel modeste estimé à 20-30 kg N ha⁻¹ par cycle cultural. Elles sont ubiquistes dans les sols de rizières. Les souches étrangères inoculées dans un sol ne s'y établissent généralement pas. L'apport de P, l'enfouissement de l'engrais azoté, et le contrôle des prédateurs des algues permettent un développement conséquent de la flore autochtone fixatrice de N₂ et sont généralement suffisants pour exprimer le potentiel azoté des cyanobactéries. Toutefois, le coût de ces pratiques est généralement supérieur au bénéfice obtenu. L'inoculation par des souches autochtones présente un potentiel certain dans les agro-écosystèmes favorables au développement des cyanobactéries à condition qu'elle permette d'accélérer le développement de la flore autochtone sans nécessiter d'apport supplémentaire de phosphore ou de pesticides. Les conditions de sol, de climat, et de pratiques culturales qui doivent être réunies pour obtenir un tel résultat limitent le potentiel d'utilisation de cette technique à un faible pourcentage des rizières.

Azolla s'est révélée comme étant un biofertilisant efficace en Chine et au Vietnam. Son potentiel azoté (30 à 60 kg N ha⁻¹ par cycle cultural) est similaire à celui des légumineuses utilisées comme engrais vert, mais contrairement à ces dernières, *Azolla* présente l'avantage d'être facile à incorporer et de croître en même temps que le riz. Les facteurs édaphiques et nutritionnels qui limitent son utilisation peuvent être partiellement contournés par la sélection variétale, l'hybridation et la recombinaison de souches. Les facteurs limitants majeurs sont des facteurs socio-économiques dont l'effet va probablement aller en s'accroissant ainsi que le montre la très forte récession de l'utilisation d'*Azolla* en Chine et au Vietnam et l'absence de son adoption dans les autres pays rizicoles.

Les légumineuses traditionnellement utilisées comme engrais vert en riziculture peuvent fixer de 50 à 80 kg N ha⁻¹. Malgré ce potentiel, une diminution presque totale de l'utilisation des engrais verts a été observée dans les pays rizicoles au cours des dernières décennies. Les raisons sont principalement socio-économiques. Les engrais verts ne sont pas attractifs parce qu'ils ne sont ni des cultures vivrières ni des cultures de rapport. Lorsque l'engrais azoté minéral est disponible, son prix de revient est généralement inférieur à celui d'un engrais vert. Les situations où l'engrais minéral n'est pas disponible se rencontrent principalement avec des exploitations autarciques de petite taille dans lesquelles le fermier préfère une culture de rapport ou de subsistance à un engrais vert. La découverte de légumineuses à nodules caulinaires résistantes à la submersion a ravivé l'intérêt des chercheurs pour les engrais verts en riziculture. Parmi les 25 espèces connues, *Sesbania rostrata* et *Aeschynomene afraspera* sont considérées comme les plus prometteuses. Elles peuvent accumuler de 40 à 225 kg ha⁻¹. Cependant, la plupart des facteurs socio-économiques qui limitent l'utilisation des engrais verts traditionnels, limiteront également celle des légumineuses à nodules caulinaires.

La fixation biologique de l'azote a permis une production constante à long terme dans les systèmes rizicoles traditionnels à faible productivité. Par contre, son utilisation dans une agriculture à forte productivité se heurte à de nombreux problèmes technologiques et socio-économiques. Dans le cas des fixateurs libres (hétérotrophes et cyanobactéries), un potentiel azoté bas ou modéré ainsi que des problèmes technologiques (en particulier l'absence d'établissement des souches inoculées), empêchent le développement de méthodes technologiquement et économiquement rentables. Dans le cas des engrais verts (*Azolla* et légumineuses), le potentiel azoté des systèmes est suffisant mais leur utilisation est sévèrement limitée par des facteurs socio-économiques.

1. INTRODUCTION

Le riz est la troisième céréale mondiale en termes de volume de production (468 millions de tonnes par an), mais la première en termes de consommation alimentaire humaine. Il constitue la base du régime alimentaire de près de la moitié de la population mondiale. Ce n'est généralement pas une culture de rapport et moins de 5 % de la production mondiale est commercialisé sur le marché international. Dans la majorité des pays rizicoles, le rapport entre le prix international de l'engrais et celui du riz est élevé; ce qui explique que la recherche de sources d'azote bon marché soit une préoccupation constante de ces pays.

D'ici l'année 2020, une augmentation de la production rizicole mondiale de 300 millions de tonnes (environ 60% de la production actuelle) sera nécessaire pour assurer les besoins alimentaires de la population du globe. Cet accroissement de production sera obtenu principalement en augmentant le rendements sur les surfaces cultivées car la majorité des agro-écosystèmes favorables à la riziculture est déjà plantée en riz. Les méthodes utilisées devront augmenter les rendements sans hypothéquer les potentialités de production à long terme (ce concept est exprimé en anglais par le terme de "sustainability"). En particulier, il est généralement admis que les techniques employées devront éviter l'utilisation intensive d'engrais azotés de synthèse et de pesticides (IRRI, 1990).

Il est évident que l'augmentation de la production rizicole ne pourra se faire sans une augmentation globale de l'utilisation des engrais azotés de synthèse. Toutefois une augmentation simultanée de l'utilisation de la fixation biologique de l'azote (qui fournit 60% de l'azote réintroduit dans la biosphère) semble être une solution de bon sens (Postgate 1989), bien que les techniques de gestion microbiologique des sols de rizière soient loin d'être maîtrisées aussi bien sur le plan technologique que sur le plan économique (Roger et al. 1991).

Cet article se propose de faire le point sur l'utilisation des organismes fixateurs de N_2 (biofertilisants) en riziculture inondée. Après avoir résumé les caractéristiques principales de la fixation biologique de l'azote dans les rizières, il considère pour chacun des grands groupes de fixateurs de N_2 : leur potentialité pour augmenter les rendements, le statut de leur utilisation, leurs facteurs limitants et leurs perspectives d'utilisation en fonction des résultats récents de la recherche.

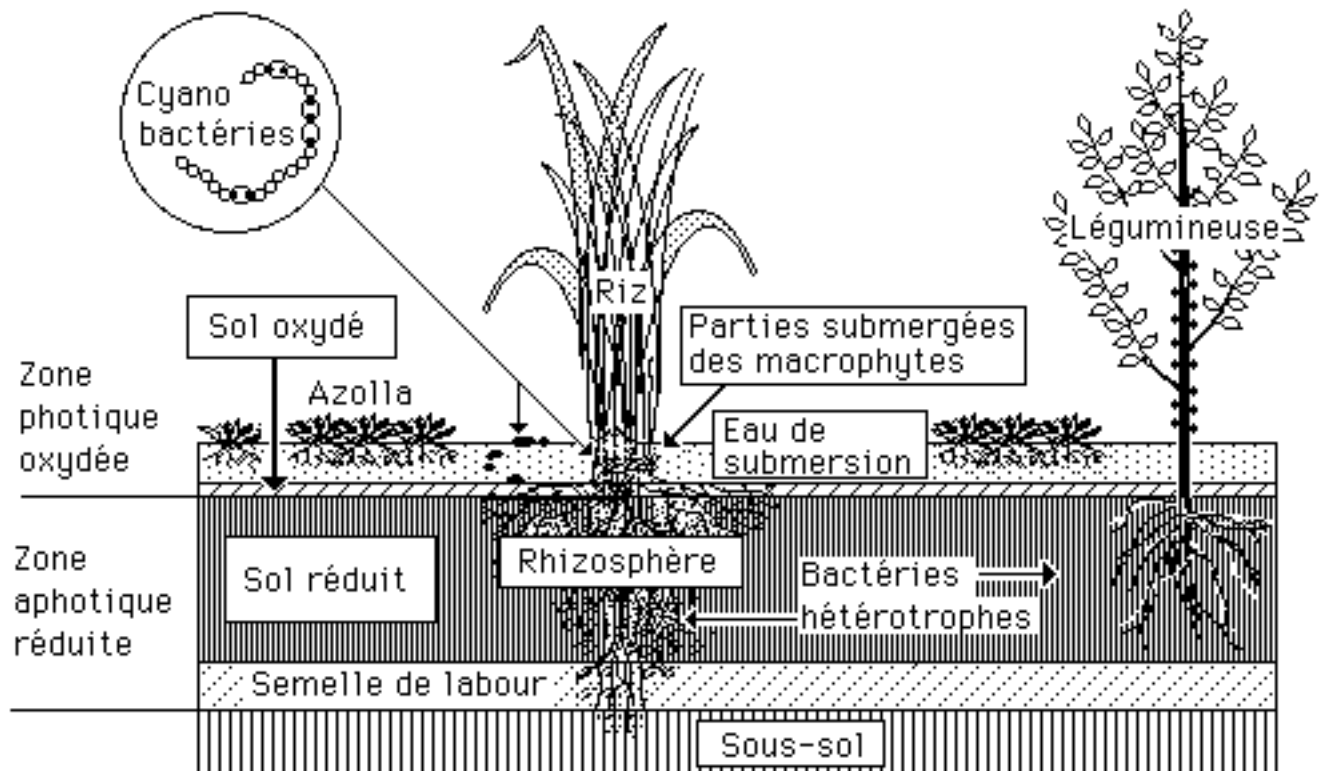


Figure 1. Schéma synthétique des principaux macro-environnements d'une rizière submergée et des principaux organismes fixateurs de N_2 .

2. CARACTERISTIQUES GENERALES DE LA FIXATION DE N₂ DANS LES RIZIERES ET DE SON UTILISATION AGRONOMIQUE.

Les rizières traditionnelles inondées sont caractérisées par une productivité stable à long terme. A l'opposé des autres céréales pour lesquelles la monoculture continue en sol exondé aboutit rapidement à une dégradation de la fertilité du sol et une baisse de rendement, la monoculture continue du riz en sol submergé a pu être pratiquée, parfois pendant des siècles, en obtenant des rendements modestes (1-2 t ha⁻¹) mais constants et sans effets néfastes sur les sols (Bray 1986). Ceci s'explique par un effet positif de la submersion sur la conservation de la fertilité azotée des sols (Watanabe et al. 1988). En particulier, la submersion conduit à la formation de macro et micro-environnements qui diffèrent par leur potentiel redox, leurs propriétés physiques, leur éclaircissement, et leurs propriétés trophiques (Fig. 1). Ceci permet à tous les groupes d'organismes fixateurs de N₂ de trouver des niches favorables à leur développement dans les rizières. Ces organismes comprennent:

- les bactéries photosynthétiques et les cyanobactéries, organismes indigènes qui se développent dans la zone photique de la rizière (eau de submersion, interface sol-eau et parties submergées du riz et des macrophytes aquatiques),
- les bactéries hétérotrophes indigènes présentes dans le sol et la rhizosphère du riz et
- Azolla et les légumineuses, plantes introduites et utilisées comme engrais vert.

Plusieurs revues bibliographiques faisant le point sur la fixation biologique de l'azote dans les rizières ont été publiées au cours de la dernière décade (Buresh et al. 1980, Lowendorf 1980, Watanabe & Roger 1984, Roger & Watanabe 1986). Des revues bibliographiques plus spécifiques, orientées sur les rizières et les sols submergés, ont porté sur les progrès méthodologiques de la mesure de la fixation de N₂ (Roger et Ladha 1992), les fixateurs de N₂ hétérotrophes (Yoshida & Rinaudo 1982), la fixation de N₂ associée avec la décomposition des pailles (Ladha & Bonkerd 1988), les différences entre variétés de riz dans l'aptitude à stimuler la fixation associative de N₂ (Ladha et al. 1988a), les cyanobactéries (Roger et Kulasooriya 1980, Roger 1991), Azolla (Watanabe 1982) et les légumineuses utilisées comme engrais vert en riziculture (Ladha et al. 1988b). Une revue récente présente les divers aspects de la gestion microbiologique des rizières submergées (Roger et al. 1991).

2.1. ESTIMATION DU POTENTIEL FIXATEUR DE N₂ DES SOLS DE RIZIERE

Les bilans d'azote classiques dans des expériences de longue durée *in situ* ou dans des expériences sur un ou plusieurs cycles culturaux en vases de végétation permettent d'estimer le potentiel fixateur des sols de rizière. Toutefois, ces bilans ne prennent pas en compte les pertes d'azote par volatilisation, dénitrification et lessivage, et fournissent des valeurs par défaut.

Le tableau 1 résume les résultats d'une étude bibliographique qui a analysé 211 bilans de l'azote dans des sols de rizières (Roger et Ladha, 1992). Les valeurs s'échelonnent entre -102 et +171 kgN ha⁻¹ par cycle cultural et ont une moyenne de 24 kgN ha⁻¹ (Tableau 1 a). Quatre-vingt-dix pour cent des valeurs sont comprises entre -60 et +90 kgN ha⁻¹ par cycle cultural (Tableau 1 b). Les valeurs extrêmes correspondent à des études effectuées en pot durant un seul cycle (Willis & Green 1948) alors que les autres valeurs correspondent à des mesures sur trois à six cycles successifs.

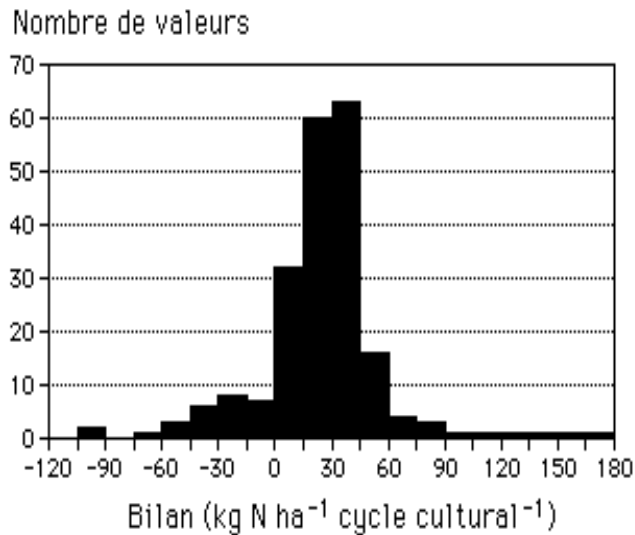
Le bilan azoté est influencé de façon significative par l'apport d'engrais, la présence de riz et l'exposition du sol à la lumière (Tableau 1 c).

On observe un bilan positif moyen d'environ 30 kgN ha⁻¹ par cycle cultural en l'absence d'engrais azoté. Ceci indique que le potentiel moyen de la fixation biologique de N₂ dans les rizières traditionnelles est suffisant pour assurer à long terme une production de l'ordre de 1,5 t ha⁻¹ (en admettant qu'à plus ou moins long terme la totalité de l'azote fixé est absorbé par le riz et que 50 kg de grains sont produits par kg d'azote absorbé par la plante). Le bilan devient pratiquement négligeable (4 kgN ha⁻¹ par cycle cultural) en présence d'engrais azoté (Tableau 1 c) ce qui traduit les deux phénomènes connus d'inhibition de la fixation biologique de N₂ par l'azote minéral et de pertes d'engrais azoté par volatilisation (Roger et al. 1987a). On observe également une corrélation négative hautement significative ($p = 0,01$) entre la quantité d'azote minéral ou d'azote total appliquée et le bilan de l'azote (Tableau 1 d). Le niveau de signification plus faible de la corrélation dans le cas de l'azote organique ($p = 0,05$) est en accord avec l'observation que l'azote organique est moins sensible aux pertes que l'azote minéral.

La comparaison des valeurs moyennes du bilan azoté dans des sols non fertilisés exposés ou non à la lumière (Tableau 1 c) indique que la fixation de N₂ hétérotrophe contribue pour environ 1/3 au bilan et la fixation photo-dépendante pour environ 2/3.

Tableau 1. Etude bibliographique du bilan de l'azote dans les sols de rizière***1a. Caractéristiques statistiques de l'ensemble des données:**

Nombre de valeurs: 211	Unité: kgN ha ⁻¹ par cycle cultural
Minimum: -102	Maximum: 171
Moyenne: 24,2	Médiane: 27.0
Ecart-type: 33,1	Coefficient de variation: 136 %

1 b. Histogramme des valeurs.**1 c. Effet de différent facteurs sur le bilan de l'azote**

Facteur	Nombre d'observations	Moyenne (kgN/ha par cycle)	Ecart type	Niveau de signification de la différence
Application d'engrais azoté				
-	166	29,7	25,4	1%
+	45	4,0	47,6	
Présence de riz				
+	193	26,5	30,7	1%
-	18	-0,5	46,2	
Exposition du sol à la lumière (ensemble de toutes les données)				
+	197	25,0	33,9	non significatif
-	14	13,2	13,8	
Exposition du sol à la lumière (sols sans application d'engrais azoté)				
+	152	31,2	25,7	1%
-	14	13,2	13,8	

1 d. Corrélation entre la quantité d'engrais azoté apportée dans le sol et le bilan de l'azote:

Engrais azoté de synthèse:	$r = -0,320$ (significatif à 1%)
Engrais azoté organique:	$r = -0,157$ (significatif à 1%)
Engrais azoté de synthèse et organique:	$r = -0,365$ (significatif à 1%)

* D'après Roger & Ladha (1992). Les valeurs analysées proviennent de travaux *in situ* et en vase de végétation par les auteurs suivants: Ando 1975; App et al. 1980, 1984, 1986; De & Sulaiman 1950; Firth et al. 1973; Greenland & Watanabe 1982; Inatsu & Watanabe 1969; Konishi & Seino 1961, Koyama & App 1979; Santiago-Ventura et al. 1986; Singh & Singh 1987; Trolldenier 1987; Willis & Green 1948. Les valeurs obtenues dans des expériences en pot ont été extrapolées en kg N ha⁻¹ cycle cultural⁻¹ sur la base de la surface du sol dans les pots.

Les références bibliographiques de ces travaux sont citées dans Roger & Ladha (1992)

2.2. HISTORIQUE DE L'UTILISATION DE LA FIXATION DE N₂ EN RIZICULTURE

La technologie la plus ancienne faisant usage des organismes fixateurs de N₂ en riziculture est celle des engrais verts: légumineuses et Azolla.

Azolla est une symbiose entre une fougère aquatique et une cyanobactérie fixatrice de N₂ dont l'utilisation remonte au 11^{ème} siècle au Vietnam et au moins au 14^{ème} siècle en Chine (Lumpkin and Plucknett, 1982). La nature symbiotique d'Azolla et l'identification du symbiote fixateur de N₂ remontent au 19^{ème} siècle (Strasburger 1873), par contre les progrès concernant l'amélioration des souches et en particulier l'hybridation sexuelle et la recombinaison sont extrêmement récents (Wei et al. 1986, Lin et al., 1988, Lin and Watanabe 1988).

Le potentiel agronomique des cyanobactéries a été mis en lumière en 1939 par De qui a attribué la fertilité des sols de rizière à la fixation biologique de N₂ par ces organismes. Les recherches sur l'inoculation algale des rizières ont été initiées au Japon en 1951 par Watanabe et ses collaborateurs.

Bien que la présence de bactéries hétérotrophes fixatrices de N₂ ait été mise en évidence dès 1929 par Sen, ce n'est qu'en 1971 que des études au moyen de la méthode de réduction de l'acétylène par Rinaudo & Dommergues et Yoshida & Ancajas ont montré une activité fixatrice de N₂ associée aux racines de riz. Les premiers essais d'inoculation ont été présentés par Dobereiner & Ruschel (1962) avec *Beijerinckia* et par Sundara et al. (1962) avec *Azotobacter*. Toutefois, la majeure partie des études d'inoculation a été effectuée depuis 1976.

Les recherches sur la fixation hétérotrophe ont récemment mis en évidence l'existence de différences entre variétés de riz au niveau de la promotion de la fixation associée avec la rhizosphère. Cela suggère la possibilité de sélectionner des variétés ayant un potentiel fixateur de N₂ accru.

Les chapitres suivants considèrent chez ces différents groupes de fixateurs, les potentialités pour augmenter les rendements, le statut de leur utilisation, les facteurs limitants et les perspectives d'utilisation en fonction des résultats récents de la recherche.

3. FIXATEURS DE N₂ HÉTÉROTROPHES

3.1. POTENTIEL POUR AUGMENTER LES RENDEMENTS

3.1.1. Potentiel comme source d'azote

Les valeurs extrapolées de la fixation hétérotrophe totale estimées par App et al. (1986) dans des pot couverts avec du tissu noir afin d'inhiber la fixation photo-dépendante, ont une moyenne de 7 kg N ha⁻¹ cycle cultural⁻¹ en sol non fertilisé. Avec des sols ayant reçu de l'engrais azoté, Trolldenier (1987) a trouvé une corrélation négative entre la quantité d'engrais appliquée et la balance azotée dont la valeur moyenne était 19 kg N ha⁻¹ cycle cultural⁻¹ avec l'application de 65 kg N ha⁻¹, -0,3 avec 112 kg N ha⁻¹, et -14 avec 146 kg N ha⁻¹. En utilisant la méthode de dilution isotopique et l'azote assimilable d'un sol marqué à l'¹⁵N et stabilisé comme contrôle, Zhu et al. (1984) ont montré que lorsque la fixation photo-dépendante était éliminée et qu'aucun engrais azoté n'était apporté, la fixation hétérotrophe produisait 16-21 % de l'azote du riz, soit 11-16 kg N ha⁻¹ cycle cultural⁻¹.

Les estimations de la fixation hétérotrophe associée avec le riz au cours d'un cycle cultural, calculées en utilisant les valeurs de mesure d'acétylène réalisées à la montaison lorsque l'ARA est maximale et en admettant que cette activité dure pendant environ 50 jours, correspondent à 1-5 kg N ha⁻¹ cycle cultural⁻¹ (Roger & Watanabe 1986). Les extrapolations à partir d'expériences d'incorporation de ¹⁵N sont comprises entre 1,3 et 7,2 kg ha⁻¹ cycle cultural⁻¹ (Roger & Watanabe 1986). L'existence de différences entre les variétés de riz dans leur aptitude à promouvoir la fixation hétérotrophe a été montrée par des bilans de l'azote dans des expériences en pot (App et al. 1986) et des mesures d'activité réductrice d'acétylène (Ladha et al. 1987, 1988a).

Les valeurs de fixation de N₂ associée avec la décomposition de paille répertoriées par Roger & Watanabe (1986) varient entre 0,1 et 7 mg N fixé g⁻¹ paille appliquée (moyenne 2,1) en 30 jours. Toutefois ces auteurs indiquent que les conditions de ces études correspondent à une situation de compostage et non à la situation au champ car les quantités de pailles utilisées (1 à 100% du poids sec de sol, moyenne: 22%) sont très supérieures à celles incorporées *in situ*, toujours inférieures à 1%. L'application de pailles peut également augmenter la fixation de N₂ photo-dépendante (Ladha & Bonkerd 1988). Des mesures semi-quantitatives et des expériences de laboratoire suggèrent que l'incorporation de paille permet de fixer environ 2-4 kg N t⁻¹ de paille épandue ou incorporée.

Ces données indiquent que parmi les différents systèmes fixateurs de N₂ présents ou introduits dans les rizières, les bactéries hétérotrophes ont le potentiel le plus faible (Tableau 2).

Tableau 2. Fourchette des estimations de l'azote fixé par différents organismes dans les rizières (kg N ha⁻¹ cycle cultural⁻¹) et maximum théorique (valeur et hypothèses de calcul).

Organisme	Valeurs rapportés	Maximum théorique et hypothèses de calcul
Fixation associative dans la rhizosphère du riz	1-7 kg N ha ⁻¹ par cycle cultural	40 kg N ha ⁻¹ par cycle cultural <ul style="list-style-type: none"> • Toutes les bactéries rhizosphériques sont fixatrices, • Le flux de C dans la rhizosphère est de 1 t ha⁻¹ par cycle cultural et 40 mg N sont fixé par g de C
Fixation hétérotrophe associée avec la décomposition des pailles	2-4 kg N par tonne de paille	35 kg N ha ⁻¹ par cycle cultural <ul style="list-style-type: none"> • application de 5 tonnes de paille par ha • 7 mg N est fixé par gramme de paille.
Fixation hétérotrophe totale	1-31 kg N ha ⁻¹ par cycle cultural	60 kg N ha ⁻¹ par cycle cultural <ul style="list-style-type: none"> • La totalité du flux de carbone dans le sol (2 t par cycle cultural) est utilisée par des fixateurs de N₂.
Cyanobactéries	0-80 kg N ha ⁻¹ par cycle cultural	70 kg N ha ⁻¹ par cycle cultural <ul style="list-style-type: none"> • La biomasse photosynthétique aquatique est composée uniquement de cyanobactéries fixatrices (C/N = 7) et la production primaire est de 0,5 t C ha⁻¹ par cycle cultural
Azolla	20-140 kg N ha ⁻¹ par cycle cultural (études en parcelles expérimentales) 10-50 kg N ha ⁻¹ par cycle cultural (études in situ, en vraie grandeur)	224 kg N ha ⁻¹ par cycle cultural <ul style="list-style-type: none"> • la biomasse maximale d'une culture d'<i>Azolla</i> correspond à 140 kg N ha⁻¹, • deux cultures d'<i>Azolla</i> sont effectuées par cycle cultural de riz • 80% de l'azote d'<i>Azolla</i> est de l'azote fixé
Légumineuses utilisés en engrais vert	20-260 kg N ha ⁻¹ par cycle cultural	260 kg N ha ⁻¹ en 55 jours <ul style="list-style-type: none"> • <i>Sesbania rostrata</i> est utilisée comme engrais vert • 290 kg N ha⁻¹ sont accumulés en 50-60 jours • 90% de l'azote de <i>Sesbania</i> est de l'azote fixé

*d'après Roger & Ladha 1992

3.1.2. Potentiel estimé à partir des expériences d'inoculation

Le tableau 2 présente une analyse de 210 essais d'inoculation bactérienne du riz rapportés dans 23 articles. La majorité de ces études portent uniquement sur la comparaison des rendements en grain et en paille. L'absence de données sur l'établissement des souches et de la fixation de N₂ rend l'interprétation des résultats hypothétique.

Le rendement en grain calculé sur l'ensemble des résultats est supérieur de 20% dans les traitements inoculés. Toutefois les résultats sont extrêmement variables, avec une fourchette allant de -33% à +125% (Tableau 3). L'effet moyen de l'inoculation dans les expériences en pot (+27,6%, 87 valeurs) est significativement plus élevé que celui dans les expériences *in situ* (+14,4%, 123 valeurs).

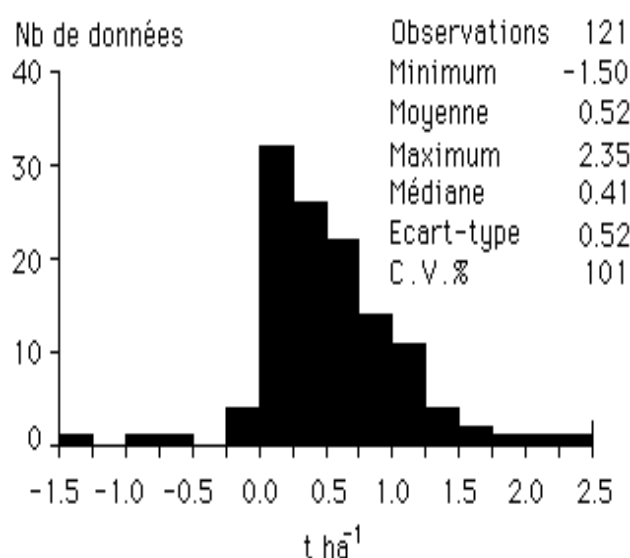
L'augmentation de rendement de 14,4 % dans les expériences *in situ* est très proche de la différence minimum détectable avec le dispositif expérimental le plus couramment employé dans les expériences au champ (14,5% pour des parcelles de 16 m² et 4 répétitions) (Gomez 1972). Ceci indique que les résultats d'expériences présentés sans analyse statistique doivent être interprétés avec précaution. La distribution des différences de rendement entre parcelles inoculées et parcelles non inoculées est dissymétrique (Tableau 3). Elle montre une quasi absence de valeurs négatives, un mode correspondant à la première classe positive, et une forme générale correspondant à la moitié droite d'une distribution gaussienne centrée sur le zéro ! Ceci suggère que les essais infructueux d'inoculation *in situ* n'ont généralement pas été rapportés et invite à une certaine prudence quant à l'interprétation globale des expériences effectuées jusqu'à présent.

Les expériences d'inoculation montrent une augmentation moyenne de rendement similaire pour le grain (14,3%, 123 valeurs) et la paille (15,1%, 51 valeurs) et des indices de récolte (rendement en grain/rendement en paille) similaire dans les parcelles inoculées ou non. Cela suggère que les effets de l'inoculation se produisent dès le début du cycle cultural.

Tableau 3. Analyse de 210 données bibliographiques sur les effets de l'inoculation bactérienne sur les rendements en riz.*

	Rendement en grain			Rendement en paille différence %	Indice de récolte (grain/paille)		Efficacité de l'azote (kg grain/kg N)	
	contrôle t/ha	différence t/ha	%		Contrôle	Inoculé	Contrôle	Inoculé
Ensemble des données (123 expériences <i>in situ</i> , 87 expériences en pot)								
Moyenne	4,0	0,5	19,8	15,9	0,66	0,69	18,7	19,1
Ecart type	1,6	0,5	25,0	16,2	0,20	0,22	17,1	13,7
Maximum	11,1	2,4	125,0	66,7	1,12	1,20	78,0	54,7
Minimum	1,0	-1,5	-32,6	-20,9	0,10	0,10	-20,0	-12,0
Nb de données	121	121	210	130	130	130	60	59
Expériences <i>in situ</i> (123)								
Moyenne	4,0	0,5	14,3	15,1	0,57	0,57	18,7	19,1
Ecart type	1,6	0,5	14,1	14,9	0,17	0,17	17,1	13,7
Maximum	11,1	2,3	59,6	64,8	0,86	0,88	78,0	54,7
Minimum	1,0	-1,5	-25,0	-7,5	0,25	0,25	-20,0	-12,0
Nb de données	121	121	123	51	51	51	60	59
Inoculation avec <i>Azotobacter</i> (40 expériences <i>in situ</i> , 18 expériences en pot)								
Moyenne	3,9	0,4	16,6	13,3	0,52	0,54	18,5	17,0
Ecart type	1,6	0,5	20,4	15,5	0,20	0,21	18,9	12,3
Nb de données	40	40	58	28	28	28	26	23
Inoculation avec <i>Azospirillum</i> (83 expériences <i>in situ</i> , 11 expériences en pot)								
Moyenne	4,1	0,6	15,2	16,0	0,62	0,62	18,8	21,4
Ecart type	1,7	0,5	18,3	13,3	0,21	0,21	16,0	14,8
Nb de données	81	81	94	45	45	45	34	33
Inoculation avec d'autres bactéries (58 expériences en pot)								
Moyenne			30,6	17,1	0,75	0,81		
Ecart type			34,2	18,5	0,15	0,15		
Nb de données	néant	néant	58	57	57	57	néant	néant

Histogramme des différences de rendement entre parcelles non inoculées et parcelles inoculées



* D'après Roger et al. 1991. Les données analysées proviennent des articles suivants: Balasubramanian & Kumar 1987; Balasundaram & Sen 1971; Charyulu et al. 1985; Gopaldaswami & Vidhyasekaran 1987a & b; Jalapati Rao et al. 1977; Jeyaraman & Purushothaman 1988; Kannaiyan et al. 1980; Kavimandan 1986; Kundu & Gaur 1984; Maskey 1976; Nayak et al. 1986; Omar et al. 1989; Patil et al. 1976; Prasad N.N. 1986; Prasad J. 1987; Raman Rai 1985; Rajagopalan & Rangaswamy 1988; Rajaramamohan 1983; Subba Rao et al. 1979; Watanabe & Lin 1984. Les références bibliographiques de ces travaux sont citées dans Roger et al. 1991.

Tableau 4. Utilisation par le riz de l'azote de biofertilisants épandus où enfouis.

-----Matériel étudié-----		Faune ^a	Dispositif	N absorbé (%)		Référence
Nature	Etat			Epandu	Enfoui	
cyanobactéries						
cyanobactéries	frais	?	pot	37	52	Wilson et al. 1980
" "	sec	-	pot	14	28	Tirol et al. 1982
" "	sec	+	<i>in situ</i>	23	23	" "
" "	frais	-	pot	-	38	" "
" "	frais	-	pot	24	44	Grant & Seegers 1985
" "	frais	+	pot	25	30	" "
" "	sec	-	pot	-	35-40	Mian et Stewart 1985
Moyenne				25	36	
Macrophytes aquatiques						
<i>Eichornia</i> sp.	frais	+	<i>in situ</i>	-	25	Shi et al. 1980
<i>Azolla pinnata</i>	frais	+	<i>in situ</i>	-	26	Watanabe et al. 1981
<i>A. caroliniana</i>	frais	+	<i>in situ</i>	12/14	26	Ito et Watanabe 1985
<i>A. caroliniana</i>	sec	?	pot	-	34	Mian & Stewart 1985
<i>A. caroliniana</i>	frais	+	<i>in situ</i>	-	32	Kumarasinghe et al. 1986
Moyenne				13	29	
Légumineuses						
<i>Sesbania rostrata</i>	frais	+	<i>in situ</i>	---	32	Biswas 1988
" "	frais	+	<i>in situ</i>	---	49	Biswas 1988
" "	frais	+	<i>in situ</i>	---	42	Diekmann et al. 1991
<i>Aeschynomene</i>	frais	+	<i>in situ</i>	---	47	Diekmann et al. 1991
<i>afraspera</i>	frais	+	<i>in situ</i>	---	40	Diekmann et al. 1991
Moyenne					42	

a : + : présente dans le sol ; - : absente du sol utilisé

La comparaison des résultats obtenus avec *Azotobacter* (+16.6%) et *Azospirillum* (+15.2%) ne montre pas de différence significative (Tableau 3). L'augmentation de rendement plus élevée observée avec les autres microorganismes est sans doute attribuable à l'expérimentation en pot.

Les effets bénéfiques de l'inoculation bactérienne peuvent être attribués à quatre processus:

- (1) fixation de N₂ accrue dans la rhizosphère
- (2) production de régulateurs de croissance qui améliorent la croissance du riz
- (3) disponibilité accrue d'éléments nutritifs due à leur solubilisation par les bactéries inoculées
- (4) compétition entre les bactéries inoculées avec des pathogènes dans la rhizosphère.

L'importance relative de ces différents processus n'a pas encore été déterminée.

Actuellement il n'existe pas de résultats expérimentaux démontrant une augmentation significative et durable de la fixation de N₂ dans des parcelles ou des pot inoculés permettant d'expliquer une augmentation significative de rendement. Une différence moyenne de rendement de 0,5 t ha⁻¹ demanderait, dans les conditions les plus favorables, l'absorption de 10 kg d'azote par la culture de riz. Cela devrait correspondre à une augmentation moyenne de l'activité fixatrice de N₂ de l'ordre de 30 kg ha⁻¹, étant donné qu'en moyenne 36% de l'azote fixé est absorbé par la plante (Tableau 4). Cette valeur est largement supérieure aux estimations actuelles de la fixation hétérotrophe.

Une autre hypothèse souvent avancée pour expliquer des effets positifs de l'inoculation sur les rendements est la production de régulateurs de croissance par les bactéries inoculées qui augmenterait l'absorption des éléments nutritifs par le riz. Cette hypothèse n'est pas en accord avec l'absence de différence de l'efficacité de l'engrais azoté (kg de grain produit par kg N épandu) observée entre les contrôles (18,7 kg grain par kg N) et les parcelles inoculées (19,1 kg grain par kg N) (Tableau 2).

Il n'existe que peu d'information sur le devenir des souches inoculées dans la rhizosphère du riz. Les estimations des variations des populations bactériennes après inoculation n'ont généralement pas été analysées par des méthodes statistiques mais ces variations sont le plus fréquemment trop faibles pour être significatives (Neelekantan & Rangaswami 1965, Gopalakrishnamurthy et al. 1967, Purushothaman et al. 1976, Watanabe & Lin 1984). Une étude avec une souche marquée d'*Azospirillum lipoferum* a montré la persistance de la souche dans le sol pendant quelques semaines mais pas de multiplication (Nayak et al. 1986). Les populations d'*Azospirillum* indigènes étaient

environ 500 fois plus abondantes que celle de la souche inoculée. Toutefois une augmentation du poids sec des plantes inoculées a été observée.

Les résultats des expériences d'inoculation sont inconsistants. Les augmentations de rendement observées ne sont pas mises en relation avec une augmentation de l'activité fixatrice de N_2 ou du bilan de l'azote. Généralement, les souches inoculées disparaissent rapidement et ne se multiplient pas. Par suite, il est impossible de tirer actuellement des conclusions sur la valeur agronomique de l'inoculation bactérienne en riziculture.

3.2. UTILISATION ACTUELLE, FACTEURS LIMITANTS, ET PERSPECTIVES

Les connaissances actuelles ne permettent pas d'envisager une utilisation pratique de l'inoculation bactérienne en riziculture.

Par contre, la sélection de variétés de riz qui favorisent le développement d'une microflore associée fixatrice de N_2 est une approche récente qui mérite d'être approfondie. L'existence de différences variétales au niveau de la fixation de N_2 hétérotrophe a été montrée par des études utilisant le bilan de l'azote (App et al. 1986), la mesure de l'ARA (Tirol-Padre et al. 1988), et la mesure de l'abondance isotopique de l'azote (Watanabe et al. 1987). Les caractéristiques de la plante associées avec le potentiel pour favoriser la fixation hétérotrophe sont, par ordre d'importance décroissante : le poids sec des racines et des parties submergées de la plante à la montaison, le poids sec des parties aériennes à la montaison et l'azote absorbé à maturité (Ladha et al. 1988a). En utilisant ces caractéristiques et des mesures d'ARA, Ladha et al. (1988a) ont établi un classement de 21 variétés de riz qui s'est révélé relativement reproductible lors de deux cycles culturaux de saison sèche. Toutefois les bases physiologiques de ces différences variétales sont encore inconnues. La condition préalable à la sélection de variétés à potentiel fixateur élevé est la mise au point d'une technique de criblage rapide (la collection mondiale de riz contient plus de 80 000 accessions !). La méthode de réduction de l'acétylène est très lente et ne permet pas de tester simultanément un grand nombre de variétés (Tirol-Padre et al., 1988). La méthode de dilution isotopique demande l'identification de variétés de référence ayant un potentiel pour stimuler la fixation de N_2 hétérotrophe nul ou très bas.

4. CYANOBACTERIES

4.1. POTENTIEL POUR AUGMENTER LES RENDEMENTS

4.1.1. Potentiel comme source d'azote

Ce potentiel a été estimé par des mesures de fixation de N_2 et de biomasse.

La fixation de N_2 a le plus fréquemment été estimée au moyen de la méthode de réduction de l'acétylène (ARA). Trente huit estimations publiées avant 1980 sont comprises entre 0 et 80 kg N ha⁻¹ par cycle cultural⁻¹ et ont une moyenne de 27 kgN ha⁻¹ (Roger & Kulasoorya 1980). Une étude présentant 190 estimations de la fixation de N_2 (kgN ha⁻¹ par cycle) dans des parcelles soumises à différents niveaux de fertilisation azotée et différentes pratiques culturales (Roger et al. 1988) a montré des activités du même ordre de grandeur, variant de 2 à 50 kg N ha⁻¹ par cycle (Fig. 2). Les valeurs avaient une moyenne de 20 kgN ha⁻¹ dans les parcelles ne recevant pas de fertilisation azotée, de 8 kg lorsque l'engrais azoté avait été épandu dans l'eau de submersion et de 12 kg dans les parcelles où l'engrais azoté avait été enfoui. L'activité fixatrice de N_2 était négligeable dans 3/4 des parcelles où l'azote avait été épandu dans l'eau de submersion (Tableau 6).

Les mesures de biomasse fournissent une estimation par défaut de la fixation par les cyanobactéries des rizières. Etant donné que les espèces fixatrices de N_2 ne prolifèrent généralement que lorsque la concentration en azote soluble de l'eau de submersion est très faible, on peut admettre que la plus grande partie de l'azote accumulé dans la biomasse provient de la fixation de N_2 . Cette hypothèse a été confirmée par une étude de Inubushi & Watanabe (1986) sur sol marqué à l'¹⁵N qui a permis d'estimer que 90% de l'azote des cyanobactéries provenait de la fixation biologique.

Les estimations de biomasse ne prennent pas en compte le turn-over du matériel algair et sous-estiment la fixation. Toutefois la valeur maximale de la biomasse d'une fleur d'eau à cyanobactéries fournit une approximation satisfaisante de l'azote fixé étant donné que, durant la phase de croissance, l'azoté éventuellement excrété est réabsorbé par la biomasse.

La biomasse aquatique photosynthétique présente dans les rizières varie entre quelques kilogrammes et quelque centaines de kg ha⁻¹ de poids sec. Celle des cyanobactéries hétérocystées varie dans les mêmes limites (Roger, 1991). Une teneur moyenne en azote de 3% du poids sec avec

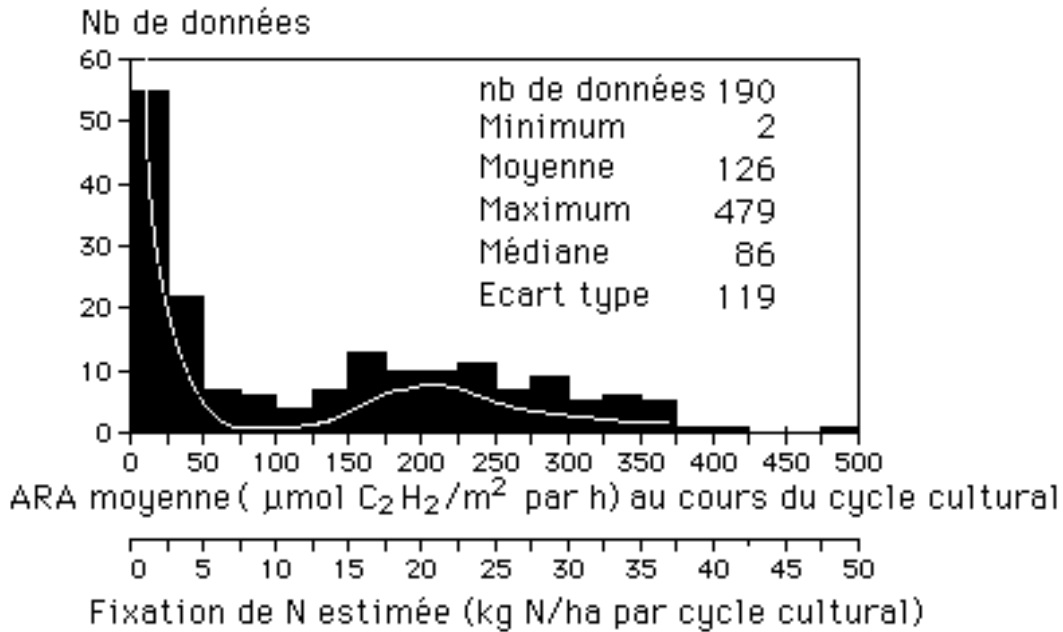


Fig. 2. Distribution de 190 estimations de la valeur moyenne de l'ARA et de l'azote fixé par les organismes photo-dépendants durant un cycle cultural dans des parcelles expérimentales soumises à 26 pratiques culturales différentes (Chaque valeur est la moyenne de 13 mesures au cours d'un cycle cultural, chaque mesure étant effectuée sur 13 carottes comprenant le premier centimètre de sol et l'eau de submersion. La partie gauche de l'histogramme correspond principalement à des parcelles avec épandage d'engrais azoté; la partie droite correspond principalement à des parcelles sans application d'azote ou avec enfouissement de l'azote).

cendres des cyanobactéries collectées *in situ* (Roger et al. 1986) appliquée à la valeur moyenne de la biomasse photosynthétique aquatique (350 kg de poids sec) correspond à environ 10 kg N ha⁻¹. L'étude de biomasses de cyanobactéries récoltées *in situ* (Fig. 3) ou produites en micro-parcelles, et de croûtes algaires prélevées dans des rizières asséchées a confirmé cette extrapolation. Dans la majorité des cas, la biomasse des cyanobactéries hétérocystées correspond à moins de 10 kgN ha⁻¹. Une fleur d'eau particulièrement dense peut correspondre à 10-20 kgN ha⁻¹ (Roger et al. 1987a). Des valeurs supérieures (20-45 kgN ha⁻¹) ont été mesurées uniquement dans des conditions artificielles telles que celles des parcelles utilisées pour la production expérimentale d'inoculum qui reçoivent des apports d'engrais phosphaté importants et des insecticides (Roger et al. 1985). Etant donné qu'au cours d'un cycle cultural on observe rarement le développement de plus de deux fleurs d'eau, 20-30 kgN ha⁻¹ par cycle constituent une estimation raisonnable du potentiel azoté des cyanobactéries.

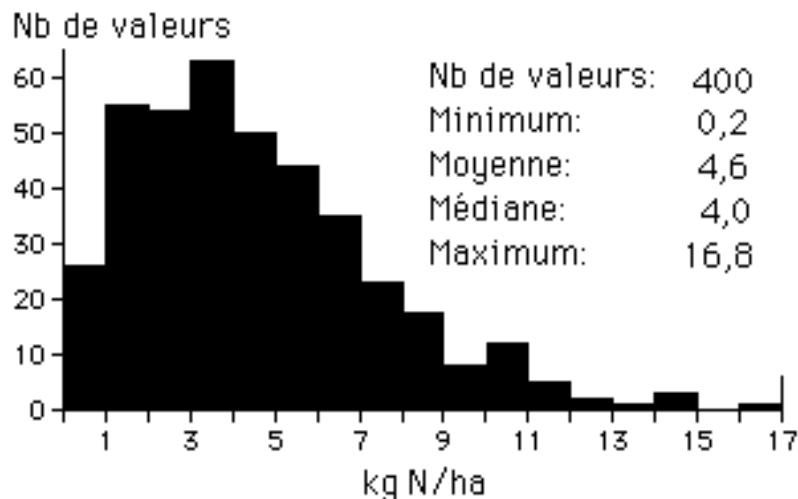


Fig.3. Histogramme de la distribution de 400 estimations de la biomasse des cyanobactéries dans 65 parcelles expérimentales (Roger, Ardales et Jimenez, résultats non publié).

Les méthodes d'estimation du potentiel azoté des cyanobactéries des rizières sont indirectes et imprécises. Toutefois les résultats convergent vers une valeur de l'ordre 20-30 kgN ha⁻¹ par cycle cultural qui indique un potentiel modéré comparé à celui d'*Azolla* ou des légumineuses (Tableau 2).

Les études avec du matériel marqués à l'¹⁵N ont montré que le pourcentage de l'azote des cyanobactéries retrouvé dans la plante variait entre 13 et 50 % (moyenne 30%). Ce pourcentage dépend de la nature du matériel algaire, de la méthode d'application et de la présence ou de l'absence de faune dans le sol (Tableau 4). La valeur maximale a été obtenue avec du matériel frais incorporé dans un sol pauvre en invertébrés (Wilson et al. 1980). La valeur minimale a été obtenue avec du matériel sec placé à la surface d'un sol riche en oligochaetes (Tirol et al. 1982).

4.1.2. Autres effets favorables

Les effets favorables autres que l'apport d'azote attribués aux cyanobactéries et relevés dans la bibliographie par Roger et al. (1991) comprennent:

- un effet malherbicide dû à l'occupation de la surface de l'eau et la compétition,
- l'augmentation de la teneur en matière organique du sol et de l'agrégation du sol,
- l'excrétion d'acides organiques qui solubilisent le P du sol et augmentent sa disponibilité pour le riz,
- la diminution des effets de sulfato-réduction néfastes pour le riz par oxygénation du milieu et augmentation de la résistance de la plante,
- l'augmentation de la température de l'eau qui favorise le tallage et
- la production de substances de croissance. Roger et Kulasooriya (1980) citent 12 articles présentant des expériences *in vitro* ou en pots faisant référence à des effets auxiniques des cyanobactéries sur les plantules de riz. Toutefois l'étude des effets de 133 souches unialgales sur la germination du riz (Pedurand & Reynaud 1987) a montré un effet négatif dans 70% des cas et un effet de stimulation dans seulement 21% des cas. Comme l'ont fait remarquer Metting & Pyne (1986), aucun des nombreux articles faisant référence à des substances de croissance produites par des algues ne présente de résultats démontrant l'isolement et la caractérisation d'une telle substance.

4.1.3. Potentiel estimé à partir des expériences d'inoculation

Les effets de l'inoculation des rizières avec des cyanobactéries ne peuvent être correctement estimés que dans des expériences *in situ* comparant des contrôles (recevant éventuellement des apports d'engrais) avec des traitements ne différant de ces contrôles que par l'apport d'inoculum. En particulier, les expériences en pot surestiment les effets de l'inoculation à cause des populations de prédateurs des algues réduites ou inexistantes, des perturbations climatiques moins marquées, d'un développement accru des cyanobactéries sur les parois du pot et de la quantité importante d'inoculum généralement utilisé. De même, de nombreuses expériences comparant les rendements de parcelles inoculées avec les rendements de parcelles ayant reçu de l'engrais azoté ne permettent pas, contrairement à ce que de nombreux auteurs ont fait, de conclure à un effet des cyanobactéries équivalent à l'apport d'engrais azoté lorsque les rendements des deux traitements ne sont pas significativement différents.

Les expériences d'inoculation publiées avant 1980 et analysées par Roger & Kulasooriya (1980) montrent une augmentation moyenne de rendement en grain de 475 kg ha⁻¹ sur 80 résultats, tandis que la moyenne de 260 expériences publiées entre 1980 et 1987 est significativement plus basse, de l'ordre de 280 kg ha⁻¹ (Roger et al, 1991).

Tableau 5. Analyse de résultats de 259 expériences d'inoculation avec des cyanobactéries publiées entre 1980 et 1987 (d'après Roger 1991).

	Rendement en grain (kg ha ⁻¹)		Différence de rendement (kg ha ⁻¹)
	Contrôle	Traitement inoculé	
Nb de données	259	259	259
Minimum	830	1120	-1060
Maximum	7708	7929	1770
Médiane	3900	4156	203
Moyenne	3898	4175	278
Ecart-type	1245	1250	357
C.V. (%)	32	30	129

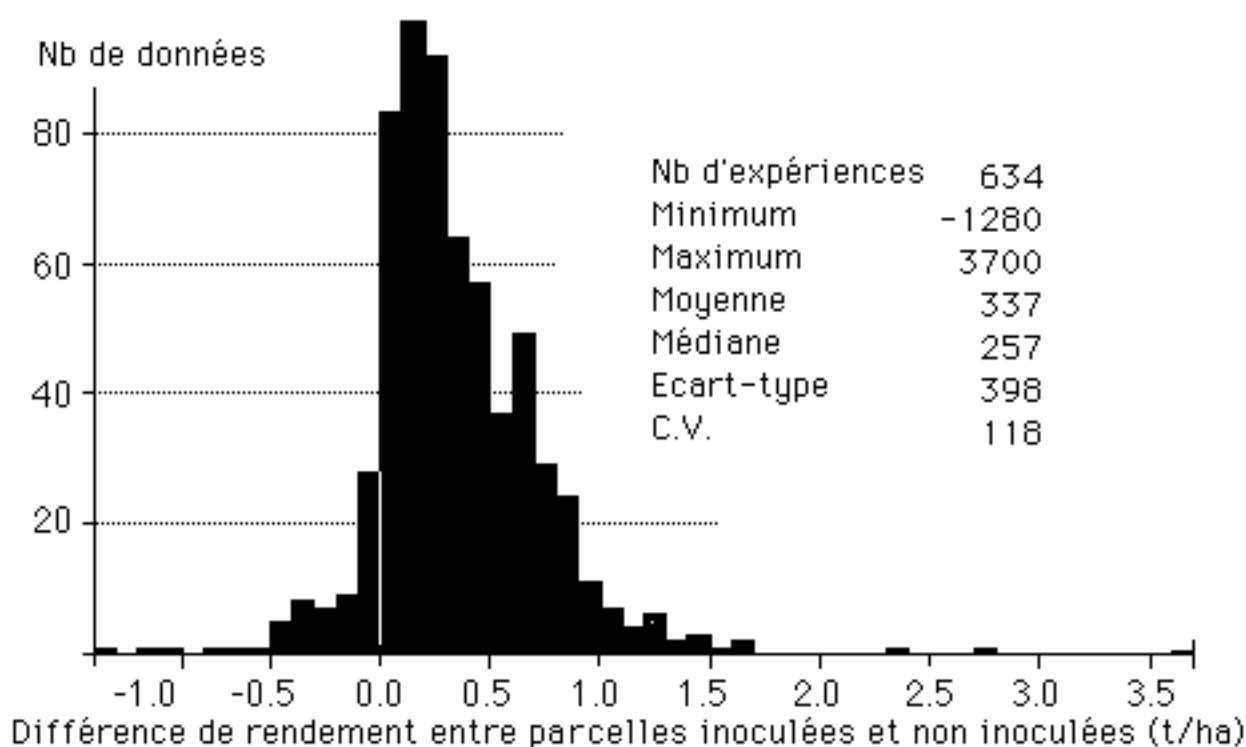


Fig. 4. Histogramme de 634 différences de rendement (t ha⁻¹) entre parcelles inoculées et parcelles non inoculées.

D'après Roger 1991 ; les valeurs proviennent des articles cités par Roger & Kulasooriya (1980) et des articles suivants: Beri & Meelu 1983, Bhuiya et al. 1984, Chandrakar 1983, Gaur & Singh 1982, Hamissa et al. 1979, Huang 1981, Kannaiyan et al. 1982, Patel et al. 1984, Pillai 1980, Ram & Rawat 1984, Ram et al. 1985, Reddy et al. 1986, Roychoudhury et al. 1983, Sarkar & Islam 1984, Singh 1982, Subba Rao 1982, University of Madras 1982, Yanni et al. 1984. Les références bibliographiques de ces travaux sont citées dans Roger 1991.

L'analyse de 634 expériences *in situ* publiées dans des revues scientifiques et dans les rapports de différents organismes de recherche montre une augmentation moyenne de rendement de 350 kg ha⁻¹ dans les traitements ne différant des contrôles que par l'apport d'inoculum (Roger 1991). Toutefois, l'histogramme des différences de rendement entre parcelles inoculées et non inoculées montre une dissymétrie marquée qui provient en grande partie de l'absence de données dans les classes négatives. (Fig. 4). Cela indique que les expériences d'inoculation n'ayant pas montré d'effet positif n'ont généralement pas été publiées. La forme de l'histogramme suggère donc que le mode (200 kg ha⁻¹) est une valeur plus réaliste que la moyenne pour estimer le potentiel moyen de l'inoculation avec des cyanobactéries pour augmenter les rendements en riz. Les différences observées ne sont statistiquement significatives que dans 17 % des cas.

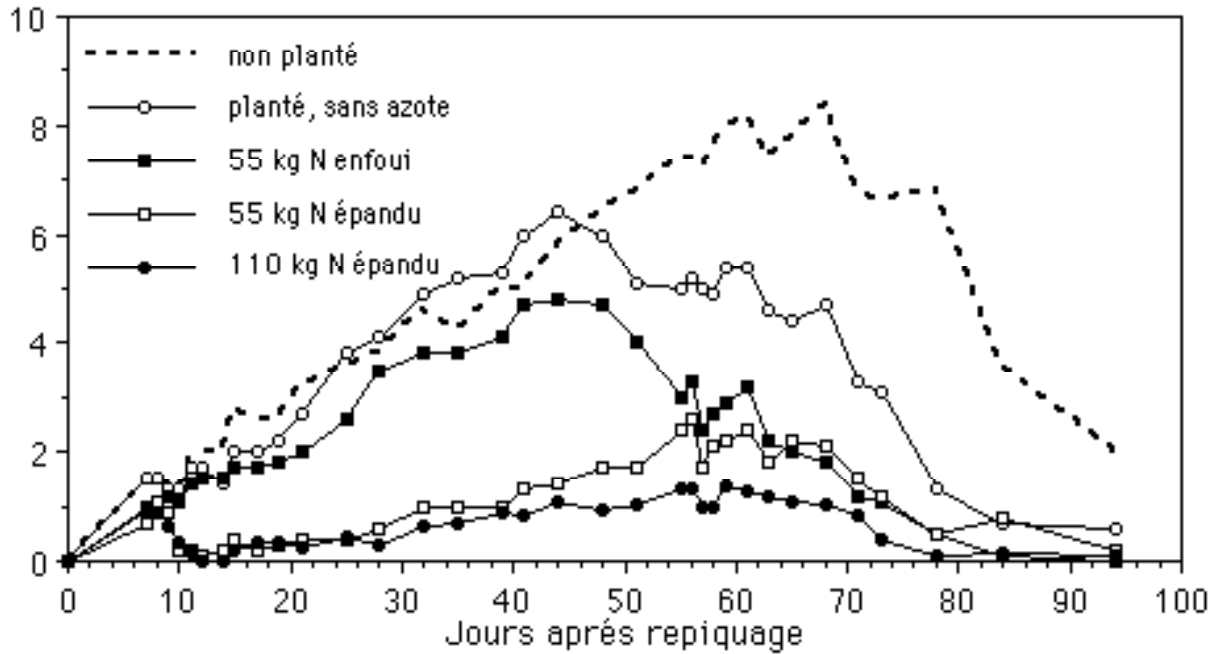
Ces résultats indiquent que l'inoculation algale peut augmenter les rendements en riz. Toutefois les résultats sont très variables et l'augmentation de rendement moyenne obtenue est très modeste et reste le plus souvent inférieure au seuil de détection statistique.

4.2. UTILISATION ACTUELLE, FACTEURS LIMITANTS ET PERSPECTIVES

Les recherches appliquées sur l'inoculation des rizières avec des cyanobactéries ont été effectuées principalement en Inde où un projet spécial (All-India Coordinated Project on Algae) avait été établi en 1977. Des essais ont également été faits en Birmanie, en Egypte et en Chine. La technique la plus fréquente (Venkataraman, 1981) utilise un inoculum composite produit à partir de cultures de laboratoire qui est propagé *in situ* dans des micro-parcelles avec 5-15 cm d'eau, 4 kg de sol m⁻², 100 g de superphosphate m⁻², et des insecticides. Le tapis algale, qui se développe en 2-3 semaines, est séché et concassé pour être utilisé comme inoculum, épandu à raison de 10 kg ha⁻¹.

Les données quantitatives sur l'utilisation de l'inoculation algale sont quelque peu contradictoires, mais même en utilisant les estimations les plus optimistes, cette technique n'est utilisée que dans un faible pourcentage des rizières de quelques états de l'Inde (Tamil Nadu et Uttar Pradesh), de l'Egypte et peut-être de Birmanie. L'adoption très faible de cette technique par les fermiers reflète les effets modestes et imprévisibles de l'inoculation algale sur les rendements en riz.

Indice d'abondance des cyanobactéries fixatrices d'azote*



* 0: absence; 10 couverture totale de l'eau de submersion

Fig. 5. Dynamique de la population de cyanobactéries fixatrices de N₂ au cours d'un cycle culturel en fonction de la méthode de fertilisation azotée (IRRI, 1991).

Le principe même de l'inoculation algale doit être reconsidéré en fonction des connaissances acquises au cours des dernières années à savoir:

- Les cyanobactéries fixatrices de N₂ sont ubiquistes dans les sols de rizières (Roger et al., 1987)
- Les facteurs de l'environnement limitant leur développement sont un pH bas et une faible teneur en P du sol (Roger et al. 1987), et la prédation par des invertébrés aquatiques (Grant et al. 1985),
- L'épandage d'engrais azoté inhibe fortement la fixation de N₂ photodépendante. Le placement en profondeur de l'engrais diminue l'inhibition (Fig. 5 et Tableau 6). Le développement d'une activité fixatrice de N₂ est parfois observé après application d'engrais azoté (Tableau 6) mais indique généralement une mauvaise utilisation de cet engrais par la plante (Fig. 6)
- Les propagules de souches indigènes fixatrices de N₂ présentes dans les rizières sont généralement nettement plus nombreuses que les propagules contenues dans la quantité d'inoculum sec qu'il est recommandé d'appliquer (Roger et al. 1987).
- Les souches étrangères inoculées dans un sol ne s'y établissent généralement pas (Reddy & Roger 1988; Bisoyi & Singh 1988; Reynaud & Metting 1988).

Tableau 6. Valeur moyenne de l'activité réductrice d'acétylène au cours d'un cycle culturel en fonction de la fertilisation azotée*.

Traitement	ARA moyenne ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	Rendement en grain (t ha ⁻¹)
Contrôle sans azote	195 ± 14	4.08 ± 0.10
38 kg N ha ⁻¹ épandu au repiquage +17 kg N ha ⁻¹ à l'initiation paniculaire.	80 ± 13	4.82 ± 0.12
55 kg N ha ⁻¹ enfoui (super-granules) au repiquage.	116 ± 16	5,78 ± 0.09

* Chaque valeur est la moyenne de 60 répétitions

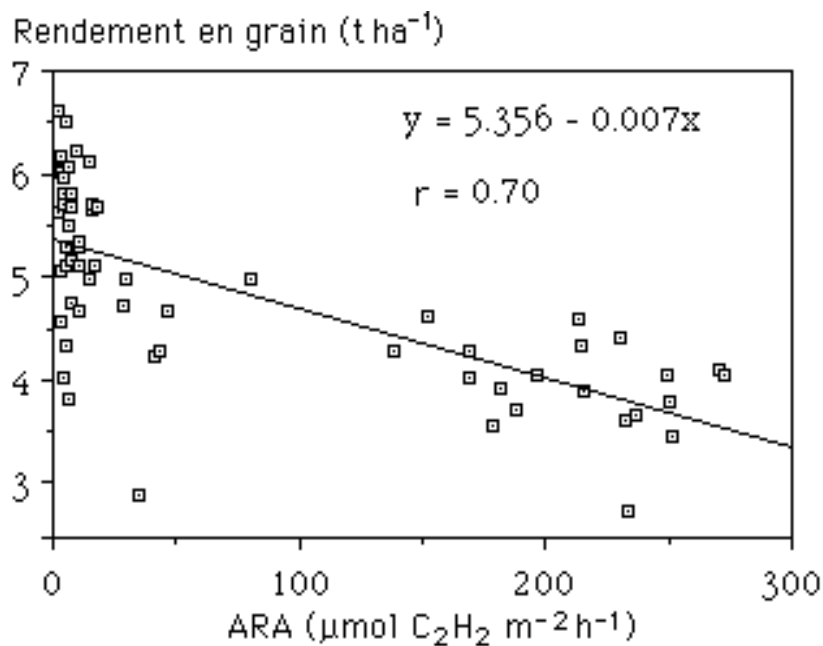


Fig. 6. Rendement en riz et valeur moyenne de la fixation de N₂ (ARA) au cours du cycle cultural dans des parcelles recevant 55 kg N ha⁻¹ épandu sous forme d'urée (Roger et al., résultats non publiés).

Des expériences en micro-parcelles (IRRI 1990) et *in situ* confirment que l'apport de P, l'absence de fertilisation azotée ou l'enfouissement de l'engrais et le contrôle des prédateurs des algues permettent généralement un développement conséquent de la flore autochtone fixatrice de N₂. Ces pratiques culturales seraient également un préalable à l'établissement de souches étrangères inoculées. Toutefois, leur coût est généralement supérieur au bénéfice obtenu. En particulier, des expériences en micro-parcelles ont montré que si le contrôle des prédateurs et l'application d'engrais phosphoré permettent le développement de fleurs d'eau susceptible d'accumuler de 5 à 40 kg N ha⁻¹ (moyenne 20 kg N ha⁻¹) en quatre semaines, par contre le rapport entre le gain d'azote et le phosphore épandu avait une moyenne de 1,4 et ne dépassait pas la valeur de 3, alors que le rapport moyen entre les prix des engrais phosphoré et azoté est de l'ordre de 3 dans les pays rizicoles (IRRI 1990).

Ces résultats indiquent également que l'inoculation algale n'est justifiée que si les conditions de milieu sont favorables au développement des cyanobactéries et qu'elle permet un développement de la biomasse fixatrice de N₂ plus rapide que le développement spontané à partir des propagules présentes dans le sol. Ceci peut être réalisé avec les conditions suivantes:

- sols alcalins avec un niveau de phosphore élevé,
- ensoleillement suffisant en début de cycle cultural,
- fertilisation azotée non utilisée, enfouie, ou retardée au cours du cycle cultural,
- utilisation d'un inoculum (1) frais, (2) produit *in situ* à partir du sol de la parcelle destinée à être inoculée, (3) enrichi en P et (4) ne contenant pas de prédateurs ou de pathogènes.

L'inoculation aura des effets d'autant plus marqués que le niveau de propagules de souches indigènes présentes à la surface du sol au moment de la mise en eau sera bas. L'inoculation devrait être efficace dans des sols soumis à de longues périodes de dessiccation (jachère sèche ou culture en sol exondé) où le niveau des propagules de cyanobactéries et les formes de conservation de prédateurs des algues diminuent durant la saison sèche.

Des progrès importants ont été faits en génétique des cyanobactéries, en particulier en ce qui concerne la résistance aux herbicides (Brusslan & Haselkorn 1988) et il est tentant de spéculer sur les possibilités de sélectionner ou de créer par manipulation génétique des souches ayant des performances améliorées et destinées à être inoculées dans les sols.

Plusieurs auteurs ont identifié des souches ayant une activité fixatrice de N₂ *in vitro* élevée toutefois il n'y a pas de raison pour que cette activité soit corrélée avec l'aptitude à la colonisation *in situ*. En fait, les souches à croissance rapide sont des *Anabaena* à filaments courts, très sensibles à la prédation. Elles ne s'établissent pas *in situ* (Antarikanonda & Lorenzen 1982, Huang 1983).

Il est possible d'isoler des souches déréprimées qui manifestent une activité fixatrice de N₂ en

présence d'azote minéral et excrètent une fraction importante de l'azote fixé. Un mutant d'*Anabaena variabilis* présentant ces propriétés a pu, en culture gnotobiotique, fournir suffisamment d'azote à des pieds de riz pour permettre leur développement (Latorre et al., 1986). Toutefois cette souche n'est pas compétitive et ne se multiplie pas dans le sol, même si des traitements destinés à favoriser le développement des cyanobactéries sont appliqués simultanément (Roger & Santiago-Ardales 1991).

La manipulation génétique des cyanobactéries est actuellement limitée à des souches unicellulaires très différentes morphologiquement et physiologiquement de celles qui pourraient être utilisées pour inoculer les rizières. Probablement, des 'super souches' ayant un potentiel fixateur de N_2 *in vitro* élevé pourront être sélectionnées ou construites, toutefois les caractéristiques qui leur permettraient de coloniser un sol et d'y produire une biomasse agronomiquement significative sont encore inconnues.

Dans l'état actuel des connaissances, il apparaît que le potentiel agronomique de l'inoculation algale se limite à l'utilisation de souches autochtones dans des agrosystèmes favorables au développement des cyanobactéries lorsqu'elle permet d'accélérer le développement de la flore autochtone. Les propriétés du sol, le climat, et les pratiques culturales à réunir pour obtenir ces conditions limitent le potentiel d'utilisation de l'inoculation à un faible pourcentage des rizières.

5. AZOLLA

Azolla est une fougère aquatique de petite taille qui héberge une cyanobactérie symbiotique fixatrice de N_2 . Azolla a été traditionnellement utilisée comme engrais vert au Vietnam et en Chine. Bien qu'étant indigène dans la majorité des pays rizicoles (Lumpkin & Plucknett 1982), son développement spontané est rare et elle doit être inoculée dans les rizières avant chaque cycle cultural.

5.1. POTENTIEL POUR AUGMENTER LES RENDEMENTS

5.1.1. Potentiel comme source d'azote

Les quantités d'azote fixé par Azolla ont été le plus souvent estimées à partir de mesures de biomasse et l'hypothèse que la majeure partie de l'azote provenait de la fixation biologique. Des résultats récents confirment cette hypothèse et montrent qu'en moyenne 74% de l'azote d'Azolla provient de la fixation de N_2 . Il est intéressant de noter que cette valeur est la même pour les résultats obtenus en présence ou en absence d'engrais azoté (Tableau 7). Des résultats similaires (Ndfa de 59 à 99%) ont été obtenus avec la mesure de l'abondance isotopique naturelle (Yoneyama et al. 1987).

Les estimations de l'azote accumulé dans la biomasse maximale d'Azolla cultivée dans des petites parcelles expérimentales varient entre 20 et 146 kg ha⁻¹ (moyenne: 70 kg ha⁻¹). Les taux journaliers correspondants varient de 0,4 à 3,6 kg N ha⁻¹ j⁻¹ (moyenne: 2 kg N ha⁻¹ j⁻¹) (Roger & Watanabe 1986). Ces mesures doivent être interprétées comme des valeurs potentielles dans des conditions optimales. Un essai international en vraie grandeur conduit pendant 4 ans dans 37 sites et 10 pays (Watanabe 1987) montre que la biomasses maximale d'Azolla cultivée avant et après repiquage du riz varie entre 5 et 25 t ha⁻¹ poids frais (moyenne 15 t) soit 10-50 kg N ha⁻¹ (moyenne 30 kg N).

En moyenne 30% de l'azote accumulé dans Azolla est absorbé par les parties aériennes de la récolte de riz cultivé durant le cycle cultural qui suit l'incorporation d'Azolla (Tableau 4).

Tableau 7. Pourcentage de l'azote d'Azolla provenant de la fixation biologique de N_2 (Ndfa %) estimé par la méthode de dilution de l'¹⁵N (d'après Watanabe 1990)

Auteurs	Plante de référence	Ndfa %	Remarques
Kumarasinghe et al. (1985)	<i>Salvinia</i>	92	+ 15 mg N/micro-parcelle
	"	79	+ 75 mg N/micro-parcelle
	"	76	+ 150 mg N/micro-parcelle
	<i>Lemna /Salvinia</i>	81-83	en présence de riz
You C.B. et al. (1987)	"	82-79	en l'absence de riz
	<i>Lemna</i>	40-59	
Kulasooriya et al. (1988)	"	63-71	Azolla marquée
	<i>Salvinia /Lemna</i>	52-55	sans riz, + 40ppm N
Watanabe et al. (1990)	"	58-64	avec du riz, + 40ppm N
	<i>Lemna /Spirogyra</i>	86-93	3 culture d'Azolla
	<i>Lemna</i>	80-81	après une culture de riz
Moyenne		74	

Tableau 8. Résultats d'essais internationaux (INSFFER 1979-1980) de l'utilisation d'Azolla dans 37 sites de 10 pays rizicoles (d'après Watanabe 1990)

Traitement	Rendement	
	(t/ha)	% du contrôle
Contrôle sans azote	3.00	100 c
30 kg N/ha en 3 applications	3.65	121 b
60 kg N/ha en 3 applications	4.24	141 a
Azolla incorporée avant repiquage	3.73	124 b
Azolla incorporée après repiquage	3.67	122 b
Azolla inoculée après repiquage mais non incorporée	3.61	120 b
Combinaison des traitements 2 et 4	4.15	138 a
Combinaison des traitements 2 et 5	4.07	135 a
Azolla incorporée avant et après repiquage	4.09	136 a

5.1.2. Autres effets favorables

Les effets favorables autres que l'apport d'azote attribués à Azolla et relevés dans la bibliographie par Roger et al. (1991) comprennent:

- Effet malherbicide (Diara et al. 1987, Lumpkin & Plucknett 1982).
- Amélioration de l'utilisation du P appliqué sous forme d'engrais minéral (Sampaio et al. 1984).
- Source de K pour le riz par concentration du K présent dans l'eau de submersion à des teneurs (1-5 ppm) inférieures au seuil d'absorption par le riz (8 ppm). Le seuil d'absorption est d'environ 0.85 ppm pour Azolla (Liu 1984).
- Diminution des pertes d'eau par évapo-transpiration (Diara & Van Hoove 1984).
- Diminution des pertes d'azote dues à la volatilisation de l'ammoniac par suite d'une diminution du pH de l'eau de submersion.

5.1.3. Effets sur les rendements

Des essais internationaux dans 37 sites de 10 pays rizicoles (Watanabe 1987) ont montré, qu'en moyenne, l'incorporation d'une culture d'Azolla avant ou après le repiquage du riz était équivalente à l'épandage de 30 kg d'azote et augmentait les rendements d'environ 0,6t ha⁻¹. L'incorporation de deux cultures d'Azolla avant et après le repiquage était équivalente à l'épandage de 60 kg d'azote et augmentait les rendements d'environ 1t ha⁻¹ (Tableau 8).

Tableau 9. Importance de l'utilisation d'Azolla en riziculture

• Pays où Azolla est ou a été utilisée de façon significative:

Chine:	avant 1978:	> 6.5 million ha	(FAO 1978)
	avant 1979:	1.34 million ha	(Liu Chung Chu 1979)
	avant 1980 :	0.7 million ha	(Lumpkin & Plucknett 1982)
	1987:	diminution de l'utilisation comme engrais vert, recherches pour l'utilisation comme aliment du bétail (Liu Chung Chu 1987)	
Vietnam:	en 1980:	environ 500 000 ha	(Roger & Watanabe 1986)
	depuis 1980:	l'utilisation a continuellement diminué	
Philippines:	en 1981:	adoption sur 5,000 ha	(Kikuchi et al. 1984)
	en 1986:	84,000 ha	(Azolla Workshop , IIRI 1987)
	depuis 1986:	l'utilisation a constamment diminué	

• Pays où les possibilités d'utilisation d'Azolla ont été ou sont en cours d'étude:

Brésil, Inde, Italie, Pakistan, Sénégal, Sri Lanka, Thaïlande.

• En 1990 l'utilisation d'Azolla concerne moins de 1% des surfaces cultivées en riz.

5.2. UTILISATION ACTUELLE, FACTEURS LIMITANTS ET PERSPECTIVES

Après une utilisation sur plusieurs millions d'hectares de rizières en Chine et au Vietnam, l'emploi

d'*Azolla* a constamment diminué au cours des dix dernières années et cette technique ne s'est pas répandue dans les pays qui ont testé son utilisation. Le tableau 9 résume cette évolution.

Les facteurs qui ont empêché l'adoption par les pays rizicoles des techniques utilisées en Chine et au Vietnam sont à la fois technologiques et socio-économiques. Les différents facteurs limitant l'utilisation d'*Azolla* sont résumés ci-après, ainsi que les méthodes qui ont été récemment étudiées, identifiées ou mises au point pour les surmonter.

Azolla ne peut résister à la dessiccation et demande la présence d'eau pendant la totalité de son cycle cultural. *Azolla* est multipliée de façon végétative et doit être conservée au cours de l'année dans des pépinières. Ces deux conditions indiquent que l'utilisation d'*Azolla* requiert l'existence (1) de réseaux d'irrigation et (2) de réseaux de conservation et de distribution de l'inoculum. L'adoption d'*Azolla* par les riziculteurs dépend donc de décisions politiques pour l'établissement de tels réseaux (Roger & Watanabe 1986). La possibilité de conserver *Azolla* sous la forme de sporocarpes qui seront utilisés pour inoculer les rizières a été testée mais n'a, pour le moment, pas donné de résultats satisfaisants. Les conditions de la formation et de la germination des sporocarpes ne sont encore que très imparfaitement comprises et la croissance d'*Azolla* à partir de sporocarpes est trop lente pour assurer l'établissement d'une biomasse suffisante dans un laps de temps raisonnable. Une étude en Chine a montré que 160 kg poids frais ha⁻¹ de sporocarpes produisaient de 16 à 21 t poids frais ha⁻¹ d'*Azolla* en 52 jours (Lu 1987).

Le phosphore est un facteur clé de la croissance d'*Azolla* et son addition est requise dans la majorité des sols. Le temps de doublement d'*Azolla* estimé lors d'un test portant sur 972 sols des Philippines était inférieur à 5 jours (sols modérément favorables) dans 40% des sols et inférieur à 3.5 jours (sols favorables) dans seulement 13% des sols (Callo et al. 1985). Pour être économiquement rentable, l'application de phosphore doit avoir une efficacité azotée (N fixé/P épandu) supérieure à trois. Cette valeur n'est pas atteinte pour une application unique en début de cycle cultural, par contre le fractionnement de la fertilisation permet d'obtenir une efficacité azotée de 5 à 10 (Watanabe et al. 1980) mais augmente le coût de l'application. Une fertilisation importante de l'inoculum permet à ce dernier de se multiplier 6 à 7 fois dans la rizière sans fertilisation phosphorée supplémentaire et assure une efficacité azotée élevée. Toutefois cette méthode diminue la teneur en azote du matériel produit et sa valeur comme engrais vert. Des espèces présentant des besoins en P réduits ont été identifiées (Watanabe, communication personnelle).

Une trentaine d'insectes (13 Diptères, 6 Coléoptères, 8 Lépidoptères, 1 Homoptère, 2 Orthoptères), 2 Arachnoïdes, et 9 Mollusques (Mochida 1987) peuvent diminuer la productivité d'*Azolla* de 10 à 60%. Des maladies fongiques qui se développent sur les blessures causées par les insectes augmentent l'effet de ces derniers (Garcia 1986). Des méthodes de lutte ont été identifiées mais l'application de pesticides n'est pas économiquement rentable dans les rizières (IRRI 1986). Elle doit être limitée aux parcelles de production d'inoculum (Mochida 1987).

La température optimale pour le développement de la majorité des espèces (20-30 °C) est inférieure à la température moyenne de la zone tropicale. Un climat tempéré explique le succès d'*Azolla* en Chine et au Vietnam. Il est possible de sélectionner des souches résistantes à des températures élevées (Lumpkin 1987, Watanabe & Berja 1983). Dans la collection d'*Azolla* de l'IRRI, *A. microphylla* #418 a été identifiée comme la souche la plus résistante. Elle peut se développer avec un cycle nyctéméral de 37 °C le jour et 29 °C la nuit (Watanabe, communication personnelle). Toutefois les effets négatifs des températures tropicales sur la productivité d'*Azolla* ne sont pas uniquement des effets physiologiques directs mais également des effets indirects, en particulier une température élevée en climat tropical humide favorise le développement des parasites et pathogènes d'*Azolla*.

Les principaux facteurs qui limitent l'utilisation d'*Azolla* sont socio-économiques. Les méthodes traditionnelles utilisées au Vietnam et en Chine demandent énormément de travail et, en particulier, un grand nombre de passages au champ. Les études effectuées par Kikuchi et al. (1984) aux Philippines, dans une région où la teneur exceptionnellement élevée des sols en P assimilable permet le développement spontané de l'*Azolla* sans apport de P ont montré un bénéfice de \$35 ha⁻¹ (1981). Ces auteurs ont cependant conclu que le potentiel d'*Azolla* dépendait fortement des conditions économiques et que le seuil de rentabilité était dépassé lorsque le coût de la journée de travail était supérieur à deux dollars ou lorsqu'il fallait appliquer plus de 200 g de carbofuran (ingrédient actif) pour contrôler les parasites d'*Azolla*. Une étude économique dans une région moins favorable des Philippines (Rosegrant et al. 1985) a permis de conclure que le coût de l'utilisation d'*Azolla* était

supérieur à celui de l'application d'urée et que l'adoption d'*Azolla* était peu probable lorsque de l'engrais azoté était disponible. Ces études ne prennent pas en compte les effets à long terme de l'utilisation d'un engrais organique sur la fertilité des sols.

Au cours des dernières années, les études de la recombinaison de différents partenaires (fougère et cyanobactérie) (Lin & Watanabe 1988, Lin et al. 1988, Watanabe et al. 1989) et de l'hybridation interspécifique (Wei et al. 1986) ont montré qu'il est possible d'améliorer les propriétés des souches en combinant, par exemple, le potentiel fixateur de N₂ élevé d'*A. filiculoides* avec la résistance à des températures élevées d'*A. microphylla* (Tableau 10).

Tableau 10. Biomasse, activité fixatrice de N₂ et teneur en azote de deux espèces d'*Azolla* et de leur hybride cultivés pendant 28 jours à deux niveaux de températures

Espèce	température	Poids frais	ARA	% N
<i>A. microphylla</i>	37°/29°C	1400	3.1	3,8
<i>microphylla</i> x <i>filiculoides</i>	37°/29°C	1100	3.4	5,0
<i>A. filiculoides</i>	37°/29°C	300	0.4	1,5
<i>A. filiculoides</i>	26°/18°C	1800	4.6	5,2

(Watanabe & Santiago-Ventura, IRRI, communication personnelle)

Le potentiel agronomique d'*Azolla* n'est pas limité à l'utilisation comme engrais vert. *Azolla* peut être également utilisée comme aliment du bétail pour les porcs et les poulets et en pisciculture, ainsi que dans des systèmes cultureux complexes. Liu Chung Chu (FAO 1988) a présenté un système combinant la culture du riz et d'*Azolla* avec la pisciculture. Dans ce système, le rendement en riz augmentait de 8% par rapport au système riz-*Azolla*, le développement des adventices et des parasites du riz était significativement réduit, la surface du sol était enrichie en N et en P, et les pertes de l'azote d'*Azolla* étaient de 21% contre 39% dans le système riz-*Azolla*.

Azolla est un engrais vert qui a un potentiel azoté du même ordre de grandeur que celui des légumineuses. Elle présente l'avantage de croître en sol submergé en même temps que le riz, et est plus facile à incorporer que les légumineuses. Depuis la redécouverte d'*Azolla* par les agronomes des pays rizicoles autres que la Chine et le Vietnam, aux alentours de 1980, de nombreux travaux de recherche ont été entrepris pour étendre cette technologie à d'autres pays rizicoles. Des progrès importants ont été faits dans l'identification de méthodes permettant de contourner les facteurs limitants technologiques et en particulier l'amélioration des souches. Dans le même temps l'utilisation d'*Azolla* a pratiquement disparue des pays où elle était traditionnelle et elle ne s'est pas développée dans les pays qui ont testé les technologies disponibles ou tenté d'en développer d'autres. Les raisons sont principalement socio-économiques. Les écosystèmes favorables qui permettent le développement d'*Azolla* sans pratiques culturelles additionnelles après l'inoculation représentent une infime fraction des surfaces cultivées. Dans les autres écosystèmes, l'utilisation d'*Azolla* est limitée par le coût de production. De plus, en conditions de semis direct, *Azolla* devient une adventice préjudiciable par ses effets mécaniques sur les jeunes plantules de riz. L'évolution actuelle de la riziculture du repiquage vers le semis direct est un facteur négatif pour son adoption. A moins de changements économiques importants (taxation des engrais azotés et éventuellement subvention de la fertilisation organique), il est peu probable que l'utilisation d'*Azolla* se développe dans un pourcentage significatif des surfaces cultivées en riz. Par contre l'identification d'*Azolla* comme un biofertilisant à usages multiples (malherbicide, source de potassium par concentration de cet élément, aliment du bétail, producteur primaire dans des systèmes cultureux complexes riz-*Azolla*-poisson) est susceptible de relancer l'intérêt de son utilisation agronomique.

6. LEGUMINEUSES

De nombreuses légumineuses ont traditionnellement été utilisées comme engrais vert en riziculture (Tableau 11). La découverte des légumineuses à nodules caulinaires aptes à se développer dans les sols submergés (Dreyfus & Dommergues 1981, Alazard & Duhoux 1987)) et présentant une activité fixatrice de N₂ élevée (Tableau 12), a ravivé l'intérêt des chercheurs pour l'utilisation des engrais verts en riziculture. Les 25 espèces répertoriées appartiennent au genres *Aeschynomene* (21 espèces), *Sesbania* (3 espèces) et *Neptunia* (une espèce: *N. oleracera*). Deux espèces: *S.rostrata* et *A. afraspera* présentent des caractéristiques permettant leur utilisation comme engrais vert.

Tableau 11. Légumineuses traditionnelles utilisées comme engrais vert en riziculture et quantités d'azote accumulées (Roger & Watanabe, 1986)

Espèce	(kg ha ⁻¹)	(% du poids frais)
<i>Astragalus sinicus</i>	108-123	0,35-0,47
<i>Canavalia ensiformis</i>	98	0,47
<i>Cassia mimosoides</i>	97	0,44
<i>Crotalaria anagyroides</i>	98	0,33
<i>Crotalaria juncea</i>	105-129	0,30
<i>Crotalaria quinquefolia</i>	88	0,19
<i>Dolichos biflorus</i>	89	0,58
<i>Gycine koidzumii</i>	71	0,42
<i>Phaseolus</i> sp.	-	0,28
<i>Phaseolus lathyroid</i>	90	-
<i>Phaseolus calcaratus</i>	42	0,22
<i>Sesbania aculeata</i>	96-122	0,32-0,36
<i>Sesbania rostrata</i>	267	-
<i>Sesbania sesban</i>	100-202	0,39
<i>Sesbania microcarpa</i>	87	0,50
<i>Sesbania sirececa</i>	146	-
Moyenne	114	0,37

*la majeure partie des valeurs concernent des cultures conduites jusqu'à maturité

Tableau 12. Estimation de l'azote fixé par deux légumineuses à nodules caulinaires cultivées en sol submergé.

Longueur des jours	Nb de jours de culture	Ndfa* %	N fixé (kg/ha)	Méthode de mesure	Référence
<i>Sesbania rostrata</i>					
long	56	38	-	¹⁵ N dil.	Rinaudo et al. 1988
long	60	36-51	83-109	¹⁵ N dil.	Ndoye & Dreyfus 1989
long	56	88	175	ARA/ ¹⁵ N ₂	Becker et al. 1990
court	56	83	70	---	---
long	25	76	10	¹⁵ N dil.	Pareek et al. 1990
long	45	88	140	---	---
long	65	94	458	---	---
court	25	53	7	---	---
court	45	71	100	---	---
court	65	86	324	---	---
<i>Aeschynomene afraspera</i>					
long	56	77	145	ARA/ ¹⁵ N ₂	Becker et al. 1990
court	56	68	105	---	---
Moyenne			70		* % de l'azote total dérivé de la fixation de N ₂

Tableau 13. Quantités d'azote accumulées dans les légumineuses utilisées comme engrais vert en riziculture*

	Poids sec	N accumulé	
	t ha ⁻¹	kg ha ⁻¹	kg ha ⁻¹ jour ⁻¹
110 cultures de 16 espèces cultivées pendant 30 à 178 jours (moyenne 52 jours)			
Moyenne	4.3	99	1,9
Maximum	13.3	267	5,1
Minimum	0.2	7	0,2
32 cultures de 11 espèces cultivées pendant 30 à 45 jours (moyenne 40 jours)			
Moyenne	2.5	63	1,6
Maximum	6.7	143	3,2
Minimum	0.2	7	0,2

* Calculée à partir des valeurs présentées par Buresh & DeDatta 1991

6.1. POTENTIEL POUR AUGMENTER LES RENDEMENTS

6.1.1. Potentiel comme source d'azote

Le potentiel azoté des légumineuses utilisées comme engrais vert en riziculture a le plus souvent été estimé à partir de mesures de biomasse et l'hypothèse que 50 à 80% de l'azote accumulé provenait de la fixation de N₂. Des mesures récentes sur des légumineuses à nodules caulinaires montrent des valeurs de Ndfa qui varient entre 38 et 94% et ont une moyenne de 70% (Tableau 12).

Les valeurs d'azote accumulé par des cultures de légumineuses traditionnelles utilisables comme engrais vert en riziculture et cultivées jusqu'à maturité ont une valeur moyenne de 114 kg N ha⁻¹ (Tableau 11). La quantité d'azote accumulé varie avec le type de légumineuse. Les valeurs publiées après 1985 exprimées en kg N ha⁻¹ varient de 40 à 225 pour les légumineuses aquatiques à nodules caulinaires, de 33 à 115 pour les légumineuses à graines traditionnelles, et de 24 à 39 pour les légumineuses arborescentes (Ladha et al. 1988b).

Toutefois l'utilisation pratique d'un engrais vert requiert généralement son incorporation à 40-50 jours. Au delà, le riziculteur aura intérêt à cultiver une culture vivrière ou une culture de rapport et non un engrais vert. Les valeurs de l'azote accumulé par 32 cultures de 11 espèces cultivées pendant 30 à 45 jours sont comprises entre 7 et 143 kgN ha⁻¹ et ont une moyenne de 63 kgN ha⁻¹ (Tableau 13).

Tableau 14. Effet de la culture et/ou de l'incorporation de *Sesbania rostrata* ou d'*Aeschynomene afraspera* sur les populations du nématode parasite du riz *Hirschmanniella mucronata* et sur le rendement en grain (d'après Prot et al. 1992).

	Contrôle	Légumineuse	Traitement 1	Traitement 2	Traitement 3
1ère culture	Riz		Riz	Légumineuse	Légumineuse
Traitement engrais vert	néant		incorporation de matériel importé	culture et exportation	culture et incorporation
2ème culture	Riz		Riz	Riz	Riz
Nématodes (nb. dm⁻³ de sol)					
avant la 1ère culture	860 a	<i>S. rostrata</i> <i>A. afraspera</i>	1024 a 881 a	755 a 1050 a	750 a 849 a
à la 1ère récolte	766 a	<i>S. rostrata</i> <i>A. afraspera</i>	1055 a 692 a	9 b 1 b	12 b 1 b
à la 2ème récolte	766 a	<i>S. rostrata</i> <i>A. afraspera</i>	621 ab 598 ab	446 ab 274 b	352 b 262 b
Rendement de la 2ème culture (t ha⁻¹)					
	2.2 e	<i>S. rostrata</i> <i>A. afraspera</i>	3.2 bc 3.5 ac	2.9 cd 3.0 cd	4.0 a 3.8 ab

6.1.2. Autres effets favorables

Les effets favorables de l'utilisation des légumineuses en engrais vert autres que l'apport d'azote sont de trois types:

- amélioration des propriétés physico-chimiques du sol (Becker et al. 1988) et, en particulier, l'augmentation (1) des teneurs en matière organique et en azote total (Bouldin, 1988), (2) de la teneur en Zn assimilable (ICAR, 1977), (3) de la capacité de rétention de l'eau et (4) de l'agrégation du sol, une propriété importante dans les sols de rizière utilisés en alternance pour une culture exondée.
- Le contrôle de certaines mauvaises herbes, parasites et maladies. En particulier des expériences récentes *in situ* montrent un effet nématocide des légumineuses à nodules caulinaires (Tableau 14).
- Le piégeage de l'azote minéralisé dans les jachères de saison sèche permettant une diminution des pertes d'azote par dénitrification lors de la submersion du sol en saison des pluies.

6.1.3. Effets sur les rendements

Les estimations d'augmentation de rendement après l'incorporation d'un engrais vert sont comprises entre 30 et 100 kg de grain par tonne (poids frais) de légumineuse incorporée (Roger et Watanabe 1986). L'incorporation d'une légumineuses à nodules caulinaires de 40 à 60 jours permet des augmentations de rendement en riz de l'ordre de la tonne par hectare (Fig.7). L'efficacité de l'azote de l'engrais vert (kg de grain produit /kg d'azote appliqué) diminue avec la quantité appliquée et est similaire à celle de l'engrais minéral pour des applications de 50-60 kg ha⁻¹ (Fig. 8).

6.2. UTILISATION ACTUELLE, FACTEURS LIMITANTS ET PERSPECTIVES

Malgré un potentiel azoté élevé, une diminution continue de l'utilisation des engrais verts en riziculture a été observée au cours des dernières décades. Durant les années 80, la Chine a été le seul pays où les engrais verts étaient utilisés de façon notable et leur utilisation n'a cessé de décroître (Figure 9). Dans les autres pays, l'utilisation des engrais verts semble être devenue anecdotique.

Les facteurs qui limitent l'utilisation des légumineuses comme engrais vert sont à la fois technologiques et socio-économiques. Ces derniers sont cependant les plus importants.

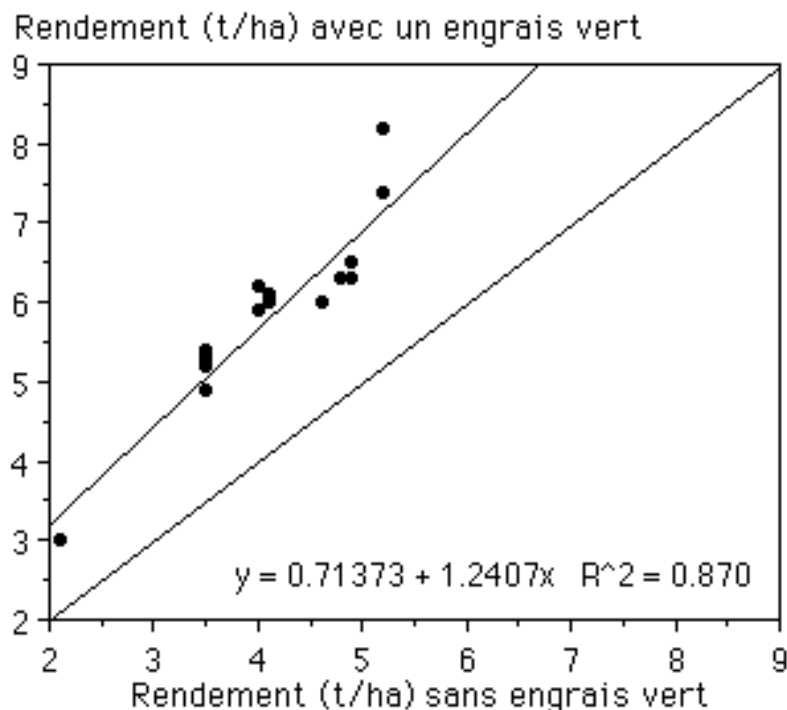


Fig. 7. Effet de l'incorporation de cultures de *Sesbania* et d'*Aeschynomene* âgées de 42 à 59 jours sur le rendement en grain (Tracé à partir des valeurs publiées par Ventura *et al.* 1987, Diekmann *et al.* 1991, Becker 1990, Furoc & Morris 1989 et Biswas 1988).

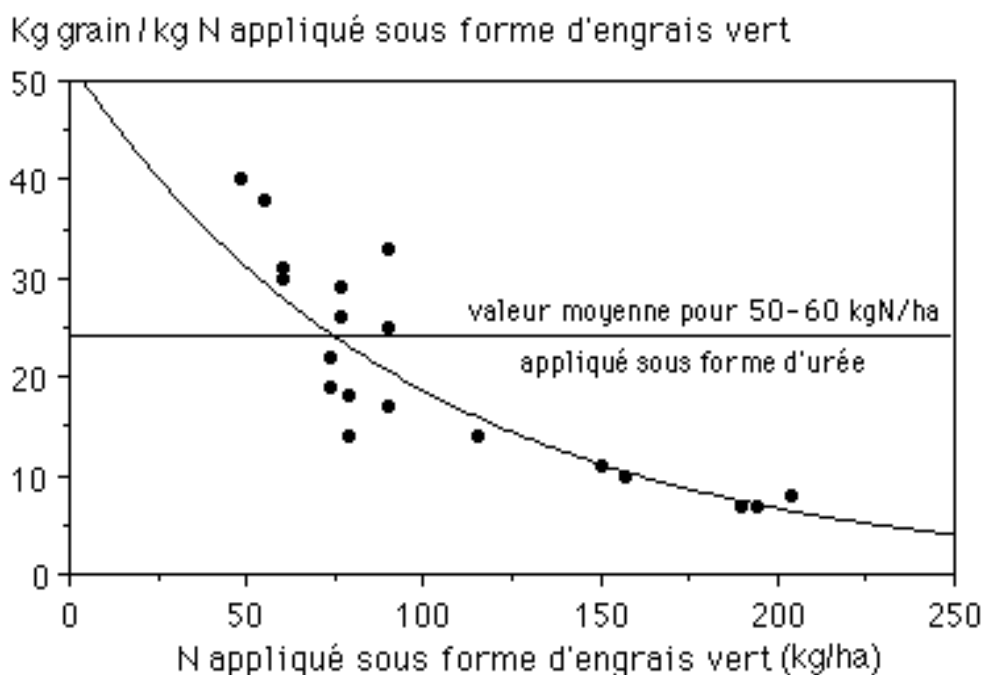


Fig. 8. Efficacité de l'azote de culture de *Sesbania* et *Aeschynomene* âgées de 42 à 59 jours sur le rendement en riz (Tracé à partir des valeurs publiées par Ventura *et al.* 1987, Diekmann *et al.* 1991, Becker 1990, Furoc & Morris 1989 et Biswas 1988)

Des effets défavorables des engrais vert sur le riz ont été observés dans les pays tempérés. La disparition de leur utilisation au Japon a été attribuée à une diminution des rendements résultant (1) d'un effet dépressif des produits de décomposition anaérobie de l'engrais vert sur la croissance du riz en début de cycle et (2) d'un décalage entre la minéralisation de l'azote de l'engrais vert et la demande par le riz qui conduisait à une croissance excessive en fin de cycle (Watanabe 1984).

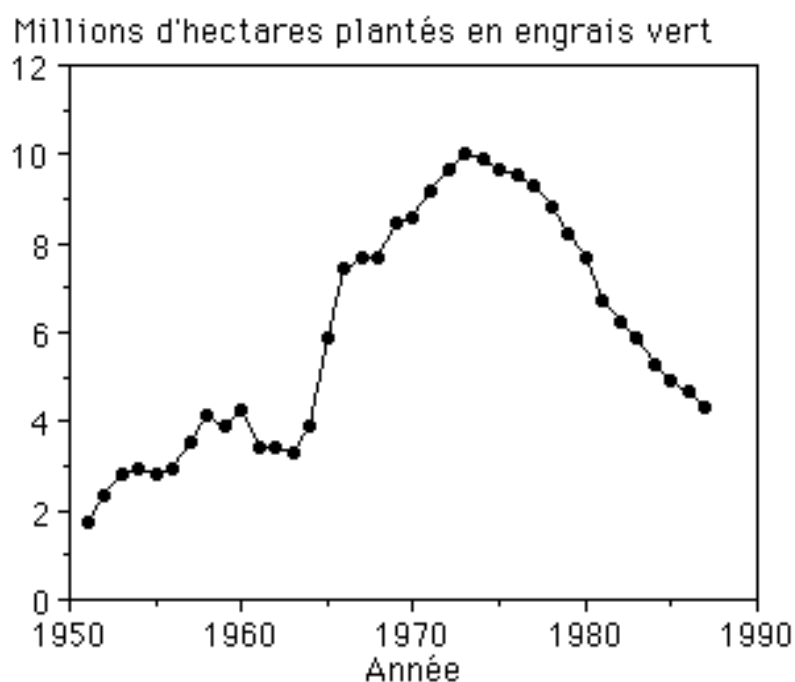


Fig. 9. Evolution de l'utilisation des engrais verts en Chine entre 1950 et 1988 (d'après Stone 1990)

Les aspects technologiques qui ont limité l'utilisation des légumineuses en engrais vert incluent le manque de main d'oeuvre et de matériel pour l'incorporation d'une biomasse volumineuse et l'impossibilité de prévoir la quantité d'azote apportée. La teneur en azote des légumineuses est de 0,2 à 0,6% du poids frais et l'apport de 50 kg N demande l'incorporation de 10 à 26 t d'engrais vert. D'autres facteurs limitants sont le broutage par le bétail en liberté, la destruction par des ravageurs, et la persistance de fragments ligneux dans le sol qui blessent les pieds des riziculteurs.

Les facteurs limitants socio-économiques sont sans doute les plus importants. Tout d'abord, il est évident que les engrais verts sont peu attrayants pour les riziculteurs car ce ne sont ni des cultures vivrières ni des cultures de rapport. D'autre part le bilan économique de l'utilisation de l'engrais vert est rarement avantageux (Garrity & Flinn 1988).

Dans les régions où l'engrais azoté de synthèse est disponible, son prix par rapport à celui du riz est généralement favorable pour le paysan en raison des politiques gouvernementales de subvention de l'engrais et de crédits. Par contre, le coût des semences de légumineuses, de préparation du sol et d'incorporation, comparé à l'augmentation de rendement obtenue, n'est pas favorable, en particulier avec des engrais verts traditionnels au potentiel azoté imprévisible. Le plus souvent, une culture vivrière dérobée ou une culture de rapport sont plus avantageuses pour le paysan qu'un engrais vert.

Dans les régions où l'engrais azoté de synthèse n'est pas disponible, la riziculture est de type autarcique, les exploitations sont de petite taille et le paysan ne peut utiliser sa terre pour cultiver un engrais vert au détriment d'une culture vivrière.

Cette situation avait déjà été pressentie par Norman (1982) qui écrivait " Green manures have always loomed larger in the agronomist's mind than in the farmer's except in parts of China. With increasing pressure on the tropical world's cultivated land for food production, I cannot see them becoming any more significant."

Une étude de Garrity et Flinn (1988) indique que les engrais verts ne peuvent être utilisés de façon économiquement rentable que si les conditions suivantes sont réunies:

- les graines sont disponibles,
- il n'existe pas d'alternative culturale plus rentable sur les parcelles considérées,
- l'établissement de la légumineuse se fait sans travail du sol ou à un coût très bas,
- la productivité de l'engrais vert est stable dans le temps et
- la main d'oeuvre et le matériel adéquat sont disponibles pour l'incorporation; en particulier il ne doit pas y avoir de compétition avec la main d'oeuvre nécessaire pour le repiquage du riz.

La découverte des légumineuses à nodules caulinaires ouvre la voie à la sélection de plantes particulièrement adaptées aux sols submergés et ayant un potentiel azoté plus élevé que celui des légumineuses traditionnelles. Un certain nombre des caractéristiques souhaitables pour un engrais vert adapté à la riziculture sont déjà présentes chez *S. rostrata* ou *A. afraspera* (Tableau 15). Toutefois les problèmes d'incorporation, de résistance aux parasites et maladies et de production des graines ne sont pas encore résolus. De plus la majorité des facteurs socio-économiques rencontrés avec les légumineuses traditionnelles s'appliquent également aux légumineuses caulinaires.

Les zones de riziculture pluviale submergée constituent l'environnement le plus prometteur pour l'utilisation des légumineuses comme engrais verts. Ces zones qui couvrent près de 20 millions d'hectares en Asie sont caractérisées par une seule culture de riz repiqué par an et des mauvaises conditions de drainage qui se traduisent par l'existence de courtes périodes de submersion imprévisibles lors de la transition entre la saison sèche et la saison des pluies. C'est dans de telles zones que les conditions d'utilisation énumérées par Garrity et Flinn (1988) sont le plus susceptibles d'être rencontrées.

Tableau 15. Caractéristiques souhaitables pour une légumineuse utilisable comme engrais vert en riziculture
(Adapté de Becker 1990)

	S. rostrata	A. afraspera
Cycle court, croissance rapide	+	+
Taux d'accumulation d'azote élevé	+	+
Etablissement facile de la culture	+	±
Tolérance à la submersion	+	+
Initiation rapide de la fixation de N ₂	+	+
Absence de sensibilité à la photopériode	-	+
Facilité d'incorporation	±	±
Adaptabilité à des environnements variés	+	+
Résistance aux maladies	?	?
Production de graines élevée	?	?

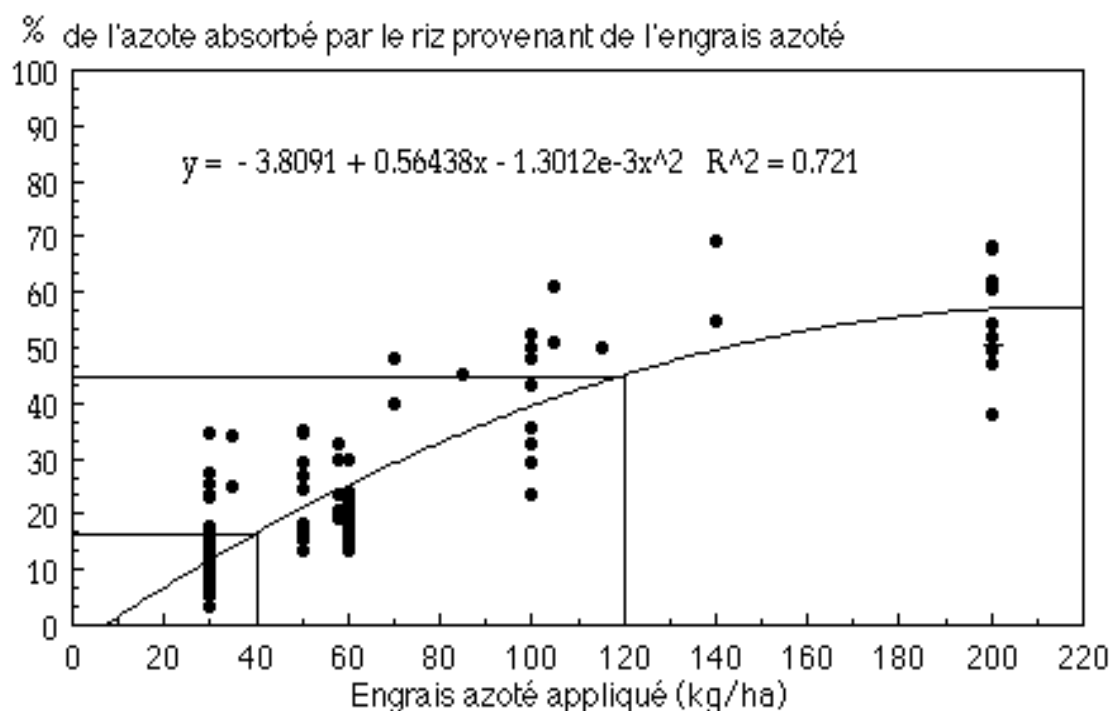


Fig. 10. Origine de l'azote absorbé par le riz à différents niveaux de fertilité azotée (tracé à partir des valeurs publiées par Broadbent et al. 1989, IAEA 1970, John et al. 1989 et de résultats non publiés fournis par R. Buresh, IRRI)

7. CONCLUSION

La fixation biologique de N_2 qui se manifeste de façon spontanée dans les rizières traditionnelles a permis une production de riz modeste mais constante à long terme. Par contre, l'utilisation des organismes fixateurs de N_2 dans une riziculture à forte productivité se heurte à de nombreux problèmes technologiques et socio-économiques. Dans le cas des fixateurs libres (bactéries hétérotrophes et cyanobactéries), un potentiel azoté bas ou modéré ainsi que des problèmes technologiques (en particulier l'absence d'établissement des souches inoculées), empêchent le développement de méthodes technologiquement et économiquement rentables. Dans le cas des engrais verts (*Azolla* et légumineuses), le potentiel azoté des systèmes est suffisant mais leur utilisation est sévèrement limitée par des facteurs socio-économiques.

A l'origine, les recherches sur l'utilisation pratique de la fixation de N_2 et les biofertilisants avaient pour but principal de trouver des sources d'azote bon marché pour remplacer les engrais de synthèse et augmenter les rendements. A cet aspect est venu s'ajouter récemment la préoccupation de la conservation à long terme de la fertilité des sols de rizière. Aux niveaux de fertilisation azotée employés en riziculture, la proportion de l'azote absorbé par le riz qui provient du sol est supérieure à celle provenant de l'engrais (Fig 10). Il est donc possible que l'intensification culturale se traduise par une diminution à long terme de la fertilité du sol. Une étude en Louisiane a montré qu'après 40 ans de riziculture, un sol argilo-limoneux a vu sa teneur en azote passer de 0,20% à 0,08% et sa teneur en matière organique diminuer jusqu'à 40% de la valeur initiale (Sturgis 1975). Les effets possibles de l'intensification culturale et de l'utilisation de niveaux élevés d'intrants agrochimiques sur l'évolution à long terme des environnements rizicoles sont devenus une préoccupation prioritaire de la recherche en riziculture. Les connaissances sur ce sujet sont encore très fragmentaires mais le rôle clé de la biomasse microbienne et de la biomasse photosynthétique aquatique, et en particulier de leurs composants fixateurs de N_2 , dans la conservation de la fertilité azotée des sols submergés est reconnu (Watanabe et al. 1988).

Notre analyse indique que les possibilités d'utilisation des biofertilisants fixateurs de N_2 n'ont actuellement qu'un potentiel très restreint en riziculture. Il faut toutefois garder présent à l'esprit que l'engrais azoté de synthèse provient de ressources non renouvelables et qu'à long terme, la mise au point de technologies moins perturbantes pour les écosystèmes cultivés et leur environnement puisse devenir une nécessité. Ceci justifie amplement la continuation de recherches sur les biofertilisants en s'orientant sur les aspects les plus prometteurs.

Les études sur la fixation de N₂ hétérotrophe indiquent que l'approche la plus prometteuse est la sélection de variétés favorisant la fixation rhizosphérique. Le potentiel de la fixation hétérotrophe comme source d'azote est très modeste, cependant, s'il est inhérent à une variété ou introduit dans une variété, son utilisation aurait l'avantage de ne demander aucune intervention du riziculteur.

Les cyanobactéries ont un potentiel plus élevé, de l'ordre de 20-30 kg N ha⁻¹ par cycle cultural. Les résultats récemment obtenus indiquent que le principe de l'inoculation algale doit être revu en privilégiant la multiplication des souches indigènes dans les agro-écosystèmes favorables au développement des cyanobactéries en l'absence d'engrais azoté. Toutefois, les superficies concernées ne devraient représenter qu'un faible pourcentage des sols plantés en riz.

Les progrès récents en génie génétique incitent à spéculer sur les possibilités de sélectionner des souches de bactéries ou de cyanobactéries plus efficaces pour l'inoculation. Toutefois les expériences d'inoculation montrent que les souches étrangères de bactéries et de cyanobactéries libres inoculées dans un sol ne s'y établissent pas et que les conditions qui leur permettraient de le faire sont encore totalement inconnues.

Azolla a un potentiel azoté 30 à 60 kg N ha⁻¹ par cycle cultural. Les facteurs édaphiques et nutritionnels qui limitent son utilisation en climat tropical peuvent être partiellement contournés par la sélection variétale, l'hybridation et la recombinaison de souches. Les facteurs limitants majeurs sont des facteurs socio-économiques dont l'effet va probablement aller en s'accroissant ainsi que le montre la très forte récession de l'utilisation d'Azolla en Chine et au Vietnam et l'absence de son adoption dans les autres pays rizicoles. Le potentiel d'Azolla comme aliment du bétail et producteur primaire dans des systèmes culturaux complexes (riz-Azolla-poisson) est susceptible de relancer l'intérêt de son utilisation agronomique dans des agro-écosystèmes spécifiques.

Les légumineuses à nodules caulinaires ont le potentiel le plus élevé en tant que source d'azote. Leur utilisation est limitée principalement par des facteurs socio-économiques. Priorité doit être donnée à l'identification des agro-écosystèmes où leur utilisation est économiquement valable.

Les zones de riziculture pluviale submergée constituent l'environnement le plus prometteur. Une première possibilité est de planter un engrais vert lors de la transition entre la saison sèche et la saison des pluies lorsque de courtes périodes de submersion imprévisibles ne permettent pas d'autre culture. L'autre possibilité est une culture de saison sèche qui, en plus de la fixation de N₂, piège l'azote minéralisé en saison sèche et permet une diminution des pertes d'azote par dénitrification lors de la submersion du sol en saison des pluies.

L'évaluation de technologies d'utilisation des biofertilisants devrait prendre en compte, dans la mesure du possible, les effets à long terme sur la fertilité des sols et sur l'environnement.

Remerciements: Ce travail résulte d'un accord de collaboration scientifique entre l'IRRI et l'ORSTOM. L'auteur exprime ses remerciements à JL Garcia et D. Alazard (ORSTOM) pour leurs commentaires sur le manuscrit.

8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alazard D, Duhoux (1987) Nitrogen-fixing stem nodules on *Aeschynomene afraspera*. Biol Fert. Soils 4: 61-66
- Antarikanonda P, Lorenzen H (1982) N₂-fixing blue-green algae (Cyanobacteria) of high efficiency from paddy soils of Bangkok, Thailand: Characterization of species and N₂-fixing capacity in the laboratory. Arch Hydrobiol Suppl 63 (1): 53-70
- App AA, Watanabe I, Santiago-Ventura T, Bravo M, Daez-Jurey C (1986) The effect of cultivated and wild rice varieties on the nitrogen balance of flooded soil. Soil Science 141, 448-452
- Becker M, JK Ladha, Ottow JC (1988) Stem-nodulating legumes as green manure for lowland rice. Phil. J. Crop Sci. 13(3), 121-127
- Becker M, Ladha JK, Ottow JCG (1990) Growth and N₂-fixation of two stem-nodulating legumes and their effect as green manure on lowland rice. Soil Biol. Biochem. 22:1109-1119
- Becker M (1990) Potential use of the stem-nodulating legumes *S. rostrata* and *A. afraspera* as green manure for lowland rice. Ph.D. thesis. Justus-Liebig University, Giessen, F.R.G
- Bisoyi RN, Singh PK (1988) Effect of phosphorus fertilization on blue-green algal inoculum production and nitrogen yield under field condition. Biol. Fert. Soils 5: 338-343
- Biswas TK (1988) Nitrogen dynamics and ¹⁵N balance in lowland rice as affected by green manure and urea application. Ph.D., Thesis. Indian Agric. Res. Inst., New Delhi, India
- Bouldin DR (1988) Effect of green manure on soil organic matter content and nitrogen availability. pp 152- 163 in Green Manure in rice farming. IRRI PO Box 933, Manila, Philippines
- Bray F (1986) The rice economies, technology and development in asian societies. UK: Basil

- Blackwell Inc. 254 pp
- Brusslan J, Haselkorn R (1988) Molecular genetics of herbicide resistance in cyanobacteria. *Photosyn. Res.* 17: 115-124
- Buresh RJ, Casselman ME, Patrick WH Jr (1980) Nitrogen fixation in flooded soil systems, a review. *Adv Agron* 23, 149-192
- Buresh RJ, De Datta SK (1991) Nitrogen dynamics and management in rice-legume cropping systems. *Advances in Agronomy*. 00:000-000 (sous presse)
- Callo DP, Dilag RT, Necesario RS, Wood DM, Tagalog FC, Gapasin DP, Ramirez CM, Watanabe I (1985) A 14-day Azolla adaptability test on farmer's fields. *Philipp J Crop Sci* 10 (3): 129-133
- De PK (1939) The role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice fields. *Proc R Soc Lond* 127 B: 121-139
- Diara HF, Van Brandt H, Diop AM, Van Hove C (1987) Azolla and its use in rice culture in West Africa pp. 147-152 in *Azolla utilization*, IRRI PO Box 933, Manila, Philippines
- Diara HF, Van Hoove C (1984) Azolla, a water saver in irrigated rice fields? pp. 115-118 in *Silver WS, Shröder EC eds. Practical application of Azolla for rice production*. M Nijhoff pub
- Diekmann KH, De Datta SK, Ottow JCG (1991) ¹⁵N balance in lowland rice involving various soil N fractions as affected by green manure and urea amendment. *Plant Soil* (in press)
- Dobereiner J, Ruschel AP (1962) Inoculation of rice with N₂-fixing genus *Beijerinckia* Derx. *Rev. Brasil Biol.* 21: 397-402
- Dreyfus BL, Dommergues YR (1981) Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. *FEMS Microbiol. Letter.* 10:313-317
- FAO (1978) China: azolla propagation and small-scale biogas technology. *FAO Soils Bull* 41
- FAO (1988) The Rice-Azolla-Fish system. *RAPA Bulletin Vol 4*, 37 pp
- Furoc RC, Morris RA (1989) Apparent recovery and physiological efficiency of nitrogen in *Sesbania* incorporated before rice. *Agron. J.* 81:797-802.
- Garcia RP (1986) Survey of micoflora associated with *Azolla* spp. *Philipp Agric* 69: 529-534
- Gomez KA (1972) Techniques for field experiments with rice. IRRI PO Box 933, Manila, Philippines. 46 p
- Gopalakrishnamurthy A, Mahadevan A, Rangaswami G (1967) Effect of bacterization of rice seeds on the rhizosphere microflora and plant growth. *Indian J. Microbiol.* 7: 21-28
- Garrity DP, Flinn JC (1988) Farm-level management systems for green manure crops in Asian rice environments. pp 111-129 in *Green manure in rice farming*. IRRI PO Box 933, Manila, Philippines
- Grant IF, Roger PA, Watanabe I (1985) Effect of grazer regulation and algal inoculation on photodependent nitrogen fixation in a wetland rice field. *Biol Fert Soils* 1: 61-72
- Grant IF, Seegers (1985) Tubificid role in soil mineralization and recovery of algal nitrogen by lowland rice. *Soil Biol. Biochem* 17: 559-563
- Huang Tan-Chi (1983) Inoculation of the nitrogen-fixing blue-green alga in the submerged soil. *Natl Sci Coun Monthly, ROC*, 11 (6): 521-526
- Inubushi K, Watanabe I (1986) Dynamics of available nitrogen in paddy soils. II. Mineralized N of chloroform-fumigated soil as a nutrient source for rice. *Soil Sci. Plant Nutr.* 32, 561-577
- IRRI (1986) Azolla-*Anabaena* symbiosis. pp 333-340 in *Annual Report for 1985*. International Rice Research Institute, PO Box 933, Manila, Philippines
- IRRI (1989) IRRI toward 2000 and beyond. International Rice Research Institute, PO Box 933, Manila, Philippines, 72pp
- IRRI (1991) Technology-environment interaction; pp 60-62 in *Program report for 1990*, International Rice Research Institute, PO Box 933, Manila, Philippines
- Ito O, Watanabe I (1985) Availability to rice plants of nitrogen fixed by Azolla. *Soil Sci Plant Nutr* 31 (1): 91-104
- Kikuchi M, Watanabe I, Haws LD (1984) Economic evaluation of Azolla in rice production. pp. 569-592 in *Organic matter and rice*. IRRI, PO Box 933, Manila, Philippines
- Kulasooriya S A, Senviratne P R G, De Silva W S A G, Abeysekera S W, Wijesundara C, De Silva A P (1988) Isotopic studies on N₂-fixation in Azolla and the availability of its nitrogen to rice. *Symbiosis* 6, 151-166
- Kumarasinghe KS, Zapata F, Kovaks G, Eskew DL, Danso SKA (1986) Evaluation of the availability of Azolla N and urea N to rice using ¹⁵N. *Plant and Soil* 90: 293-299
- Ladha J K, Boonkerd N (1988) Biological nitrogen fixation by heterotrophic and phototrophic bacteria in association with straw. In *Proceedings of the First International Symposium on*

- Paddy Soil Fertility, Chiangmai, Thailand Dec 6-13, 1988. pp 173 - 187. ISSS
- Ladha J K, Padre A T, Punzalan G C, Watanabe I, De Datta S K (1988b) Ability of wetland rice to stimulate biological nitrogen fixation and utilize soil nitrogen. *In* Nitrogen fixation: hundred years after. pp 747-752. Eds. Bothe/de Bruijn/Newton. Gustav Fischer, Stuttgart, New York
- Ladha J K, Watanabe I, Saono S (1988c) Nitrogen fixation by leguminous green manure and practices for its enhancement in tropical lowland rice. *In* Sustainable Agriculture: Green Manure in Rice Farming. p 165-183. IRRI, PoBox 933, Manila, Philippines
- Ladha JK, Tirol-Padre A, Punzalan GC, Watanabe I (1987) Nitrogen-fixing (C₂H₂-reducing) activity and plant growth characters of 16 wetland rice varieties. *Soil Sci. Plant Nutr.* 33, 187-200
- Latorre C, Lee JH, Spiller H, Shanmugam KT (1986) Ammonium ion-excreting cyanobacterial mutants as a source of nitrogen for growth of rice: a feasibility study. *Biotec. Lett* 8: 507-512
- Lin Chang, Liu Chung-Chu, Zeng De-Yin, Tang Long-Fei, Watanabe I (1988) Reestablishment of symbiosis to Anabaena-free Azolla. *Zhونغguo Kexue* 30B: (7)700-708
- Lin Chang, Watanabe I (1988) A new method for obtaining Anabaena-free Azolla. *New Phytol* 108: 341-344
- Liu Chung-Chu (1979) Use of Azolla in rice production in China. pp. 375-394 *in* Nitrogen and Rice. IRRI, PO Box 933, Manila, Philippines
- Liu Chung-Chu (1984) Recent advances on Azolla research pp. 45-54 *in* Silver WS, Shröder EC eds. Practical application of Azolla for rice production. M Nijhoff/ W Junk pub
- Liu Chung-Chu (1987) Reevaluation of Azolla utilization in agricultural production, pp. 67-76 *in* Azolla utilization. IRRI PO Box 933, Manila, Philippines
- Lowendorf H S (1982) Biological nitrogen fixation in flooded ricefields. *Cornell Int. Agric. Mimeogr.* 96
- Lu Shu-Ying (1987) Method for using *Azolla filiculoides* sporocarp to culture sporophytes in the field. pp. 26-32 *in* Azolla utilization. IRRI PO Box 933, Manila, Philippines
- Lumpkin TA (1987) Environmental requirements for successful Azolla growth. pp. 89-97 *in* Azolla utilization. IRRI, PO Box 933, Manila, Philippines
- Lumpkin TA, Plucknett DL (1982) Azolla as a green manure. Westview Tropical Agriculture Series, Westview Press, Boulder Co, USA. 230 p
- Metting B, Pyne JW (1986) Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme and microbial technol* 8 (7): 385-394
- Mian NH, Stewart WDP (1985) Fate of nitrogen applied as Azolla and blue-green algae (Cyanobacteria) in waterlogged rice soils - a ¹⁵N tracer study. *Plant and Soil* 83: 363-370
- Mochida O (1987) Pests of Azolla and control practices. Text book for the training course on Azolla use. Fujian Acad Agric Sci and IRRI, Fuzhou, PRC, June 1987. 60 p
- Nayak, DN, Ladha JK, Watanabe I (1986) The fate of marker *Azospirillum lipoferum* inoculated into rice and its effect on growth, yield and N₂ fixation of plants studied by acetylene reduction, ¹⁵N₂ feeding and ¹⁵N dilution techniques. *Biol. Fert. Soils* 2: 7-14
- Ndoye I, Dreyfus B (1988) N₂ fixation by *Sesbania rostrata* and *Sesbania sesban* estimated using ¹⁵N and total N difference methods. *Soil Biol. Biochem.* 20, 209-213
- Neelekantan S, Rangaswami G (1965) Bacterisation of rice and okra seeds with *Azotobacter chroococcum* and establishment of the bacterium in the rhizosphere. *Curr. Sci.* 5: 157-159
- Norman MJT (1982) A role for legumes in tropical agriculture. pp 9-25 *in* Biological nitrogen fixation in tropical agriculture. PH Graham, SC Claris eds. Cento International de Agricultura Tropical, Cali, Columbia
- Pareek R P, Ladha J K and Watanabe I (1990) Estimation of N₂ fixation by *Sesbania rostrata* and *S. cannabina* in lowland rice soil by ¹⁵N dilution method. *Biol. Fert. Soils* (in press)
- Pedurand P, Reynaud PA (1987) Do Cyanobacteria enhance germination and growth of rice ? *Plant and Soil* 101: 235-240
- Postgate J (1990) Fixing the nitrogen fixers. *New Scientist* Feb 3 1990, 57-61
- Prot et al. 1992 (sous presse)
- Purushothaman D, Oblisami G, Balasundaram, CS (1976) Nitrogen fixation by *Azotobacter* in rice rhizosphere. *Madras Agric. J.* 63 : 595-599
- Reddy PM, Roger PA (1988) Dynamics of algal populations and acetylene reducing activity in five soils inoculated with blue-green algae. *Biol Fert Soils* 6:14-21
- Reynaud PA., Metting B (1988) Colonization potential of Cyanobacteria on temperate irrigated soils of Washington State, USA. *Biol. Agric. Hort.* 5: 197 - 208
- Rinaudo G, Alazard D, Moudiongui A (1988) Stem-nodulating legumes as green manure for rice in West Africa. *In* Green manure in rice farming. pp 97-109. The International Rice Research Institute, PO Box 933, Manila, Philippines

- Rinaudo G, Dommergues YD (1971) Validité de l'estimation de la fixation biologique de l'azote dans la rhizosphère par la méthode de réduction de l'acétylène. *Ann. Institut Pasteur* 121: 93-99.
- Roger PA (1991) Reconsidering the utilization of blue-green algae in wetland rice cultivation. pp 119-141 in *Biological N₂ fixation associated with rice production*, S.K Dutta and C. Sloger eds., Oxford & IBH Pub., New Delhi
- Roger PA, Grant IF, Reddy PM (1985a). Blue-green algae in India: a trip report. *Int. Rice Res. Inst.*, Los Baños, Philippines, 93 p
- Roger PA, Grant IF, Reddy PM, Watanabe I (1987a) The photosynthetic aquatic biomass in wetland rice fields and its effects on nitrogen dynamics. pp. 43-68 in *Efficiency of nitrogen fertilizers for rice*. IRRI, PO Box 933, Manila, Philippines
- Roger PA, Kulasooriya SA (1980) Blue-green algae and rice. IRRI, PO Box 933, Manila, Philippines. 112 p
- Roger PA, Ladha JK (1992) Biological nitrogen fixation in wetland ricefields: estimation and contribution to nitrogen balance. pp. 000-000 in J.K. Ladha and Ben Bohol eds. *Nitrogen fixation in Sustainable Agriculture* (sous presse)
- Roger PA, Reddy PM, Remulla-Jimenez R (1988) Photodependant acetylene reducing activity (ARA) in ricefields under various fertilizer and biofertilizer management. *In Nitrogen fixation: hundred years after*. p 827. Eds. Bothe H, de Bruijn F J, Newton W E, Gustav Fischer
- Roger PA, Santiago-Ardales S (1991) USAID-funded subproject on nitrogen excreting blue-green algae, Final report. 64 pp IRRI PO Box 933, Manila, Philippines
- Roger PA, Santiago-Ardales S, Reddy PM, Watanabe I (1987b) The abundance of heterocystous blue-green algae in rice soils and inocula used for application in rice fields. *Biol Fert Soils* 5: 98-105
- Roger PA, Tirol A, Ardales S, Watanabe I (1986b) Chemical composition of cultures and natural samples of N₂-fixing blue-green algae from rice fields. *Biol Fert Soils* 2: 131-146
- Roger PA, Watanabe I (1986) Technologies for utilizing biological nitrogen fixation in wetland rice: potentialities, current usage, and limiting factors. *Fert. Res.* 9: 39-77
- Roger PA, Zimmerman WJ, Lumpkin T (1991) Microbiological management of wetland rice fields. pp.000-000 in Metting B ed., *Soil Microbial Technologies*. Marcel Dekker pub (in press)
- Rosegrant MW, Roumasset JA, Balisacan A. (1985) Biological technology and agricultural policy: an assessment of *Azolla* in Philippine rice production. *Amer. J. Agric. Econ.* 67: 726-732
- Sampaio MJA, Fiore MF, Ruschel AP (1984) Utilization of radioactive phosphorus (³²P) by *Azolla-Anabaena* and its transfer to rice plants. pp. 163-167 in Silver WS, Shröder EC *Practical application of Azolla for rice production*. M Nijhoff/ W Junk pub
- Sen, M.A. (1929) Is bacteria association a factor in nitrogen assimilation by rice plant ? *Agric. J. India* 24: 229
- Stone B (1990) Evolution and diffusion of agricultural technology in China. Pages 35-93 in NG Kotle ed. *Dharing innovation, global perspectives of food, agriculture and rural development*. IRRI PO Box 933, Manila, Philippines
- Strasburger, E. (1873). *Über Azolla*. Verlag von Ambr. Abel Jena, Leipzig
- Sundara WVB, Mann HS, Paul NB, Mathur SP (1962) Bacterial inoculation experiments with special references to *Azotobacter*. *Indian J. Agric. Sci.* 33: 279-290
- Tirol AC, Roger PA, Watanabe I (1982) Fate of nitrogen from a blue-green alga in a flooded rice soil. *Soil Sci Plant Nutr* 28: 559-570
- Tirol-Padre A, Ladha JK, Punzalan GC, Watanabe I (1988) A plant sampling procedure for acetylene reduction assay to detect rice varietal differences in ability to stimulate N₂ fixation. *Soil Biol. Biochem.* 20, 175-183
- Troldenier G (1987) Estimation of associative nitrogen fixation in relation to water regime and plant nutrition in a long-term pot experiment with rice. *Biol. Fert. Soils* 5, 133-140
- Venkataraman GS (1981) Blue-green algae for rice production. A manual for its promotion. *FAO Soil Bull.* n° 46. 102 p
- Ventura W, Mascarinia GB, Furoc RE, Watanabe I (1987) *Azolla* and *Sesbania* as biofertilizers for lowland rice. *Philipp. J. Crop Sci.* 12:61-69
- Watanabe A, Nishigaki S, Konishi C (1951) Effect of nitrogen fixing blue green algae on the growth of rice plant. *Nature (London)* 168: 748-749
- Watanabe I (1982) *Azolla-Anabaena* symbiosis, its physiology and use in tropical agriculture. pp. 169 -185 in *Microbiology of tropical soils*, Dommergues YR, Diem HG eds. M Nijhoff ed.
- Watanabe I (1984) Use of green manures in Northeast Asia. In: *Organic matter and rice*. IRRI (Los Baños), Philippines, pp 229-234

- Watanabe I (1987) Summary report of the Azolla program of the International Network on Soil Fertility and Fertilizer Evaluation for Rice. pp. 197-205 in *Azolla utilization*. IRRI, PO Box 933, Manila, Philippines. 296 p
- Watanabe I, Berja NS (1983) The growth of four species of *Azolla* as affected by temperature. *Aquatic Botany* 15: 175-185
- Watanabe I, Berja NS, Del Rosario DC (1980) Growth of *Azolla* in paddy fields as affected by phosphorus fertilizer. *Soil Sci Plant Nutr* 26: 301-307
- Watanabe I, De Datta SK, Roger PA (1988) Nitrogen cycling in wetland rice soils. pp 239-256 in *Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems*. Wilson JR ed, C.A.B. Internatnl.
- Watanabe I, Lapis MT, Oliveros R, Ventura W (1988) Improving phosphate fertilizer application to *Azolla*. *Soil Sci Plant Nutr* 34 (4) 000-000
- Watanabe I, Lin C (1984) Response of wetland rice to inoculation with *Azospirillum lipoferum* and *Pseudomonas* sp. *Soil Sci. Plant Nutr.* 30: 117-124
- Watanabe I, Roger P A (1984) Nitrogen fixation in wetland rice fields. *In Current development in biological nitrogen fixation*. pp 237-276. Ed. Subba Rao. Oxford and IBH pub Co
- Watanabe I, Yoneyama T, Padre B, Ladha JK (1987) Difference in natural abundance of ^{15}N in several rice (*Oryza sativa* L.) varieties: application for evaluating N_2 fixation. *Soil Sci. Plant Nutr.* 33: 407-415
- Watanabe I, Yoneyama T, Talukdar H, Ventura W 1990 The contribution of atmospheric N_2 to *Azolla* spp. growth in flooded soils *Soil Sci. Plant Nutr.* 36, 000-000
- Watanabe, I., Lin, C., and Santiago-Ventura, T. (1989). Responses to high temperature of the *Azolla-Anabaena* association, determined in both the fern and in the cyanobacterium. *New Phytol.* 111: 625-630
- Wei Wen-Xiong, Jin Gui-Ying, Zhang Ning (1986) Preliminary report on *Azolla* hybridization studies (in Chinese). *Bull Fujian Acad Agric Sci* 1: 73-79
- Willis WH, Green VE (1948) Movement of nitrogen in flooded soils planted to rice. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 13, 229-237
- Wilson JT, Eskew DL, Habte M (1980) Recovery of nitrogen by rice from blue-green algae added in a flooded soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44: 1330-1331
- Yoneyama T, Ladha J K and Watanabe I 1987 Nodule bacteroids and *Anabaena*: natural ^{15}N enrichment in the legume-rhizobium and *Azolla-Anabaena* symbiotic systems. *J. Plant Physiol.* 127, 251-259
- Yoshida T, Rinaudo G (1982) Heterotrophic N_2 fixation in paddy soils. *In Microbiology of Tropical Soils and Plant Productivity*. pp 75-107. Eds. Dommergues Y R and Diem H G. Martinus Nijhoff and Junk W
- Yoshida T, Ancajas RR (1971) Nitrogen fixation by bacteria in the root zone of rice. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 35: 156-157
- Zhu Zhao-liang, Liu Chong-qun, Jiang Bai-fan (1984) Mineralization of organic nitrogen, phosphorus, and sulfur in some paddy soils of China. *In Organic Matter and rice*. pp 259-272. The International Rice Research Institute, PO Box 933, Manila, Philippines