

République du Sénégal

MINISTÈRE DU DÉVELOPPEMENT
RURAL ET DE L'HYDRAULIQUE

INSTITUT SÉNÉGALAIS
DE RECHERCHES AGRICOLES

F0000267

*ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION
DE SOUCHES DE RHIZOBIUM DE PROSOPIS
PROVENANT DE DIFFÉRENTES ZONES ÉCOLOGIQUES*

RAPPORT CHERCHEURS ASSOCIÉS ORSTOM

Ousmane DIAGNE
Chercheur DRPF/ISRA

1. INTRODUCTION

L'objectif du projet est de contribuer à l'amélioration de la productivité des Prosopis par la voie symbiotique c'est-à-dire en utilisant les propriétés des microorganismes associés à ces arbres. Pour cela, il est nécessaire de connaître l'état symbiotique des espèces étudiées dans différentes conditions. Le projet est focalisé sur l'étude des Rhizobium associés aux Prosopis mais l'association de ces derniers avec les champignons endomycorhiziens est également prise en compte.

Il s'agit, dans ce travail, d'isoler, de caractériser et de sélectionner des souches de Rhizobium (sens large) et de champignons endomycorhiziens susceptibles d'être utilisées avec succès dans les conditions édapho-climatiques du Sénégal. Les effets de ces microorganismes (capacité à former des symbioses, augmentation de la productivité des arbres) sont déterminés en comparant les performances des plants inoculés et non inoculés ou fertilisés en utilisant plusieurs méthodes : réduction de l'acétylène, méthode de dosage Kjeldahl, méthode isotopique de dosage d'azote. Ces effets sont évalués au laboratoire, en pépinière et au champ.

II. MATERIEL ET METHODES

2.1. Observation de la nodulation

A cause de la difficulté d'obtenir des nodules directement sur des arbres adultes, cette étude a été souvent conduite en pépinière sur de jeunes plants en utilisant la méthode dite de piégeage de Rhizobium. Plusieurs tournées ont été effectuées pour collecter des échantillons de sol provenant de différentes localités du Sénégal. Les échantillons ont été prélevés entre 5 et 15 cm de profondeur et préférentiellement sous des espèces fixatrices d'azote.

Des sachets en plastique de 10 cm x 22 cm de dimensions, ont été remplis des échantillons de sol. Avant les semis, les

graines ont été lavées à l'eau courante puis stérilisées avec de l'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) pendant une période de 15 mn à 2 h selon les espèces. Après 3 à 4 mois de culture, les sachets ont été coupés dans le sens de la longueur et le sol dégagé des racines. La nodulation a été examinée et quelques nodules prélevés pour de futurs isollements de Rhizobium.

2.2. Isolement et testage de souches de Rhizobium

Les nodules prélevés ont été lavés à l'eau courante puis stérilisés superficiellement par immersion dans 0,1 % de chlorure mercurique ($HgCl_2$) pendant 3 mn. Ensuite ils ont été écrasés dans une goutte d'eau stérile et la suspension obtenue étalée sur un milieu composé à base de mannitol et d'extrait de levure (YEMA). Après une croissance appropriée dans une étuve à $30^{\circ}C$, une colonie a été prélevée et réétalée sur un nouveau milieu pour vérifier sa pureté avant d'être finalement transférée dans un tube contenant le même milieu YEMA jusqu'à l'utilisation de l'isolat. Les souches de collection ont été stockées à $-80^{\circ}C$ dans 50 % de glycérol mélangé au milieu liquide YEM.

Les différents isolats inoculés à plusieurs hôtes pour déterminer leur infectivité et effectivité. Les plants ont été cultivés soit en tubes GIBSON soit sur sol stérilisé dans des pots avec du milieu JENSEN comme source d'éléments nutritifs. Chaque plant a été inoculé avec 1 ml de suspension bactérienne à l'exception des témoins. Après 3 à 4 mois de culture, les nodules et les différentes parties des plants ont été séparés, séchés à $60^{\circ}C$ et pesés avant les analyses ultérieures.

2.3. Caractérisation des souches isolées

2.3.1. Galleries "API"

a)- Principe des galleries

Les souches isolées ont été caractérisées par l'utilisation des galleries "API" Cette méthode a été mise au

point pour l'étude des caractéristiques nutritionnelles des bactéries Gram négatives en général. Les tubes ou galeries utilisés contiennent, sous forme déshydratée, des substrats différents en concentration déterminée. Pour ces substrats, l'apparition d'une croissance visible à l'oeil nu, est recherchée.

Dans le cas, par exemple, de l'étude du métabolisme des hydrates de carbone des microorganismes, la galerie AP1 50 CH est constituée de 50 microtubes API comportant chacun une zone d'anaérobiose (le tube), pour les études de fermentation et une zone d'aérobiose (la cupule), pour les études d'oxydation et d'assimilation. Le premier tube, sans principe actif, sert de témoin négatif. Les tubes suivants contiennent chacun une quantité définie de substrat déshydraté, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés. Ces substrats peuvent être métabolisés dans plusieurs voies : l'assimilation, l'oxydation et la fermentation.

b)- Mode opératoire

. Préparation de l'inoculum : les souches de *Rhizobium* sont cultivées sur un milieu approprié (YEMA). Après une bonne croissance, une colonie isolée, pure est prélevée et remise en culture sur un milieu neuf contenu dans un tube.

. Inoculation de la galerie : la suspension bactérienne est répartie dans les 50 tubes de la galerie à l'aide d'une pipette stérile. A la suite de la dernière inoculation, deux gouttes de la suspension bactérienne sont déposées sur une boîte de Pétri contenant du milieu YEMA pour contrôler la viabilité de la souche testée.

. Lecture de la galerie : après 1, 2, 4 et 7 jours d'incubation à 30°C, deux paramètres sont estimés pour la lecture des réactions observées : l'intensité (croissance des bactéries) et la vitesse d'apparition des réactions.

.../...

2.3.2. Electrophorèse SDS-PAGE

Le système électrophorétique discontinu en présence de SDS permet de concentrer les protéines préalablement diluées dans les échantillons en des zones extrêmement fixes, avant qu'elles soient séparées en fonction de leur taille dans le gel résolutif.

Le tampon de gel de concentration dilué au 1/4 additionné de 0,1 % SDS, est éliminé des puits et remplacé par une solution de tampon d'électrode Tris (0,024M) Glycine (0,19M), pH 8,6. Tous les puits sont numérotés et les échantillons sont déposés dans les puits à l'aide d'une seringue combinée à un appareil de mesure. Le volume ajouté avec ce même tampon, contenant 0,0001 % de bleu de Bromophénol et de 2 % de SDS vers un volume final de 10 ml. Le réservoir du tampon d'électrode supérieure est fixé à la cassette et rempli de tampon d'électrode Tris-Glycine-SDS fraîchement préparé.

L'électrophorèse se fait la nuit sous une intensité de 6 mA pour chaque gel. A la fin de l'électrophorèse, le gel résolutif est récupéré et immédiatement mis dans une solution de fixation pendant au moins 60 minutes. La fixation est suivie par la coloration des protéines.

2.4. Etude des endomycorhizes

Plusieurs échantillons de racines des Prosopis étudiés ont été collectés à partir de différents sols ou après piégeage. Elles ont été éclaircies et colorées par la méthode de PHILLIPS et HAYMAN (1970). L'état mycorhizien des arbres a été déterminé après visualisation des structures racinaires et selon le pourcentage des racines infectées (GIOVANNETTI et MOSSE, 1980).

Six souches d'endomycorhizes reçues de laboratoires étrangères ont été multipliées en utilisant les racines de plantes maraîchères. Ces souches sont Glomus mosseae, G. fasciculatum, G. margarita, G. etunicatum, G. microcarpum et

Scutel la heterogama. Après deux mois de culture, les racines des plantes hôtes infectées ont été stockées dans des sachets plastiques à 4°C pour une utilisation ultérieure.

2.5. Test d'inoculation

Ce test d'inoculation a été fait sur plusieurs provenances de *Prosopis* sp. cultivées sur un sol de pépinière. Le sol utilisé était un mélange de deux volumes de sable pour trois volumes de sol humifère prélevés à Mbao, dans la Région de Dakar. Il s'agissait d'un mélange essentiellement sableux, pauvre en azote et en phosphore et légèrement alcalin (tableau 1).

Les lots de graines de *Prosopis* sp. utilisés proviennent de différentes localités de l'Equateur et ont été numérotés comme suit : 89/2361 (Chongon), 89/2362 (Gomez Rendon), 89/2363 (Aña Blanca), 89/2364 (Zapotillo), 89/2371 (Rio Chico), 89/2372 (Roca Fuerte), 89/2373 (Santa Ana). Une provenance du Sénégal de *P. juliflora* (86/1516 Thiès) a été également utilisée comme base de comparaison avec les provenances équatoriennes. Les graines ont été stérilisées superficiellement à l'acide sulfurique concentré puis prégermées sur du coton hydrophile à 30°C.

Après germination, les graines ont été repiquées dans des sachets contenant le sol de pépinière. Après deux semaines de culture, les jeunes plants ont été inoculés avec une souche de *Rhizobium*, à raison de 10 plants inoculés et 10 plants non inoculés par provenance. L'arrosage était fait deux fois par jour avec l'eau de robinet.

L'expérience a duré 14 semaines. La réponse à l'inoculation a été estimée en comparant les plants inoculés et les plants non inoculés au niveau de chaque provenance. A la fin de l'expérience, les plants ont été dépotés. Les nodules ont été prélevés, lavés et séchés à l'étuve à 65°C pendant 48 h. Les parties aériennes et les racines ont été séparées puis séchées à 65°C pendant 72 h. les variables suivantes ont été évaluées :

.../...

Tableau 1 : Caractéristiques physiques et chimiques du sol de pépinière

Sable grossier (%)	54,3	C/N	9,5
Sable fin (%)	38,9	P ₂ O ₅ total (‰)	0,21
Limon (%)	2,0	P ₂ O ₅ assimilable (‰)	0,11
Argile (%)	4,3	Ca ⁺⁺ (%)	9,97
Matière organique (%)	0,6	Mg ⁺⁺ (%)	0,53
pH (KCl)	7,8	K ⁺ (%)	0,09
c (‰)	3,5	Na ⁺ (%)	0,08
N (‰)	0,37		

hauteur des plants, poids sec des parties aériennes et des racines, nombre et poids sec des nodules.

2.6. Essai au champ

Un essai intitulé Comportement de *Prosopis juliflora* inoculé avec une culture mixte *Rhizobium*-MAV, a été installé à la station expérimentale ISRA de Sangalkam, située à 30 km de Dakar. Il s'agit d'un essai de 300 plants dont 150 plants inoculés avec du *Rhizobium* et une culture de champignons endomycorhiziens et 150 non inoculés (témoins). Il comprend 6 répétitions et 74 arbres de bordure. Il a été mis en place en 1991.

III. RESULTATS

3.1. Symbiose *Prosopis*-microorganismes

Une seule expérience de piégeage de *Rhizobium* et de champignons endomycorhiziens a été effectuée pour le moment. Elle a été faite à partir du sol de Hann avec les espèces suivantes : *Prosopis africana*, *P. juliflora*, *P. chilensis*, *P. spicigera* et *P. tamarugo*.

Toutes ces espèces ont nodulé et formé des endomycorhizes à partir du sol utilisé. Cependant, le taux de nodulation et d'endomycorhization semble lié à l'espèce considérée comme le montre le tableau 2.

3.2. Testage de souches

Une vingtaine de souches de *Rhizobium* est en train d'être testée sur *Prosopis juliflora* essentiellement. Le tableau 3 montre les résultats obtenus après testage de 7 souches de *Rhizobium* sur *P. juliflora*. Ces souches ont toutes nodulé leur plante hôte. La nodulation a varié selon les souches. C'est ainsi que des souches corne Pj 47, Pj 46 et Pj 48 ont donné une masse de nodules deux à cinq fois plus élevée que les souches Pc

TABLEAU 2 : Taux de nodulation et d'endomycorhization de 5 espèces de Prosopis

TAUX	E S P E C E S				
	P. africana	P. chilensis	P. juliflora	P. specigera	P. tamarugo
Nombre de nodules par plant	2	10	8	6	6
Pourcentage de racines endomycorhizées	84	98	100	94	88

TABLEAU 3 : Testage de souches de Rhizobium

Souches	Nbre de nodules/pl	Poids sec nodules/pl (mg)	Haut. moy. des plants (cm)	Poids sec parties aériennes(mg)	Poids sec racines (mg)
Pc 45	10	7,5	9,6	116	66
Pj 47	16	16,25	10,7	166,5	90
Pj 48	14	13,6	11,2	133	70
Pj 46	17	14,8	13	280	100
Pj 34	26	10,4	10,3	133	61
Pj 35	13	5,5	8,7	121	55
620	3	1,4	8,7	133	55
T	0	0	8,8	120	63

45, Pj 35 et 620 (souche de collection). Bien que des calculs statistiques n'ont pas encore été faits, il semble que la hauteur des plants inoculés ne soient pas significativement différente de celle des plants non inoculés. Par ailleurs, la différence de poids sec des parties aériennes et de poids sec des racines entre les plants inoculés et les plants non inoculés, varie selon les souches considérées.

3.3. Caractéristiques des souches de Rhizobium

Les données recueillies sur l'électrophorèse SDS-PAGE et les galeries AP1 des souches de Rhizobium de Prosopis sont en train d'être analysées à Gand (Belgique) par Philippe DELAJUDIE, chercheur à l'ORSTOM. Pour le moment, les premiers résultats obtenus montrent que les souches testées sont classées dans plusieurs groupes différents par rapport aux Rhizobium déjà connus.

3.4. Testage d'inoculation de 8 provenances de Prosopis sp. et P. juliflora

Les résultats de cette expérience ont montré que l'inoculation avec une souche de Rhizobium a permis d'augmenter la hauteur, la biomasse aérienne, la biomasse racinaires; le nombre de nodules et le poids sec des nodules de plusieurs provenances de Prosopis sp. et de P. juliflora cultivées en conditions normales sur un sol non stérilisé. Cependant, les provenances ont répondu différemment à l'inoculation.

Après trois mois de croissance, la hauteur des plants inoculés a augmenté de 31 % (provenance 2361) à 147 % (provenance 2371), le poids sec des tiges de 15 % (provenance 2363), à 213 % (provenance 2371) et le poids sec des racines de 12 % (provenance 1516) à 231 % (provenance 2371) (fig. 1 à 3). Les résultats obtenus sur la nodulation suggèrent que la souche de Rhizobium introduite dans le sol de pépinière est plus efficace que la (ou les) souche(s) autochtone(s). Elle a augmenté le nombre et le poids sec des nodules de plus de huit fois dans le cas des meilleures provenances (figure 4 et 5).

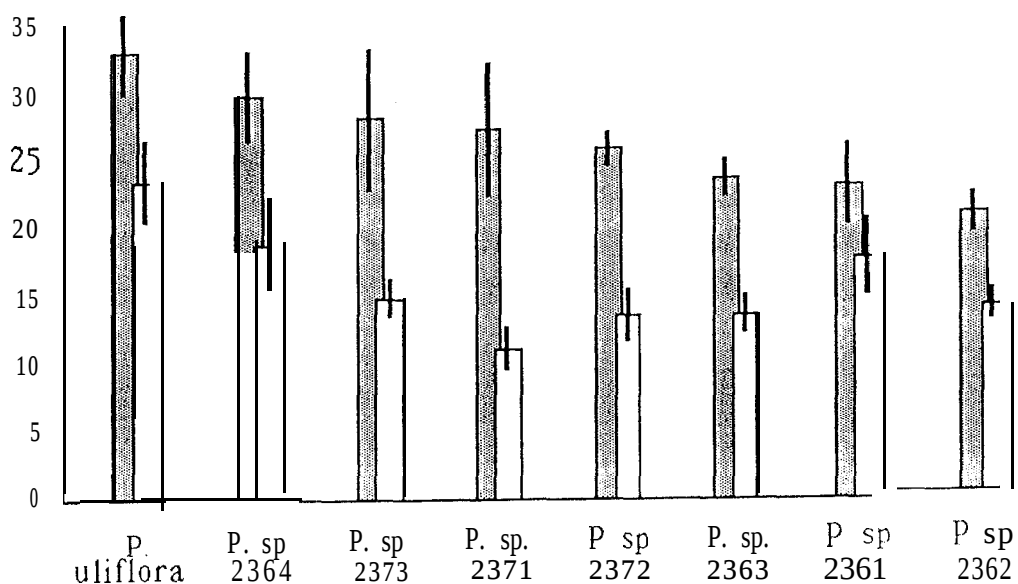


Figure 1 : Hauteur des plants (cm)

■ Plants inoculés □ Plants non inoculés

| Intervalle de confiance

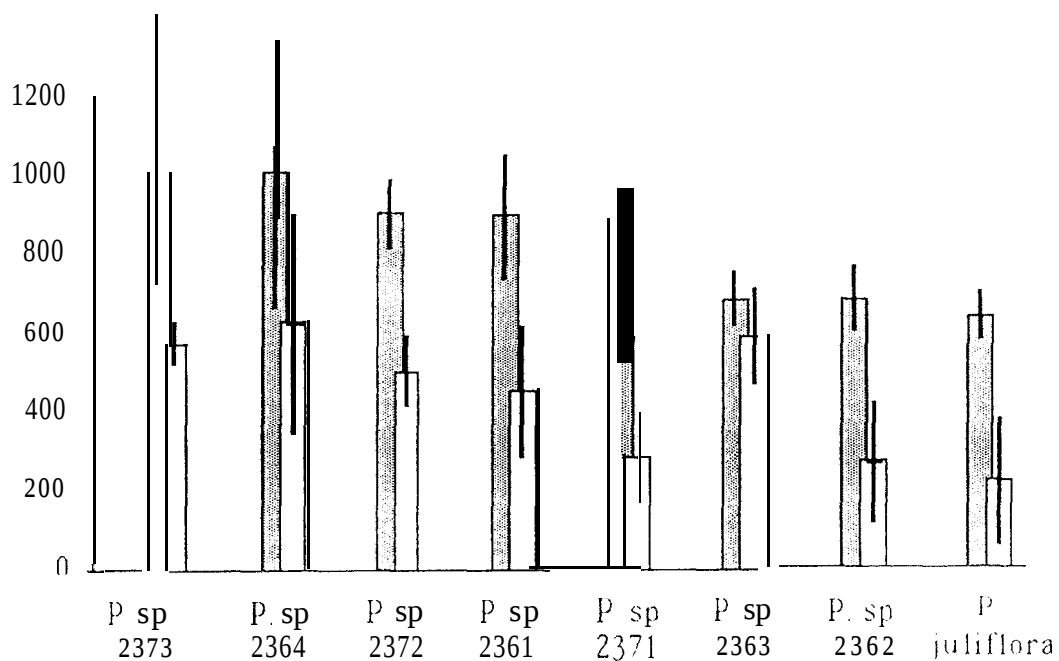


Figure 2 : Poids sec des parties aériennes (mg)

■ Plants inoculés □ Plants non inoculés

| Intervalle de confiance

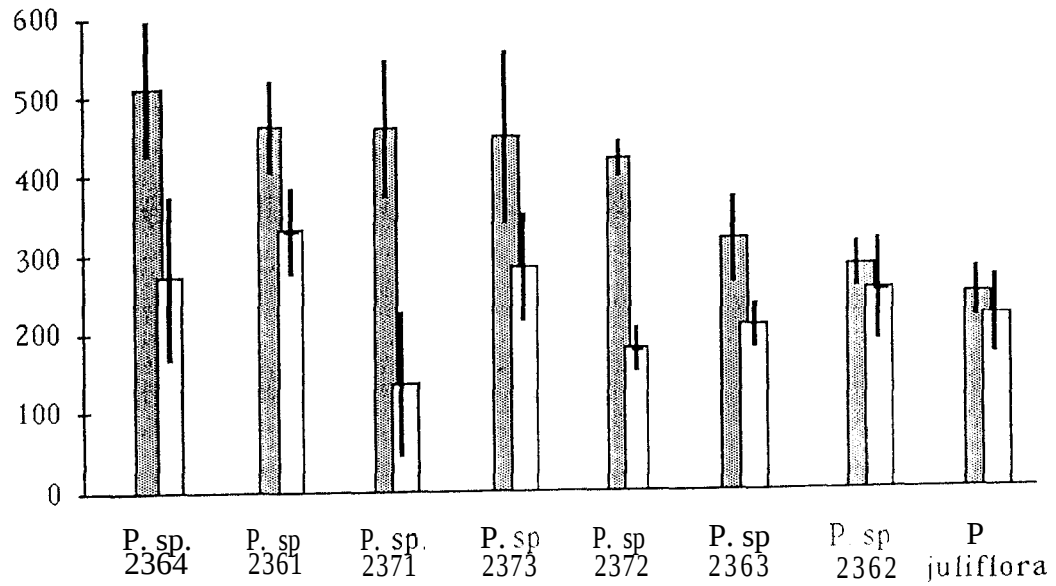


Figure 3 : Poids sec des racines (mg)

Plants inoculés
 Plants non inoculés
 Intervalle de confiance

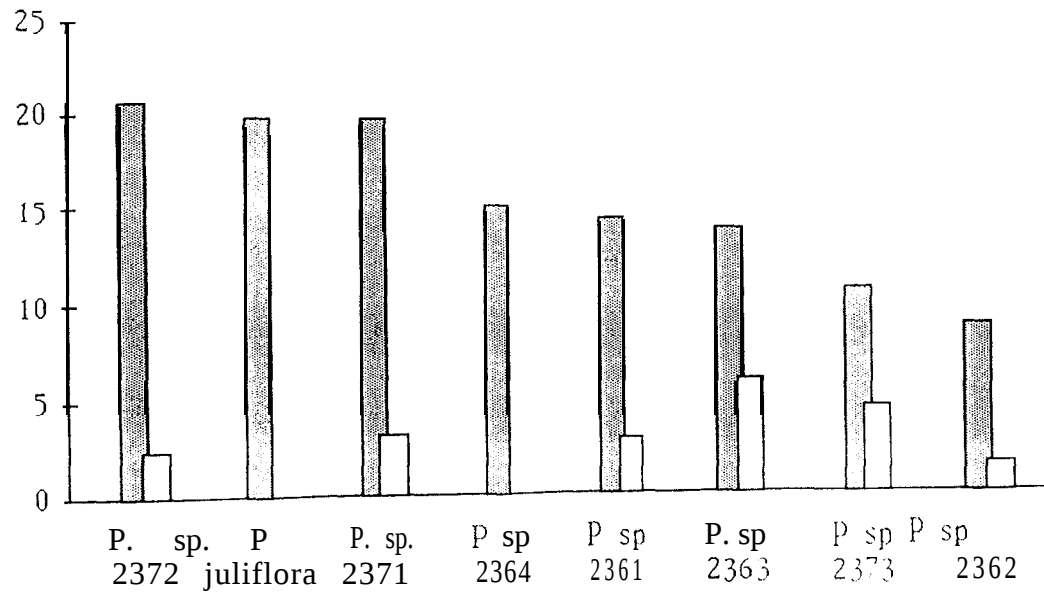
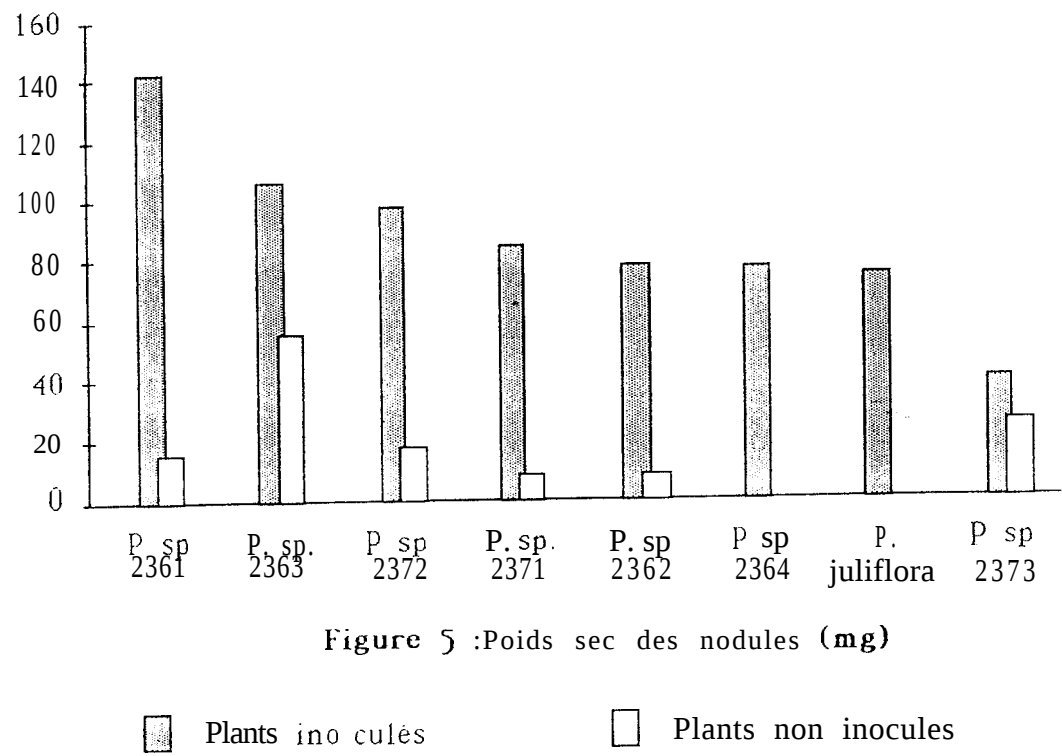


Figure 4 : Nombre de nodules

Plants inoculés
 Plants non inoculés



3.5. Essai au champ

Les premières données de l'essai au champ sont en train d'être exploitées. Il s'agit de mensurations de la hauteur des plants âgés de 3, 8 et 12 mois ainsi que des taux de survie après 1 an de plantation.

IV. CONCLUSIONS

L'étude entreprise dans le cadre de ce projet a permis de connaître l'état symbiotique de plusieurs espèces de *Prosopis* cultivées dans certains sols du Sénégal. Ces derniers renferment des *Rhizobium* (sens large) et des champignons endomycorhiziens capables d'infecter les racines de *Prosopis africana*, la seule espèce locale, et d'autres espèces introduites telles que *P. juliflora*, *P. chilensis*, *P. spicigera* et *P. tamarugo*. Les inoculations de *Rhizobium* ont montré qu'il est possible, dans des conditions normales de pépinière, de trouver des souches capables d'augmenter la hauteur, la biomasse aérienne et racinaire et de la nodulation de jeunes plants de *Prosopis*. Une collection de ces souches est actuellement disponible. Les résultats relatifs à la caractérisation des souches de *Rhizobium* sont encore fragmentaires. Les premières données obtenues après l'électrophorèse SDS-PAGE semblent montrer que les *Rhizobium* de *Prosopis* n'ont pas une place bien définie par rapport aux autres groupes de *Rhizobium* connus.

Certaines activités prévues les deux premières années n'ont pu être menées à temps à cause de quelques difficultés techniques et financières : arrivée tardive de matériel commandé (pièces pour lyophilisateur, galeries API), versement tardif des crédits . . . C'est la raison pour laquelle je souhaite continuer certaines opérations, surtout la caractérisation des souches de *Rhizobium* en collaboration avec MM. Marc NEYRA et Philippe DE LAJUDIE du laboratoire de Microbiologie de l'ORSTOM.

RAPPORT FINANCIER
Septembre 1990 - septembre 1992

1 Relevé des dépenses

Matériel et fournitures	1 509 349
Main-d'oeuvre temporaire	542 909
Déplacements	122 400
Entretien véhicule	91 500
Carburant-lubrifiant	364 000
Analyses	149 454
T O T A L	2 779 612

2. Balance

Une somme de 3 457 586 F était déléguée au projet. Les dépenses s'élèvent à 2.779.612. En ce moment le disponible est de 677.974 F.

Note

Il est prévu, avec le disponible, de faire des visites sur le lieu où l'essai au champ a été installé, d'entretenir la parcelle expérimentale et de recruter de la main-d'oeuvre temporaire pour les premières mesures à faire.

PLAN POUR LA PROCHAINE
PERIODE DE RECHERCHE

1. Etude des Rhizobium de Prosopis

Les sélections de souches de Rhizobium nodulant Prosopis vont être poursuivies en mettant cette fois l'accent sur les relations Rhizobium-espèces de Prosopis d'une part et Rhizobium-provenances de Prosopis d'autre part. La caractérisation et l'identification des nouvelles souches isolées va être conduite en même temps que l'interprétation des récentes données de caractérisation.

2. Etude sur les endomycorhizes

Les souches d'endomycorhizes en collection seront testées sur les différentes espèces de Prosopis pour voir leurs effets sur la croissance et la production de biomasse de ces dernières. Elles seront comparées avec un échantillon de souches autochtones. L'inoculation d'endomycorhizes sera couplée à l'inoculation avec une ou plusieurs souches de Rhizobium pour tester son efficacité sur la fixation d'azote de Prosopis.

3. Essai au champ

Les premières données de l'essai au champ déjà installé seront exploitées pour estimer l'effet des souches introduites dans le sol sur la croissance des plants et leur taux de survie.

BUDGET PREVISIONNEL
POUR LA TROISIEME ANNEE DU PROJET

<u>Rubriques</u>	<u>Montant (F CFA)</u>
Fournitures et petit matériel	600 000
Documentation	50 000
Frais d'analyse	100 000
Frais de déplacement	200 000
Maintenance véhicule	100 000
Carburant, lubrifiant	210 000
Personne 1 tempora i re	240 000
T O T A L	1 500 000