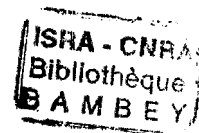


CN890017
P348
GUE

x 1989/30



REPUBLIQUE DU SENEGAL

MINISTERE DU DEVELOPPEMENT RURAL

INSTITUT SENEGALAIS DE
RECHERCHES AGRICOLES

DIRECTION DES RECHERCHES SUR
LES PRODUCTIONS VEGETALES

PROGRAMME MIRCOEN

PROGRAMME DE CONTROLE DE LA QUALITE DES INOCULUMS
DE RHIZOBIUM AU SENEGAL

Par

Namadou GUEYE

Dans le cadre du cours régional FAO/AIEA sur
L'application des isotopes et des rayonnements
à l'étude de la fixation biologique de l'azote
et des relations sol/nutrition des plantes.

Bambeey
21 août-15 Septembre 1989

Centre National de Recherches
Agronomiques de Bambeey

PROGRAMME DE CONTROLE DE LA QUALITE DES INOCULUMS DE RHIZOBIUM AU SENEGAL

Mamadou GUEYE, MIRCEN-CNRA, B.P. 53, Bambey, Sénégal.

1. INTRODUCTION

La qualité d'un inoculum requiert deux caractéristiques fondamentales : la qualité et la quantité de Rhizobium contenus dans l'inoculum. Le contrôle de la qualité d'un inoculum consiste à estimer le nombre et à identifier le type de Rhizobium dans l'inoculum pendant sa durée d'utilisation recommandée.

Au Sénégal, les recherches sur la Fixation Biologique de l'Azote (FBA) par les différentes légumineuses se poursuivent et s'intensifient. Des résultats très encourageants ont été obtenus et pourraient déboucher sur une valorisation des techniques de la FBA, particulièrement l'utilisation des inoculums de Rhizobium pour le reboisement des zones à Acacia, la culture du Soja, du haricot et à un moindre degré la culture de l'arachide et du niébé.

Actuellement, beaucoup de sociétés industrielles et de laboratoires fabriquent des inoculums qu'ils testent dans les stations expérimentales. Cependant, il n'existe pas encore au Sénégal une politique de contrôle des inoculums produits. C'est pourquoi l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA), en collaboration avec l'Organisation des Nations Unies pour l'Education, la Science et la Culture (UNESCO) a mis en place au Centre National de Recherches Agronomiques (CNRA) de Bambey, un Centre de Ressources Microbiologiques (MIRCEN). Le principal objectif de ce MIRCEN est (i) de constituer une collection de Rhizobium, (ii) de développer une unité de production d'inoculum de Rhizobium et (iii) de contrôler la qualité de tout inoculum produit ou introduit au Sénégal puis d'en assurer la manufacture.

Le programme intensif de sélection des souches de Rhizobium à travers le réseau des MIRCENS, a conduit à une collection de souches très efficaces disponibles pour tous les fabricants d'inoculum : la souche NAO 113, isolée au CNRA de Bambey et sélectionnée pour la culture de Voandzou est une contribution appréciable du MIRCEN de Bambey à ce programme.

2. QUALITE D'UN INOCULUM

Pour une légumineuse donnée, un inoculum de Rhizobium doit avoir une forte densité de Rhizobium viables et infectifs. Il est donc nécessaire d'identifier et d'estimer de manière très fiable les Rhizobium contenus dans l'inoculum afin de pouvoir en recommander le taux d'application. Sous l'autorité et la responsabilité de l'ISRA, le MIRCEN de Bambey a développé un programme simple pour contrôler la qualité des inoculums produits ou introduits au Sénégal.

Un inoculum de bonne qualité doit satisfaire aux conditions suivantes :

- l'inoculum doit renfermer un ou des Rhizobium infectifs et effectifs. Il est recommandé d'avoir des inoculums monogermes plutôt que des inoculums multisouches.

- l'inoculum doit fournir un minimum de 10^9 à 10^{10} Rhizobium par graine jusqu'à la date d'expiration. Le tableau 1 indique le nombre approximatif de Rhizobium requis pour différents types de légumineuses. Ce nombre requis est fortement dépendant de la taille des graines.

- le support de l'inoculum ne doit pas être létal pour les Rhizobium et il doit avoir des propriétés d'adhérence satisfaisante sur les graines.

le sachet d'inoculum doit mentionner les renseignements ci après :

- . type de légumineuse et variété de la légumineuse pour laquelle l'inoculum est destiné.
- . taux d'application (dose) de l'inoculum.
- . température maximale de conservation de l'inoculum
- . date d'expiration de l'inoculum.

3. CONTROLE DE LA QUALITE DE L' INOCULUM

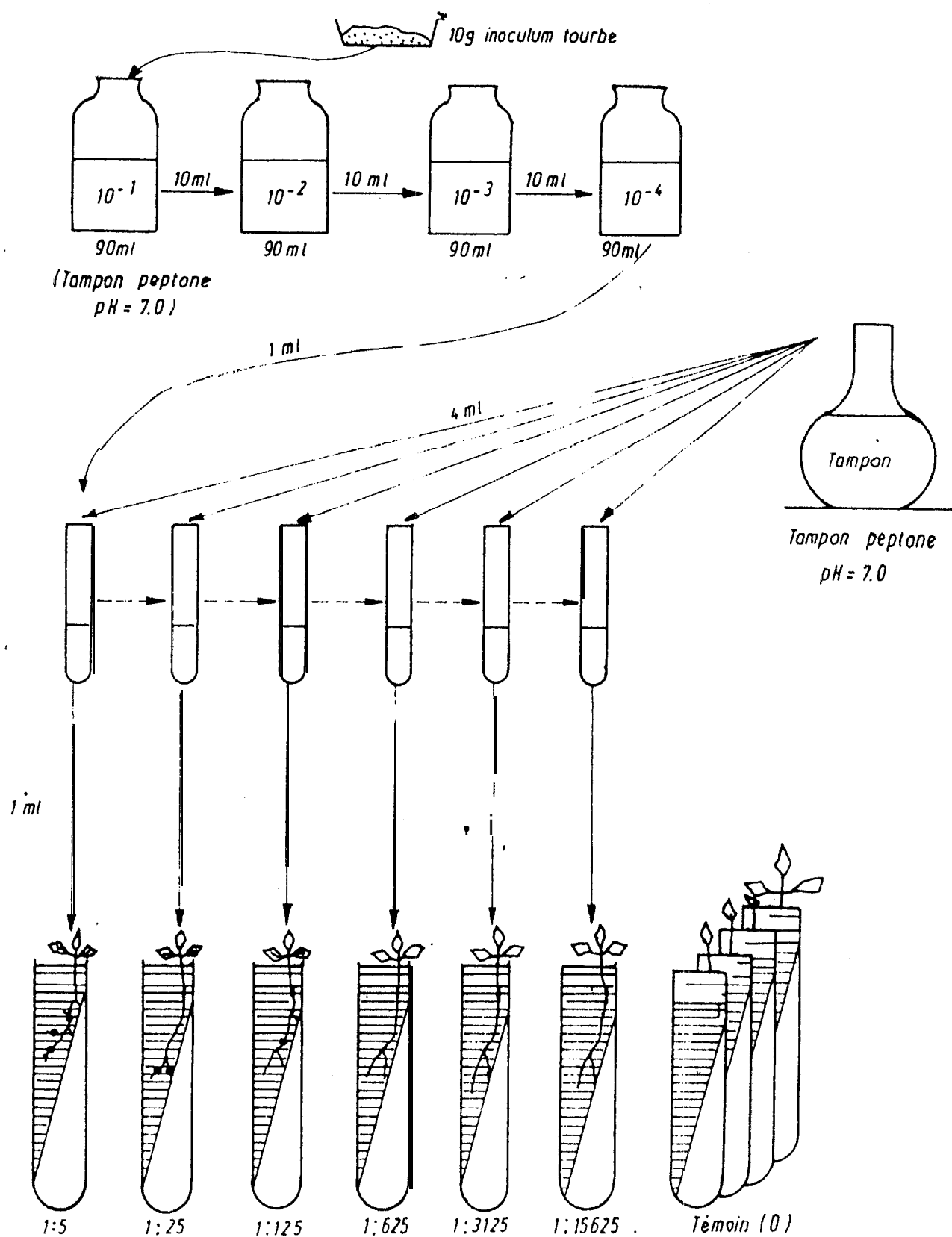
Le principe de contrôle de la qualité d'un inoculum est schématisé à la Fig. 1. Il s'agit d'estimer le nombre le plus probable (MPN) de Rhizobium et d'identifier le type de Rhizobium contenu dans l'inoculum. Le contrôle de la qualité d'un inoculum est basé sur les hypothèses suivantes :

Dans un milieu dépourvu d'azote, quand une légumineuse est inoculée avec un Rhizobium spécifique, il y a formation de nodules sur le système racinaire.

Table 1 : Nombre de Rhizobium viables et infectifs requis par graine pour une fixation efficiente d'azote.

Légumineuses	Taille de la graine (nombre de graines/kg)	Nombre de Rhizobium par graine
	petite	
Trefle	200.000	10^3
	intermédiaire	
Sainfoin	30.000 200 .000	10^4
- Soja	} grosses	10^5
- haricot		
- niébé, arachide, pois		

FIG. 1 CONTROLE DE LA QUALITE D'UN- **INOCULUM**



4 UNITES DE CROISSANCE PAR DILUTION

Dans un milieu dépourvu d'azote, la présence de nodules sur le système racinaire d'une légumineuse préalablement inoculée avec une bactérie est la preuve que la bactérie est un Rhizobium viable et infectif sur la légumineuse.

Dans un milieu dépourvu d'azote, l'absence de nodules sur le système racinaire d'une légumineuse est la preuve que le milieu ne renferme pas de Rhizobium infectif sur la légumineuse.

Le contrôle de la qualité d'un inoculum consiste alors à évaluer le pouvoir infectif de l'inoculum par un test d'infection de la légumineuse pour laquelle l'inoculum est destiné.

3.1. Prégermination des graines

Les graines doivent être stérilisées superficiellement. Nous indiquons ci-dessous une méthode générale de stérilisation des graines. Cette méthode peut être modifiée selon la grosseur et la dureté de la graine.

Les graines sont stérilisées superficiellement par immersion dans de l'éthanol 95% pendant 3 s. Après rinçage avec de l'eau distillée stérile, elles sont trempées dans une solution de chlorure mercurique 0,1% acidifiée (5ml HCl concentré par litre de solution de chlorure mercurique) pendant 3mn. Après rinçage, les graines sont retrempées dans une solution d'hypochlorite de sodium 5% pendant 10mn. Après, les graines sont rincées trois fois à l'eau distillée stérile. Elles sont alors mises à germer dans des boîtes de pétri contenant de l'eau gélosée 3% stérile.

3.2. Culture des plantes

Les plantules obtenues comme indiqué en 3.1 sont repiquées dans des unités de croissance qui contiennent une solution nutritive dépourvue d'azote et dont la composition est donnée au tableau 2. Le type d'unité de croissance varie en fonction de la grosseur des graines mises à prégermer : l'unité de croissance peut être une jarre Léonard, un tube Gibson, une gaine ou un sac en plastique dans lequel on a introduit un papier filtre. Dans chaque unité de croissance, on fait pousser une seule plantule.

3.3 Inoculation des plantes

L'inoculum est dispersé dans une solution tampon stérile de façon à détacher toutes les bactéries du support de l'inoculum. La solution tampon contient par litre d'eau distillée : peptone : 1g ; KH_2PO_4 : 0,34g ; K_2HPO_4 : 1,21g. Le pH est ajusté à 7,0. La solution tampon doit être conservée à 4°C.

Table 2 : Composition de la solution nutritive pour la culture des plantes dans les unités de croissance.

$\text{CO c12, 6H}_2\text{O}$	0,004	mg
H_3BO_3	2,86	mg
$\text{Mn Cl}_2, 4 \text{ H}_2\text{O}$	1,81	mg
$\text{Zn SO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,22	mg
$\text{Cu SO}_4, 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,08	mg
$\text{H}_2\text{M O}_4, \text{H}_2\text{O}$	0,09	mg
$\text{Mg SO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	492,96	mg
$\text{K}_2 \text{ HPO}_4$	174,18	mg
$\text{KH}_2 \text{ PO}_4$	136,09	mg
Ca Cl_2	110,99	mg
$\text{Fe C}_6 \text{ H}_5 \text{ O}_7, \text{H}_2\text{O}$	5,00	mg
EDTA 0,2%	20	ml
Eau distillée 95P.	1000	ml

Ajuster le pH à 6,8 avec HCl ou NaOH

3.5. Estimation de la valeur de l'inoculum

$$10^9 \cdot 10^2 \cdot 10^4 = 10^{15} \cdot 10^4$$

Le nombre de bactéries par gramme d'inoculum est donc

Le nombre caractéristique obtenu est 444320 pour lequel la table MPN indique $10^9 \cdot 10^2$ Rhizobium à l'estimation de 95%.

Dilutions	Nombre d'unités de croissance positives
1:5	4
1:25	4
1:125	3
1:625	2
1:3125	0
1:15625	0

Exemple 1

Le nombre formé à partir des unités de croissance positives à chaque dilution constitue le nombre caractéristique qui donne le nombre de Rhizobium viables et infectifs à partir d'une table MPN basée sur des séries de dilution en cinq (Table 3). Le nombre de Rhizobium par gramme d'inoculum à contrôler est obtenu en multipliant le nombre le plus probable indiqué par la table MPN par la dilution à partir de laquelle on a effectué la première dilution en cinq. Dans notre cas, cette dilution correspond à la dilution 10^{-4} .

Une unité de croissance est notée "+" quand la plante qu'elle contient présente au moins un nodule. L'unité de croissance est notée "-" quand la plante qu'elle contient ne présente pas de nodules.

3.4. Estimation du nombre de Rhizobium.

A partir de chaque dilution en cinq, quatre unités de croissance contenant une plante sont inocuées avec 1ml de la dilution considérée.

Deux aliquots de 10g d'inoculum sont dispersés dans des flacons contenant 90ml de tampon peptone refroidi à 4°C. Après dispersion, 10ml de la suspension bactérienne obtenue sont transférés dans un deuxième flacon contenant 90ml de tampon peptone refroidi à 4°C. Après 5mm d'agitation, 10ml de cette deuxième suspension sont transférés dans un troisième flacon contenant 90ml de tampon. L'opération est poursuivie jusqu'à la dilution 10^{-4} à partir de laquelle on effectue une autre série de dilution de cinq en cinq : 1ml de suspension dans 4ml de tampon peptone jusqu'à la dilution $1:15625$.

R, le nombre de Rhizobium par gramme d'inoculum (nombre déterminé comme indiqué en 3.4.).

- N, le nombre de Rhizobium viables et infectifs nécessaires par graine pour une fixation efficiente d'azote (nombre indiqué à la table 1).

S, le nombre de graines par kg de semence (Table 4).

Le poids d'inoculum (W) nécessaire par kg de semence est donné par la formule suivante :

$$W = \frac{N \times S}{R}$$

Exemple 2

Dans l'exemple 1, $R = 10,9.10^6$ Rhizobium/g d'inoculum. Supposons que l'inoculum était produit pour la culture de l'arachide pour laquelle les tables 1 et 4 donnent respectivement $N = 10^5$ et $S = 2205$, on peut calculer le poids d'inoculum nécessaire pour 1 kg de semence d'arachide :

$$W = \frac{10^5 \times 2205}{10,9.10^6} = 220,5.10^{-1}$$

$W = 22g$ d'inoculum pour 1 kg de semence d'arachide.

3.6. Taux d'application de l'inoculum au champ

Le taux d'application d'un inoculum (T) est le poids d'inoculum nécessaire pour 1 ha. En désignant par Q (kg) le poids de graines d'une légumineuse pour 1 ha, le taux d'application de l'inoculum est donné par la formule :

$$T = Q \times W$$

Exemple 3

Dans l'exemple 2, $W = 22g$ d'inoculum pour 1 kg de semences d'arachide, cultivé à un écartement 50×50 nécessite 55 kg de semence par hectare.

On peut calculer le taux d'application de l'inoculum contrôlé dans les exemples 1 et 2 :

$$T = 22 \times 55 = 1210 \text{ g.}$$

Il faut donc appliquer 1.2 kg d'inoculum à 55 kg d'arachide pour une superficie de 1 ha.

4. CONCLUSION

Le contrôle de la qualité d'un inoculum par le test d'infection des plantes est une méthode recommandée car il n'existe pas de milieu de culture sélectif pour les *Rhizobium*. De plus, cette méthode permet de juger de la spécificité d'un inoculum pour une légumineuse donnée.

Avec le développement de la technique de la FBA au Sénégal, l'exécution de ce programme assure une bonne qualité des inoculums offerts aux cultivars.

TABLE 3. Nombre le plus probable (MPN) de bactéries calculé à partir de la distribution des unités de croissance positive8 dans un test d'infection basé sur des séries de dilution en cinq.

	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:15625*	Estimation	Limite de confiance, à '95%
1	0	0	0	0	0	0	1.1	0.2- 7.9
2	0	0	0	0	0	0	2.6	0.6-10.1
3	0	0	0	0	0	0	4.6	1.5-14.1
4	0	0	0	0	0	0	8.0	3.0-21.5
0	1	0	0	0	0	0	1.0	0.1- 7.7
1	1	0	0	0	0	0	2.3	0.6- 9.6
2	1	0	0	0	0	0	4.0	1.2-12.8
3	1	0	0	0	0	0	6.5	2.3-18.0
0	2	0	0	0	0	0	2.1	0.5- 9.2
1	2	0	0	0	0	0	3.5	1.1-11.9
2	2	0	0	0	0	0	5.5	1.9-16.0
3	2	0	0	0	0	0	8.7	3.3-23.0
0	3	0	0	0	0	0	310	0.9-10.6
1	3	0	0	0	0	0	4.9	1.6-14.6
2	3	0	0	0	0	0	7.2	2.7-19.6
3	3	0	0	0	0	0	11.3	4.4-29.2
4	1	0	0	0	0	0	11.4	4.4-29.5
4	2	0	0	0	0	0	16.2	6.2-42.4
4	3	0	0	0	0	0	24.2	9.0-64.9
4	4	0	0	0	0	0	40.4	15.3-106.6
4	0	1	0	0	0	0	10.8	4.2-28.1
4	1	1	0	0	0	0	15.1	5.8-39.2
4	2	1	0	0	0	0	21.5	8.1-57.4
4	3	1	0	0	0	0	32.8	12.2-67.9
4	0	2	0	0	0	0	14.1	5.4-36.6
4	1	2	0	0	0	0	19.6	7.4-51.9
4	2	2	0	0	0	0	28.3	10.5-76.1
4	3	2	0	0	0	0	43.6	16.6-114.2
4	0	3	0	0	0	0	18.1	6.9-47.7
4	1	3	0	0	0	0	25.2	9.4-67.6
4	2	3	0	0	0	0	36.4	13.7-96.8
4	3	3	0	0	0	0	56.5	21.9-146.0

TABLE 3 (suite)-

1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:15625*	Estimation	Limite de confiance à 95%
4	4	1	0	0	0	5.7×10^2	$2.2-14.7 \times 10^2$
4	4	2	0	0	0	8.1×10^2	$3.1-21.2 \times 10^2$
4	4	3	0	0	0	12.1×10^2	$4.5-32.4 \times 10^2$
4	4	4	0	0	0	20.2×10^2	$7.6-53.3 \times 10^2$
4	4	0	1	0	0	5.4×10^2	$2.1-14.0 \times 10^2$
4	4	1	1	0	0	7.5×10^2	$2.9-19.6 \times 10^2$
4	4	2	1	0	0	10.8×10^2	$4.0-28.7 \times 10^2$
4	4	3	1	0	0	16.4×10^2	$6.1-43.9 \times 10^2$
4	4	0	2	0	0	7.1×10^2	$2.7-18.3 \times 10^2$
4	4	1	2	0	0	9.8×10^2	$3.7-26.0 \times 10^2$
4	4	2	2	0	0	14.1×10^2	$5.3-38.1 \times 10^2$
4	4	3	2	0	0	21.8×10^2	$8.3-57.1 \times 10^2$
4	4	0	3	0	0	9.1×10^2	$3.4-23.8 \times 10^2$
4	4	1	3	0	0	12.6×10^2	$4.7-33.8 \times 10^2$
4	4	2	3	0	0	18.2×10^2	$6.9-48.4 \times 10^2$
4	4	3	3	0	0	28.2×10^2	$10.9-73.0 \times 10^2$
4	4	4	1	0	0	2.9×10^2	$1.1-7.3 \times 10^2$
4	4	4	2	0	0	4.1×10^2	$1.6-10.6 \times 10^2$
4	4	4	3	0	0	6.0×10^2	$2.3-16.2 \times 10^2$
4	4	4	4	0	0	10.1×10^2	$3.8-26.6 \times 10^2$
4	4	4	0	1	0	2.7×10^2	$1.0-7.0 \times 10^2$
4	4	4	1	1	0	3.8×10^2	$1.5-9.8 \times 10^2$
4	4	4	2	1	0	5.4×10^2	$2.0-14.4 \times 10^2$
4	4	4	3	1	0	8.2×10^2	$3.1-22.0 \times 10^2$
4	4	4	0	2	0	3.5×10^2	$1.4-9.2 \times 10^2$
4	4	4	1	2	0	4.9×10^2	$1.8-13.0 \times 10^2$
4	4	4	2	2	0	7.1×10^2	$2.6-19.0 \times 10^2$
4	4	4	3	2	0	10.9×10^2	$4.2-28.6 \times 10^2$
4	4	4	0	3	0	4.5×10^2	$1.7-11.9 \times 10^2$
4	4	4	1	3	0	6.3×10^2	$2.3-16.9 \times 10^2$
4	4	4	2	3	0	9.1×10^2	$3.4-24.2 \times 10^2$
4	4	4	3	3	0	14.1×10^2	$5.4-36.7 \times 10^2$
4	4	4	4	1	0	14.3×10^2	$5.5-36.9 \times 10^2$
4	4	4	4	2	0	20.3×10^2	$7.8-53.0 \times 10^2$
4	4	4	4	3	0	30.2×10^2	$11.2-81.3 \times 10^2$
4	4	4	4	4	0	50.5×10^2	$19.0-133.8 \times 10^2$
4	4	4	4	0	1	13.5×10^2	$5.2-35.3 \times 10^2$
4	4	4	4	1	1	18.8×10^2	$7.2-49.0 \times 10^2$
4	4	4	4	2	1	26.9×10^2	$10.1-71.8 \times 10^2$
4	4	4	4	3	1	41.0×10^2	$15.3-110.2 \times 10^2$
4	4	4	4	0	2	17.7×10^2	$6.8-45.9 \times 10^2$
4	4	4	4	1	2	24.5×10^2	$9.2-65.0 \times 10^2$
4	4	4	4	2	2	35.3×10^2	$13.1-95.4 \times 10^2$
4	4	4	4	3	2	54.4×10^2	$20.6-143.8 \times 10^2$
4	4	4	4	0	3	22.6×10^2	$8.6-59.7 \times 10^2$
4	4	4	4	1	3	31.4×10^2	$11.7-84.7 \times 10^2$
4	4	4	4	2	3	45.5×10^2	$17.0-121.4 \times 10^2$
4	4	4	4	3	3	70.6×10^2	$27.1-184.2 \times 10^2$

TABLE 3 (suite)

1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:15625*	Estimation	Limite de confiance à
4	4	4	4	4	1	7.1 x 10^3	2.7-18.6 x 10^3
4	4	4	4	4	2	10.1 x 10^3	3.8-27.0 x 10^3
4	4	4	4	4	3	15.1 x 10^3	5.4-42.6 x 10^3
4	4	4	4	4	4	25.2 x 10^3	8.6-74.0 x 10^3
4	4	4	4	4	5	> 35.5 x 10^3	

TABLE 4. Important legumes cultivated in Canada; scientific name arranged alphabetically, common name, number of seed per kilogram and Rhizobium species for inoculation

Scientific and common name	Number of seed per kg*	<u>Rhizobium</u> inoculation species
<u>Arachis hypogaea</u> , L. peanut	2,205	<u>R. "cowpea"</u>
<u>Astragalus cicer</u> , L. cicer milkvetch	286,650	<u>R. ?**</u>
<u>Coronilla varia</u> , L. crownvetch	242,550	<u>R. ?</u>
<u>Glycine max</u> , Merr. (<u>Glycine soja</u>) soybean	6,667	<u>R. japonicum</u>
<u>Lathyrus</u> spp. flat peas	----	<u>R. leguminosarum</u>
<u>Lens</u> lentil	----	<u>R. leguminosarum</u>
<u>Lespedeza cuneata</u> , Don. perennial sericca lespedeza	771,750	<u>R. "cowpea"</u>
<u>Lespedeza striata</u> , Hook & Arn. annual common lespedeza	418,850	<u>R. "cowpea"</u>
<u>Lotus corniculatus</u> , L. (<u>tenuis</u>) birdsfoot trefoil	826; 875	<u>R. loti</u>
<u>Lupinus</u> stifolius lupins	----	<u>R. lupini</u>
<u>Medicago sativa</u> , L. alfalfa	441,000	<u>R. meliloti</u>
<u>Melilotus alba</u> , Desr. white sweetclover	573,340	<u>R. meliloti</u>
<u>Melilotus officinalis</u> , Lam. yellow sweetclover	573,300	<u>R. meliloti</u>
<u>Onobrychis viciaefolia</u> , Scop. sainfoin	66,150	<u>R. ?</u>
<u>Phaseolus vulgaris</u>	2,461	<u>R. phaseoli</u>

TAULE 4 (suite)

Scientific and common name	Number of scdd par kg*	<u>Rhizobium</u> inoculation species
<u>Pisum arvense</u> , L. field or garden peas	4,310	<u>R. 1 eguminosarum</u>
<u>Stizolobium deeringianum</u> , Bort. velvetbeans, field beans	2,205	<u>R. "cowpea"</u>
<u>Trifolium hybridum</u> , L. alsike clover	1,543,500	<u>R. trifolii</u>
<u>Trifolium incarnatum</u> , L. crimson clover	308,700	<u>R. trifolii</u>
<u>Trifolium pratense</u> , L. red clover	606,375	<u>R. trifolii</u>
<u>Trifolium repens</u> , L. white clover, ladino clover	1,764,000	<u>R. trifolii</u>
<u>Vicia sativa</u> , L. common vetch	15,435	<u>R. leguminosarum</u>
<u>Vicia villosa</u> , Roth hairy vetch	44,100	<u>R. leguminosarum</u>
<u>Vicia faba</u> var. <u>equina</u> , L. . horsebean	2,326	<u>R. 1 eguminosarum</u>
<u>Vicia faba</u> var. <u>major</u> , L. broadbean	1,103	<u>R. leguminosarum</u>

* To comply with Table under section 10.2 C(ii) in regulations
greater than 200,000 = small; 30,000 - 200,000 = intermediate;
less than 30,000 = large.

** Rhizobium species designation are unknown for these legumes and specific strains are required.