CN010099

REPUBLIQUE DU SENEGAL

MINISTERE DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

INSTITUT SENEGA:LAIS
DE RECHERCHES AGRICOLES

OFFICE DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE
OUTRE MER. **O.R.S.T.O.M.**
(BEL AIR)

DEPARTEMENT DE RECHERCHES
SUR LES PRODUCTIONS VEGETALES

ETABLISSEMENT DU CENTRE DE RESSOURCES
MICROBIOLOGIQUES (MIRCEN) DE
L'AFRIQUE DE L'OUEST

RAPPORT DE TITULARISATION DE M. Mamadou GUEPE

Septembre 1983

Centre National de Recherches Agronomiques
de Bambey

REMERCIEMENT

Ce rapport de titularisation a été préparé au laboratoire de microbiologie des sols de l'ORSTOM à Dakar sous la direction de Monsieur DOMMARGUES, Y., directeur de recherches titulaire CNRS/ORSTOM. Nous le remercions tout particulièrement pour avoir suivi ce travail et jugé ce rapoort.

Nous remercions également Monsieur DIEM, H.G., maftre de recherches CNRS/ORSTOM et Monsieur DREYFUS, B., chargé de recherches ORSTOM pour l'encadrement scientifique et les précieux conseils qu'ils nous ont prodigués.

Nous remercions aussi Monsieur BORDELEAU, L. Directeur de recherches au Canada Agriculture qui nous a aidés à mettre en place le Centre de Ressources Microbiologiques (MIRCEN) de l'Afrique de l'Ouest et qui a également jugé ce rapport.

Nos remerciements s'adressent également à tout le personnel du laboratoire de microbiologie des sols de l'ORSTOM en particulier Monsieur BOUREAU, M., pour ses conseils pratiques et Monsieur DIAWARA, I., pour la dactylographie de ce rapport.

Enfin nous remercions tous les responsables de l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA) et Monsieur Edgar J. Da SILVA d'avoir pris la décision de la création du MIRCEN de l'Afrique de l'Ouest, ce qui me permet de pouvoir présenter ce rapport aujourd'hui.

PLAN

INTRODUCTION GENERALE.

1ère Partie: Constitution d'une collection de souche de 'Rhizobium et de champignons endomycorhiziens.

INTRODUCTION

- I. Conservation des microorganismes
 1. Enumeration des méthodes utilisables
 2. Méthodes de conservations des champignons **endomycorhiziens** à vésicules et à arbuscules
 3. Méthodes de conservation utilisées au laboratoire

- II. Gestion de la collection de microorganismes
 1. Fiche technique d'une souche de microorganisme
 2. Traitement informatique
 3. Liste des souches

2ème Partie: Recherches **préliminaires** sur la fixation biologique de l'azote par Voandzeia subterranea

1. Introduction
2. Matériel et Méthodes
3. Résultats
4. Discussion
5. Conclusion

3ème Partie : Recherches **complémentaires** sur la double inoculation de Vigna unguiculata par Rhizobium et Glomus mosseae

1. Introduction
2. Rappel du matériel et des méthodes utilisées
3. Absorption du zinc
4. Conclusion

Conclusion Générale

Bibliographie

INTRODUCTION GENERALE

La principale tâche du Centre de Ressources Microbiologiques (**MIRCEN**) de l'Afrique de l'Ouest est de mettre en place une collection régionale de cultures microbiennes. Il centralisera pour leur conservation et leur utilisation des microorganismes d'intérêt économique pour la production d'inoculum biofertilisants de Rhizobium et de mycorhizes.

Au cours des six mois d'essai, nous avons entrepris de constituer une collection de culture de Rhizobium. La liste des Rhizobium en collection regroupe des souches isolées par les microbiologistes de l'ORSTOM et des souches provenant d'autres centres de collection de culture: USDA à Beltsville (USA), Niftal à Hawaii (USA), Nitragin Company (USA).

Le **MIRCEN** doit également orienter ses efforts sur le développement du monde rural avec comme objectifs la préservation et l'utilisation des ressources locales. A ce titre, Voandzeia subterranea, véritable ressource protéinique pour l'avenir est une légumineuse traditionnellement cultivée au Sénégal et qui, maintenant disparaît des surfaces cultivables. Dans l'objectif de l'autosuffisance alimentaire, nous avons proposé un programme de recherche sur Voandzeia subterranea dans le cadre du **MIRCEN**. Nous avons initié ce programme de recherche au laboratoire de microbiologie des sols de l'ORSTOM à Dakar.

Enfin, au cours des six mois d'essai nous avons terminé une expérience sur l'absorption du zinc par 'cligna unguiculata inoculé avec un champignon endomycorhizien à vésicules et à arbuscules Glomus mosseae. Dans ce rapport, nous aborderons donc trois sujets:

- 1) Constitution d'une collection de souches de Rhizobium et de mycorhizes.
- 2) Recherches préliminaires sur la fixation biologique de l'azote par Voandzeia subterranea.
- 3) Recherches complémentaires sur la double inoculation de Vigna unguiculata par Rhizobium et Glomus mosseae.

1ère Partie

CONSTITUTION D'UNE COLLECTION DE SOUCHES
DE RHIZOBIUM ET DE CHAMPIGNONS ENDOMYCORHIZIENS

INTRODUCTION

La constitution d'une collection de souches de microorganismes est une des principales activités du MIRCEN. Elle a pour but de mettre à la disposition des laboratoires, Instituts de Recherche et industries ces microorganismes en vue de leur utilisation. De ce point de vue :La conservation des cultures de microorganismes revêt une grande importance pour le maintien d'une collection de cultures stables et actives.

Au MIRCEN de l'Afrique de l'Ouest, nous envisageons de constituer une collection de Rhizobium, de Yycorhizes et de Frankia. Actuellement, nous avons entrepris une collection de culture de Rhizobium et de champignons endomycorhiziens à vésicules et à arbuscules (MVA).

La constitution d'une telle collection de culture nécessite la tenue d'un fichier pour tous les microorganismes. Chaque souche doit avoir une fiche technique qui fournit tous les renseignements relatifs à la souche: le numéro de la souche dans la collection, la plante-hôte, le lieu d'origine, le fournisseur et les performances symbiotiques de La souche de Rhizobium (VINCENT, 1970). Chaque centre doit développer son propre système d'identification des souches de Rhizobium qu'il détient.

I. CONSERVATION DES MICROORGANISMES

1. Enumération des différentes méthodes utilisables pour la conservation des souches de Rhizobium

1.1. Gélose inclinée (VINCENT, 1970).

On cultive les Rhizobium dans des tubes contenant un milieu gélosé incliné. Les cultures de Rhizobium peuvent être conservées ainsi 2 ans à basse température. C'est une méthode simple qui permet un repiquage rapide et facile des Rhizobium. Elle n'est cependant pas conseillée pour les très longues conservations car des repiquages fréquents augmentent les risques de contamination et de perte de la souche. De plus, cette opération exige beaucoup de temps.

1.2. Gélose couverte d'huile de paraffine (VINCENT, 1970)

Elle est très proche de la précédente. Les Rhizobium ayant poussé convenablement sur la gélose inclinée sont recouverte d'huile de paraffine stérile. En plus des facilités que présente la première méthode, celle-ci a l'avantage de diminuer le risque de dessiccation de la culture, donc diminue la fréquence des repiquages.

1.3. Méthode des billes de porcelaine (NORRIS, 1963)

Dans une fiole contenant une suspension de Rhizobium, on introduit des billes de porcelaine stériles. Après agitation, les billes sont récupérées et réintroduites dans une deuxième fiole contenant du silica-gél stérile.

Les Rhizobium adsorbés sur les billes de porcelaine sont ainsi conservés aussi longtemps que dure le silicagel. La durée de conservation peut atteindre 4 ans.

1.4. Sol stérile

Du sol stérile peut être utilisé pour conserver des souches de Rhizobium (NUTMAN, 1946; JENSEN, 1961). Cette méthode a l'avantage d'éviter toute pression de sélection sur les microorganismes car le sol est un milieu complexe.

1.5. Congélation des Rhizobium (American Society for Microbiology, 1981).

La congélation à -80°C est une bonne méthode de conservation. La durée de vie des Rhizobium est de 1 à 2 ans. Il est cependant déconseillé d'ouvrir constamment le congélateur: les grands écarts de température sont fatals aux Rhizobium

1.6. Lyophilisation (VINCENT, 1970)

Il s'agit d'une congélation des Rhizobium sous vide dans des ampoules scellées. C'est la meilleure méthode de conservation. Les Rhizobium peuvent être conservés pendant 15 à 20 ans à la température ambiante.

2. Méthode de conservation des champignons endomycorhiziens

Les champignons endomycorhiziens VA sont des symbiotes obligatoires. On ne peut pas les cultiver in vitro. Mais on peut multiplier ces champignons dans les racines d'une plante-hôte inoculée avec ces mêmes champignons: nous faisons prégermer des graines stériles de la plante-hôte dans du sable stérile. L'inoculation par un champignon endomycorhizien VA consiste à appliquer 1 g de poids frais de racines infectées par ce champignon contre les radicelles de la plantule obtenue que nous cultivons dans un sol stérile.

3. Méthode de conservation des microorganismes utilisés au laboratoire

3.1. Conservation des souches de Rhizobium

En attendant de pouvoir faire appel à la lyophilisation qui est actuellement une des méthodes les plus sûres, nous utilisons les 2 méthodes suivantes :

- la conservation sur gélose et la congélation.

3.1.1. Conservation sur gélose

Nous avons utilisé à cet effet des boîtes de Pétri et des tubes à vis contenant du milieu YEM gélosé. Nous avons déposé les Rhizobium à la surface de la gélose, puis entouré les boîtes et les tubes avec de la paraffine. Ensuite, nous les avons mis à incubation à 30°C pendant le temps nécessaire pour une bonne croissance. Puis nous avons rangé les boîtes et les tubes en chambre froide à 4°C.

3.1.2. Congélation des Rhizobium

Nous avons prélevé 2ml de suspension de Rhizobium en croissance exponentielle que nous avons introduit dans le même volume de glycérol stérile contenu dans un pilulier. Nous avons ensuite placé tous les piluliers dans un congélateur à -80°C.

3.2. Conservation des souches de Champignons endomycorhiziens VA

Selon la méthode décrite au paragraphe 2., nous multiplions les champignons endomycorhiziens à vésicules et à arbuscules dans des racines de Vigna unguiculata. Les champignons endomycorhiziens étant des symbiotes obligatoires, c'est par ce procédé que nous conservons les deux souches de notre collection Glomus mcsseae et Glomus fasciculatus.

II. GESTION DE LA COLLECTION DE MICROORGANISMES

1. Fiche technique d'une souche de microorganisme

La fiche technique que nous avons adoptée pour le YIRCEN est une variante de la fiche technique internationale proposée par le Centre Mondial des Données sur les microorganismes (WDC) de Brisbane (VINCENT, 1982). Elle décrit:

- des généralités sur le microorganisme: systématique, année d'acquisition par le MIQCEN, numéro dans la collection MIRCEN, autres références de souche;
- une description de la plante-hôte;
- la composition du sol d'origine;
- les conditions de croissance et le mode de conservation du microorganisme;
- le spectre d'hôte du microorganisme.

Chaque souche de microorganisme a une fiche technique comme le modèle ci-joint et porte le nom de la collection MA 0 (Mircen Afrique Ouest) suivi d'un numéro d'ordre. Une fiche technique de Rhizobium pour chaque espèce de légumineuse est indiquée en annexe, ainsi que les fiches techniques des deux souches de mycorhizes.

2. Traitement informatique

Pour la gestion de la collection de microorganismes, nous avons utilisé la méthode BRADS II qui est un logiciel de système de gestion par base de données. L'objectif principal du BRADS II consiste à définir, à créer et à assurer la maintenance des données permettant ainsi toutes les applications informatiques possibles sur ces informations.

Toutes les informations sont actuellement imprimées sur une disquette simple face, simple densité par un microordinateur IBM5120 disponible au Centre de Recherche Océanographique de Thiaraye (CRODT) et au Centre National de Recherche Agronomique de Bambey (CNRA).

3. Liste des souches. Nous reportons dans ce paragraphe une liste des souches de Rhizobium obtenue par le traitement informatique.

Exemple de Fiche Technique d'un Microorganisme

1. GENRE
2. ESPECE
3. NUMERO AU YDC
4. COLLECTION NUMERO SOUCHE
5. ANNEE D'ACQUISITION
6. PREMIERE REFERENCE
7. DEUXIEME REFERENCE
8. ANTICORPS FLUORESCENT DISPONIBLE
9. PLANTE D'ORIGINE
 - 9.1. GENRE
 - 9.2. ESPECE
 - 9.3. CULTIVAR
10. PARTIE DE LA PLANTE
 - 10.1. NODULE
 - 10.2. AUTRE
11. LIEU D'ORIGINE
 - 11.1. PAYS
 - 11.2.** REGION
 - 11.3. VILLE
 - 11.4.** ALTITUDE (m)
 - 11.5.** LATITUDE
 - 11.6. LONGITUDE
12. COMPOSITION DU SOL D'ORIGINE
 - 12.1. C 'TOTAL (ppm)
 - 12.2. N TOTAL "
 - 12.3. N MINERALISABLE "
 - 12.4. P TOTAL "
 - 12.5. P ASSIMILABLE "
 - 12.6. ARGILE (%)
 - 12.7.** LIMON "
 - 12.8. SABLE "
 - 12.9. pH KCl
 - 12.10. pH EAU
13. ISOLEMENT EFFECTUE
 - 13.1. AUTEUR

- 13.2. DATE
- 14. IDENTIFICATION
 - 14.1. AUTEUR
 - 14.2. DATE
- 15. CONSERVATION DE LA SOUCHE
 - 15.1. MODE DE CONSERVATION
 - 15.2. MILIEU DE SUPPORT
- 16. MILIEU DE CROISSANCE
- 17. TEMPERATURE DE CROISSANCE
- 18. CARACTERISTIQUES
- 19. TEMPS D'INCUBATION
- 20. ORGANISME LIBRE
 - 20.1. TOLERANCE AU pH
 - 20.2. TOLERANCE A LA TEMPERATURE
- 21. SYMBIOSE RACINAIRE
 - 21.1. TOLERANCE AU pH
 - 21.2. TOLERANCE A LA TEMPERATURE
- 22. INFECTIVE SUR
- 23. EFFECTIVE SUR
- 24. LABORATOIRES OU LA SOUCHE EST DISPONIBLE.

III. CONCLUSION

Nous avons vérifié la pureté de toutes les souches et nous les avons conservées au congélateur et en chambre froide. Nous **n'avons** pas pu lyophiliser ces souches car les accessoires indispensables au fonctionnement du **lyophilisateur** ne nous étaient pas parvenus,

Le système BRADS II a une **capacité** limitée. Nous envisageons actuellement d'autres **systèmes** de gestion **applicables** sur le mini-ordinateur IBM 5120 pour pouvoir effectuer l'ensemble des opérations informatiques relatives au fichier.

2ème Partie

RECHERCHES PRELIMINAIRES SUR LA FIXATION
BIOLOGIQUE DE L'AZOTE PAR VOANDZEIA SUBTERRANEA

1. INTRODUCTION

Dans les pays en **voie de développement**, il est très important de développer les cultures de légumineuses riches en **protéines** qui peuvent contribuer à l'équilibre nutritionnel des populations. De ce point de vue, Voandzeia subterranea constitue une légumineuse intéressante car c'est une ressource à ne pas négliger pour les pays de la zone semi-aride ouest africaine dans l'objectif de l'autosuffisance alimentaire.

Tableau 1. **Composition** nutritionnelle pour 100 g de graines sèches de Voandzeia subterranea (rapport BOSTID, 1979)

Calories	412
Protides (g)	17,3
Lipides (g)	6,7
Glucides (g)	72,2

A notre connaissance, au Sénégal, il n'y a pas de programme pour la culture et l'amélioration des rendements de Voandzeia subterranea.

Ce sont les raisons pour lesquelles nous avons proposé dans le cadre du Centre de Ressources Microbiologiques (**MIRCEN**) de l'Afrique de l'Ouest un programme de recherche axé principalement sur la fixation biologique de l'azote par Voandzeia subterranea.

En effet **l'inoculation** des légumineuses avec des souches de Rhizobium efficaces et compétitives permet l'amélioration de leur rendement sans recourir à l'emploi des engrais azotés trop coûteux. **En** ce qui concerne Voandzeia subterranea, nous avons très peu de **connaissances** sur la fixation biologique de l'azote **par** cette légumineuse. Elles se limitent à quelques souches de Rhizobium isolées lors des expériences conduites au **NifTal project** à Hawaii (USA).

Notre programme consiste donc à:

- 1/ isoler et sélectionner des souches de Rhizobium efficaces et compétitives pour l'inoculation de Voandzeia subterranea;
- 2/ étudier le **rôle** des endomycorhizes dans la fixation biologique par Voandzeia subterranea. La sélection des **cultivars** répondant le mieux à la mycorhization permet d'obtenir des **variétés** rustiques et adaptées aux conditions sévères de l'agriculture en zone semi-aride notamment.

Nous avons initié ce programme au Laboratoire de Microbiologie des Sols de l'ORSTOM à Dakar et nous indiquons dans ce présent rapport les résultats préliminaires que nous avons obtenus concernant l'isolement et la caractérisation de souches de Rhizobium à partir de Voandzeia subterranea.

2. MATERIEL et METHODES

2.1. Piégeage de souches de Rhizobium

Dans le sol de la station expérimental de l'ORSTOM à Dakar, Bel-Air dont nous donnons la composition, nous avons semé deux petites parcelles (2m x 2m) respectivement avec les cultivars 78-1 et 79-1 de Voandzeia subterranea fournis par le service de **diversification** du CNRA de Bambey par poquet de deux graines. Les poquets étaient distants de 30cm et les interlignes de 60cm.

Composition du sol de Bel-Air surface

ppm		Granulométrie %					pHKCl	pHeau	
c	N	N minéra-	P	P assi-	Argile	Limon			Sable
<u>total</u>	<u>total</u>	<u>lisable</u>	<u>total</u>	<u>milable</u>					
3900	340	69	206,8	26,4	6,4	2,7	92,8	6,5	7,2

2.2. Isolement des souches de Rhizobium

VINCENT (1970) a décrit une méthode d'isolement de Rhizobium à partir des nodules de légumineuses. Cependant, nous avons préféré à la méthode de VINCENT une autre plus **rapide** que nous décrivons ci-dessous. Sous une hotte à flux laminaire, nous **avons soigneusement** cassé un nodule frais convenablement choisi. Nous avons introduit une oese stérile au centre du nodule pour prélever des Rhizobium. Nous avons **en suite** fait des stries d'épuisement dans des boîtes de Petri contenant du milieu **YEM gélosé** stérile que nous avons mis à **30°C**. Nous avons observe les boîtes de Petri **après 7 -jours** d'incubation.

2.3. Caractérisation des Rhizobium

Il existe plusieurs techniques de purification et de caractérisation des Rhizobium.

2.3.1. Croissance sur milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) (VINCENT, 1970).

Ce milieu permet de définir deux groupes de Rhizobium: (i) les fast growing et (ii) les slow growing dont les temps de génération sont respectivement de 3 à 4 heures et de 8 à 12h d'incubation à 28°C. Le milieu YMA contient par litre: K_2HPO_4 : 0,5g; $MgSO_4,7H_2O$: 0,2g; NaCl: 0,1g; mannitol: 10g; levure: 1g; gélose: 15g. Le pH est ajusté à 6,8 avec HCl ou NaOH.

2.3.1. Test de nodulation

Le test de nodulation est une technique qui permet une caractérisation absolue des Rhizobium. C'est le stade ultime et nécessaire de tout isolement. Si des isolats ne peuvent pas noduler une ou des légumineuses-hôtes, il ne s'agit pas de Rhizobium. Généralement dans beaucoup de laboratoires, on effectue des tests de nodulation sur les plantes à partir desquelles on a isolé les bactéries et/ou sur des plantes s'en rapprochant. Nous avons fait un test de nodulation des isolats Vs2, Vs3 et Vs4 sur le cultivar 79-1 à partir duquel leur isolement est effectué.

2.3.1.1. *Germination des graines*

Nous avons stérilisé les graines de Voandzeia subterranea par trempage dans $HgCl_2$ 0,1% pendant 3mn. Après trois lavages soigneux avec de l'eau distillée stérile, nous les avons mises à germer dans des boîtes de Petri contenant de l'eau gélosée 0,9% stérile. Les plantules obtenues sont repiquées dans des tubes de GIBSON,

2.3.1.2. *Culture des plantes dans les tubes de GIBSON* (GIBSON, 1963).

Dans des tubes à essai de 30mm de diamètre, nous avons mis du milieu de JENSEN contenant par litre d'eau distillée: $CaHPO_4$: 1g; K_2HPO_4 : 2g; $MgSO_4,7H_2O$: 2g; NaCl: 2g; $FeCl_3$: 0,1g; solution d'Oligo-éléments: 1ml; gélose: 20g (JENSEN, 1942). 1 litre de solution d'Oligo-éléments contient: HBO_3 : 2,86g; $MnSO_4,4H_2O$: 2,03g; $ZnSO_4,7H_2O$: 0,22g; $CuSO_4,5H_2O$: 0,08g; Na_2MoO_4,H_2O : 0,09g. Le pH du milieu de JENSEN est ajusté à 6,7 avec NaOH.

Nous avons stérilisé tous les tubes à l'autoclave **120°C**, 20mn. Après nous avons repiqué les olantules obtenues comme indiqué au § 2.3.3.1. dans ces tubes à raison de une **par** tube. Nous avons ensuite inoculé les plantules de Voandzeia subterranea cv. 79-1 avec 10ml de culture des isolats **Vs2**, Vs3 et Vs4 contenant 10^9 bactéries **par** ml.

3. RESULTATS

3.1. Isolement de souches de Rhizobium

Nous avons récolte des nodules sur les deux parcelles après 1 mois de culture. Nous avons remarqué pour les deux **cultivars** 78-1 et 79-1 de Voandzeia subterranea que **les** cortex des nodules est blan ou rouge. Il y avait en **général** 1 nodule "rouge" pour 15 nodules "blancs". Nous avons obtenu à partir de ces nodules 10 isolats purs que nous avons dénommés **Vs1**, **Vs2**, Vs~..... **Vs10** (tableau 2). Aucun de ces isolats ne réagit avec les anticorps fluorescents disponibles au laboratoire.

3.2. Caractérisation des souches de Rhizobium

Lors des repiquages successifs sur milieu **YMA** pour la purification des isolats, nous **avons** remarqué qu'ils étaient tous des slow growing. D'autre part, Voandzeia subterranea se **prête très** bien à une culture hydroponique en tube de GIBSON, et, après 3 semaines de culture en serre, nous avons remarqué des nodules sur les plantes **inoculées** avec les isolats Vs2, Vs3 et Vs4 (tableau 3).

4. DISCUSSION

4.1. Couleur des nodules

La couleur du cortex des nodules de Voandzeia subterranea est un **phénomène** que nous rencontrons pour la deuxième fois. Déjà **en** 1982, nous avons remarqué que le cortex des nodules de Vigna unguiculata était beige ou rouge selon la souche? JARA (1981), puis MULONGOY (comm. pers.) avaient fait les **mêmes** remarques sur Vigna unguiculata. EAGLESHAM et al (1982) observaient des différences de couleur sur les nodules de Glycine max, Arachis hypogaea et Vigna unguiculata. Ces derniers auteurs ont **émis** l'hypothèse d'un pigment ynthétisé par la GUEYE, 1982b

plante, ou par le Rhizobium, ou par les deux.

En ce qui nous concerne, nous pensons qu'il est très important d'étudier cette pigmentation nodulaire afin de mieux comprendre les interactions légumineuse-Rhizobium. Ceci pourrait être utilisé pour l'étude de la compétitivité des Rhizobium.

4.2. Isolément des souches de Rhizobium

Nous n'avons isolé du sol de Bel--Air que 10 souches de Rhizobium à partir des nodules de Voandzeia subterranea. Ceci est relativement insuffisant si nous voulons sélectionner une ou des souches effectives et compétitives sur Voandzeia subterranea. Cependant ceci n'est qu'une initiation du programme sur la fixation biologique de l'azote par cette légumineuse et l'isolement de souches de Rhizobium est loin d'être achevé. Il se fera sur toute l'étendue du territoire **Sénégalais**.

D'autre part Vs2, Vs3 et Vs4 sont des souches isolées au même endroit à partir du même cultivar et à la même date. Nous pouvons penser que Vs2 est différent de Vs3 et de Vs4 car isolés de nodules à coloration externe différente. Par contre, nous ne pouvons pas certifier que Vs3 et Vs4 sont identiques ou différents.

Tableau 2. Rhizobium isolés de Voandzeia subterranea cultivé dans le sol de Bel-Air.

<u>Cultivars</u>	<u>Couleur des nodules</u>	<u>Rhizobium isolés</u>
79-1	Blanc	Vs 1 a*
"	Blanc	Vs 1 b*
"	Blanc	vs 2
"	Rouge	vs 3
"	Rouge	vs 4
"	Rouge	vs 5
"	Blanc	Vs 6
"	Blanc	vs 7
78-1	Rouge	vs 8
"	Rouge	vs 9
"	Blanc	Vs10

*Dans les boîtes de Pétri Vs1, nous avons remarqué deux types de colonies qui repiquées séparément ont donné Vs 1a et Vs 1b.

Tableau 3. Test de nodulation de Voandzeia subterranea cv. 79-1 cultivé dans des tubes de GIBSON et inoculé avec les souches de Rhizobium Vs 2, Vs 3 et Vs 4.

Souches	Nodulation	Nombre de nodules
Témoin		0
vs 2	+	15
vs 3	+	14
vs 4	+	17

5. CONCLUSION

Voandzeia subterranea est une légumineuse tropicale actuellement sous **exploitée** au Sénégal. Le département des productions **végétales** de l'**ISRA** a proposé un programme de recherche sur cette légumineuse à la National Academy of Sciences des Etats Unis d'Amérique. Le financement requis **s'élèvera** à 120.012 dollars US, soit **42.004.200** Francs CFA couvrant une période de 3 ans.

Le travail effectué au laboratoire de microbiologie des sols de l'**ORSTOM** est une ébauche de ce programme. Actuellement nous ne pouvons pas classer les souches **isolées** dans la collection de **micro-organismes** car des expériences complémentaires doivent permettre de mieux les caractériser : il nous **reste** à déterminer le **spectre-d'hôte** de ces isolats, à **étudier** leur **effectivité** à **préparer** leur anticorps fluorescents pour l'étude de la compétitivité. Nous étudierons enfin l'association de Voandzeia subterranea avec Glomus mosseae.

Ceci nous permettra (i) d'étudier la **fixation** réelle de l'azote au champ par une méthode fiable telle que l'utilisation de ^{15}N et (ii) d'envisager la double inoculation au champ de Voandzeia subterranea avec le rhizobium le plus effectif et le plus compétitif et avec Glomus mosseae.

3ème Partie

RECHERCHES COMPLEMENTAIRES SUR LA DOUBLE
INOCULATION DE VIGNA UNGUICULATA AVEC
RBIZOBIUM ET GLOMUS YOSSEAE

1. INTRODUCTION

Parmi Les microorganismes du sol qui interviennent dans la nutrition des plantes, les mycorhizcs à vésicules et à arbuscules (VA) occupent une place **privilégiée**. Ces MVA, en s'associant aux **plantes**, stimulent leur croissance. La stimulation de la croissance de la plante est la conséquence d'une amélioration de **l'absorption** des éléments minéraux, principalement le phosphore (**MOSSE, 1973**) et des oligo-éléments tel que le zinc (**GILMORE, 1971**) dans les **sols** pauvres en ces éléments.

Lors de la préparation de notre thèse de doctorat 3ème cycle, nous avons abordé quelques aspects de la nutrition **minérale** de Vigna unguiculata cv. 58-185 doublement inoculé avec la souche de Rhizobium ORS 407 et avec la souche de champignon endomycorhizien VA; Glomus mosseae. Dans ce rapport nous présentons des résultats complémentaires en ce qui concerne la nutrition en zinc.

2. RAPPEL, DU MATERIEL ET DES METHODES UTILISEES.

2.1. Souches de microorganismes

2.1.1. Souche de Rhizobium

Nous avons utilisé la souche de Rhizobium ORS 407 qui est la plus effective et la plus compétitive parmi huit souches de Rhizobium étudiées (**GUEYE, 1982b**).

2.1.2. Souche de champignon endomycorhizien VA

Nous avons utilisé une souche de champignon endomycorhizien VA, Glomus mosseae provenant de la station **expérimentale** de Rothamsted (Angleterre).

2.2. Cultivar de Vigna unguiculata

Nous avons utilisé un **cultivar** de Vigna unguiculata cv. 58-185 fourni par le Centre de Recherche Agronomique de Bambey.

2.3. Sol

Nous avons axé nos études sur un type de sol: le sol Dek prélevé à Bambey dont les principales **caractéristiques physico-chimiques** sont résumées dans le tableau 4.

2.4. Culture des plantes

2.4.1. Germination des graines

Nous avons stérilisé les graines comme indiqué au § 2.3.1.1. de la 2ème partie. Les plantes obtenues sont repiquées dans des pots en terre cuite de 18cm à raison de 2 par pot.

2.4.2. Culture des plantes dans les pots en terre cuite

Le sol légèrement humidifié (approximativement 50% de la capacité au champ) a été réparti dans des pots en terre cuite de 18cm de diamètre à raison de 1,5 kg de sol par pot. Les pots remplis de sol et recouverts de papier "Graft" ont été ensuite stérilisés à l'autoclave pendant 1 heure à 120°C. Nous avons repiqué les plantules obtenues comme indique au § 2.4.1. dans ces pots à raison de deux plantules par pot. Nous avons arrosé quotidiennement avec 100ml d'eau du robinet. En plus une fois par semaine, nous avons arrosé avec 100 ml de solution HEWITT sans azote ni phosphore contenant par litre $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 90 g; K_2SO_4 : 87g; $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$: 147 g; Fe-EDTA: 2g; solution d'oligo-éléments: 1ml. La solution d'oligo-éléments renferme par litre: $\text{MnSO}_4, 4\text{H}_2\text{O}$: 2,23g; $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$: 0,24g; $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,20g; H_3BO_3 : 3,10g; $\text{Na}_2\text{O}_4\text{Mo}, 2\text{H}_2\text{O}$: 0,25 G. NaCl: 5,9g. La solution HEWITT employée pour l'arrosage a été diluée au quart. Tous les pots ont été placés en plein air sur des tables (h = 1m) pour éviter toute contamination ultérieure causée généralement par les vents de sable.

2.5. Méthodes d'inoculation

2.5.1. Inoculation avec la souche de Rhizobium

Nous avons inoculé chaque plantule par 2ml d'une suspension de Rhizobium ORS 407 provenant d'une culture pure âgée de 7 jours contenant 10^9 bactéries par ml.

Tableau 4. Caractéristiques physico-chimiques du sol Dek de Bambey

		ppm		Granulométrie %					
C total	N total	N minéra- <u>lisable</u>	P total	P assi- milable	Argile	Limon	Sable	pHKCl	pheau
5100	380	103,5	74,8	4,4	6,4	7,3	86,3	7,0	7,8

Toutes ces analyses ont été effectuées au laboratoire de chimie de l'ORSTOM de Dakar. Les caractéristiques sont identiques après stérilisation.

2.5.2. Inoculation avec Glomus mosseae

Nous avons inoculé chaque plantule avec 1 g de poids frais de racines infectées par Glomus mosseae selon la même méthode décrite au paragraphe 2 de la deuxième partie.

2.6. Détermination de la fréquence et de l'intensité d'infection mycorhizienne.

D'une plante de Vigna unguiculata âgée de 7 semaines, nous avons récupéré des fragments du système racinaire que nous avons colorés au bleu de trypan selon la méthode de PHILLIPS et HAYMAN (1970).

La fréquence (F) et l'intensité (I) d'infection mycorhizienne sont déterminées ainsi :

$$F = \frac{\text{nombre de fragments infectés}}{\text{nombre total de fragments observés}} \times 100$$

$$I = \frac{\text{longueur infectée du fragment}}{\text{longueur totale du fragment infecté?}} \times 100$$

2.7. Dosage de l'azote

Les parties aériennes des plantes sont séchées à l'étuve 60°C pendant 72 heures jusqu'à poids constant et l'azote total des parties aériennes des plantes est déterminé par la méthode de KYELDAHL.

2.8. Dosage du phosphore

Les plantes sont séchées comme précédemment et le phosphore total de la plante est déterminé par rapport à une gamme étalon à partir de solutions connues KH_2PO_4 mélangées à HNO_3 .

2.9. Dosage du zinc

Le zinc a été dosé par absorption atomique au laboratoire des Services Scientifiques Centraux de l'ORSTOM à Bondy (FRANCE) selon la méthode d'atomisation électrothermique (PINTA: 1968 et 1973).

2.10. Analyses statistiques

2.10.1. Test de DUNCAN (1955)

Nous avons utilisé le test de DUNCAN au risque de 1% ou 5% pour la comparaison des moyennes.

2.10.2. Analyse factorielle

Nous avons également fait une expérience factorielle du type $(3^m \times 2^n) \times r$ en un seul bloc de k unités dans laquelle:

m désigne le nombre de facteurs à trois niveaux;

n désigne le nombre de facteurs à deux niveaux;

r désigne le nombre de traitements.

L'analyse de cette expérience a été conduite suivant la méthode de VAN DEN DRIESCHE (BECK et nl., 1969).

3. ABSORPTION DU ZINC

Des résultats obtenus lors de la préparation de notre thèse de doctorat ont montré qu'il existe une interaction entre l'apport de zinc et celui du phosphore sur le poids sec des parties aériennes de Vigna unguiculata, cv. 58-185.

Nous rappelons que nous avons initié une expérience factorielle à six répétitions pour étudier la réponse de Vigna unguiculata CV. 58-185 cultivé dans le sol Dek de Bambeï stérile à la mycorrhization avec Glomus mosseae en présence de différentes doses de phosphore et de zinc. Les différents facteurs étudiés étaient les suivants:

- facteur A (doses de zinc): 0 (Zn_0), 2 (Zn_2) ou 5 ppm (Zn_5);
- facteur B (doses de phosphore): 20 P_{20} ou 80 ppm (P_{80});
- facteur C (Glomus mosseae): absence (NM) ou présence (M).

Toutes les plantes ont été inoculées avec la souche de Rhizobium ORS 407.

Les résultats récapitulés au tableau 5 ont été interprétés en utilisant la méthode statistique de VAN DEN DRIESSCHE (BECK et al., 1969).

Nous rappelons également que les plantes non mycorrhisées n'ont pas été contaminées. Le facteur A (apport de zinc aux doses de 2 et 5 ppm) a exercé un effet favorable sur quatre paramètres étudiés; poids sec des nodules, azote total, phosphore total et zinc total des parties aériennes. Les résultats indiquent un effet principal significatif ($p = 0,05$) libre de toute interaction de l'apport de zinc sur ces paramètres (tableau 6), ce qui indique que la faible concentration du zinc est un facteur limitant dans le sol considéré.

4. CONCLUSION

Nous avons déjà précisé que Glomus mosseae stimulait la croissance de Vigna unguiculata en améliorant l'absorption du phosphore par la plante (GUEYE, 1982b).

Par une approche microbiologique, nous avons mis en évidence la carence en zinc du sol Dek de Bambeï. L'inoculation avec Glomus mosseae peut permettre une meilleure exploration de cet oligo-élément peu mobile et améliorer ainsi son absorption par Vigna unguiculata.

Enfin, dans les sols du Sénégal, l'inoculation avec les **champignons** endomycorhiziens tels que Glomus mosseae peut être un facteur d'amélioration de la croissance et de la nutrition des plantes. Déjà des résultats satisfaisants ont été obtenus au champ sur la fixation de l'azote par le soja inoculé avec Glomus mosseae dans les sols de la Casamance (GANRY et al., 1982).

Tableau 5. Poids sec des parties aériennes et des nodules, N total., P total et Zn total de Vigna unguiculata cultivé sur sol Dek stérile pendant 54 jours, inoculé (FI) ou non inoculé (NM) avec Glomus mosseae pour différents niveaux de P et Zn.

Traitement	Poids sec parties aériennes (g/plante)	Poids sec nodules (mg/plante)	N total (mg/plante)	P total (mg/plante)	Zn total (µg/plante)
Zn ₀ P ₂₀ NM	3,40	90,00	75,60	2,80	57,80
Zn ₂ P ₂₀ NM	4,00	101,00	84,80	2,92	81,32
Zn ₅ P ₂₀ NM	3,60	94,00	78,90	3,10	99,50
Zn ₀ P ₈₀ NM	4,30	108,90	91,52	3,38	70,20
Zn ₂ P ₈₀ NM	5,60	123,00	103,35	3,77	153,04
Zn ₅ P ₈₀ NM	5,40	113,20	95,03	3,51	172,80
Zn ₀ P ₂₀ M	3,80	123,50	103,74	3,84	79,80
Zn ₂ P ₂₀ M	4,30	126,70	106,40	3,88	116,10
Zn ₅ P ₂₀ M	4,50	137,10	115,08	4,25	162,00
Zn ₀ P ₈₀ M	4,90	161,90	136,05	5,03	75,11
Zn ₂ P ₈₀ M	6,20	195,80	164,40	6,00	165,29
Zn ₅ P ₈₀ M	6,05	197,47	165,75	6,13	189,54

Pour la signification des abréviations, voir texte.

Tableau 6. Effet principal de l'apport de Zn sur le poids sec des nodules (mg/plante) et sur N total. (mg/plante), P total (mg/plante) et Zn total ($\mu\text{g/plante}$) des parties aériennes de Vigna unguiculata cv. 58-185 cultivé dans le sol Dek de Bambey stérile.

Apport de zinc (ppm)	Poids sec des nodules (mg/plante)	N total (mg/plante)	P total (mg/plante)	Zn total ($\mu\text{g/plante}$)
0	121,07	101,72	3,76	70,72
2-5	136,03	114,21	4,19	142,44

CONCLUSION GENERALE

La mise en place du programme YIRCEN au Sénégal nécessitait une condition primordiale: la constitution d'une collection de culture de microorganismes. Nous avons constitué cette collection qui a la particularité d'être l'unique MIRCEN à disposer de souches de champignons endomycorhiziens à vésicules et à arbuscules.

Cette collection de Rhizohium et de mycorhizes est actuellement au laboratoire de microbiologie des sols de l'ORSTOM à Dakar. Il appartiendra aux responsables du MIRCEN de l'Afrique de l'Ouest :

1 - de **transférer** et d'entretenir la collection au centre d'accueil du MIRCEN, actuellement le Centre de Recherche Agronomique de Bambey;

2 - de demander un numéro de collection au Centre Mondial de Données sur les microorganismes (WDC) à Brisbanc.

Ainsi le MIRCEN de l'Afrique de l'Ouest fera partie intégrante du réseau mondial des NIRCENS en tant que centre de collection de cultures. Le catalogue des souches de microorganismes sera publié très prochainement.

Le programme du YIRCEN se poursuivra conformément au calendrier de travail que nous avons élaboré et que nous avons déposé au département des productions végétales. Pour mener à bien ce programme, il est nécessaire et urgent de lui affecter un personnel satisfaisant en qualification d'abord, en nombre ensuite. A ce titre nous **proposons** le recrutement d'un technicien supérieur dans le cadre du MIRCEN.

B I B L I O G R A P H I E

- AMERICAN SOCIETY for MICROBIOLOGY. 1981. Manual of methods for general bacteriology.
- ASIMI, S., GIANINAZZI-PEARSON, V., GIANINAZZI, S., OBATON, M. et BERTHEAU, Y. 1978. Interactions entre les endomycorhizes à vésicules et arbuscules (VA) et le Rhizobium chez le soja. 103ème Congrès National des Sociétés Savantes, fasc.I. 247-256.
- BAUZON, D., VAN DEN DRIESSCHE, R. et DOMMERGUES, Y. 1969. L'effet litière. I. Influence in situ des litières forestières sur quelques caractéristiques biologiques du sol. Oecol. Plant. 4, 99-122.
- BECK, G., DOMMERGUES, Y. et VAN DEN DRIESSCHE, R. 1969. L'effet litière. II. Etude expérimentale du mouvoir inhibiteur des composés hydrosolubles des feuilles et des litières forestières vis-à-vis de la microflore tellurique. Oecol. Plant 4, 237-266.
- DART, P.J., HUXLEY, P.A., EAGLESHAM, A.R.J., MINCHIN, F.R., SUMMERFIELD, R.J. et DAY, J.M. 1977. Nitrogen nutrition of cowpea (Vigna unguiculata). II. Effects of short-term applications of inorganic nitrogen on growth and yield of nodulated and non nodulated plants. Expl. Agric. 13, 241-252.
- DOMMERGUES, Y.R. 1971. The plant microorganism system. In: Interaction between non-aathogenic soil microorganisms and plants. (Dommergues, Y.R. et Krupa, S.V. Eds.) Amsterdam, Elsevier, 1-37.
- DOMMERGUES, Y. et MANGENOT, F. 1970. Ecologie microbienne du sol. (Eds. Masson et Cie) Paris VI.
- GILMORE, A.E. 1971. The influence of endotrophic mycorrhizae on the growth of peach seedlings. J. Am. Soc. Hort. Sci. 96, 35-38.
- GANRY, F., DIEM, H.G. et DOMMERGUES, Y. 1982. Effect of inoculation with Glomus mosseae on nitrogen fixation by field grown soybeans. Plant and Soil 68, 321-329.

- GUEYE, M. 1982a. Application de la technique des anticorps fluorescents à l'étude de la colonisation du système racinaire de Trifolium alpinum par une souche de Rhizobium trifolii, Cah. ORSTOM., sér. Biol., n° 45, 49-51
- GUEYE, M. 1982b. Vigna unguiculata en symbiose avec Rhizobium et Glomus mosseae. Thèse de doctorat 3ème cycle. Lyon 1, 82 p.
- JARA, P. 1981. Le continuum Rhizobium japonicum-Rhizobium cowpea. Thèse de doctorat 3ème cycle. Aix Marseille 132 p.
- JENSEN, H.L. 1961. The viability of lucerne Rhizobia in soil culture. Nature. 192, 682.
- MICHIN, F.R. et SUMMERFIELD, R. 1978. Potentiel yield improvement in cowpea (Vigna unguiculata) in the role of nitrogen nutrition. Ann. Appl. Biol. 88, 468-473.
- MINCHIN, F.R., SUMMERFIELD, R.J., EAGLESHAW, A.R.J. 1978. Plant genotype-Rhizobium strain interactions in cowpea (Vigna unguiculata [L.] Walp.). Trop. Agric. (Trinidad). 55, 107-115.
- MOSSE, B. 1973. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. Ann. Rev. Phytopath. 11, 171-196.
- NATIONAL ACADEMY of SCIENCES - USA. 1979. Tropical Grain legumes: Resources for the future.
- NORRIS, D.O. 1963. A porcelain bead method for storing Rhizobium. J. Exp. Agric. 31, 255-258.
- NUTMAN, P.S. 1946. Variation within strains of clover nodule bacteria in the size of nodule produced and in the effectivity of the symbiosis. J. Bact. 51, 411-432.
- PHILIPS, J.M. et HAYMAN, D.S. 1970. Improved procedures of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of infection. Trans. Brit. Mycol. Soc. 55, 158-161.

- PINTA, M. 1968. Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux (Comité Inter-Instituts d'Etude des Techniques Analytiques du Diagnostic). Deuxième Colloque Europ. Med. Cont. Alim. Plant. Cult. Seville, Espagne, Septembre 1968, 1-120.
- PINTA, M. 1973, Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux; détermination des éléments Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, par absorption atomique. Oléagineux. 28, 87-92.
- SCHMIDT, E.L. 1974. Quantitative and ecological study of microorganisms in soil by immunofluorescence. Soil. Sci. 118, 141-149.
- VINCENT, J.M. 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. I.B.P. Handbook n°15, Blackwell Scientific Publications (Oxford-Edinburgh).
- VINCENT, J.M.. 1982. Nitrogen fixation in legumes. Academic Press. Sydney, New-York, London, Paris, San Diego,, San Francisco, Sao Paulo, Tokyo, Toronto.
- OLLIVIER, B. 1981. Endomycorhize et Rhizobium en symbiose avec Vigna unguiculata. Thèse doctorat 3ème cycle. Aix-Marseille 100 p.

ANNEXE

FICHE **TECHNIQUE** DES SOUCHES DE **RHIZOBIUM**
ET DES CHAMTGNONS **ENDOMYCORHIZIENS**

LISTE DES OBSERVATIONS UTILISEES DANS LES FICHES TECHNIQUES

- A. alb : Acacia albida
A, biv. : Acacia bivenosa
A. far : Acacia farnesiana
A. hol : Acacia holosericea
A. hyp : Arachis hypogaea
A. mea : Acacia mearnsii
A, nil : Acacia nilotica
A, rad : Acacia raddiana
A. sen : Acacia senegal
A. sey : Acacia seyal
A. sie : Acacia sieberiana
C. -80°C: Congélation- à -80°C
G. max : Glycine max
L. leu : Leucaena leucocephala
V. ung : Vigna unguiculata
YEM : Yeast Extract Medium

Fiche N°1

1. N° de l'échantillon :
 2. Date de la récolte :
 3. Lieu de la récolte :
 4. Nom de l'individu :
 5. Nom de l'organisme :
 6. Nom de l'habitat :

no	description	no	no	no
1	rhizobium	1	00	Rhizobium
2	rhizobium	2	00	s p .
3	rhizobium	3	00	
4	rhizobium	4	00	MAO 1
5	rhizobium	5	00	1983
6	rhizobium	6	00	ORS 701
7	rhizobium	7	00	
8	rhizobium	8	00	Non
9	rhizobium	9	00	Vigna
10	rhizobium	10	00	unguiculata
11	rhizobium	11	00	58-185
12	rhizobium	12	00	oui
13	rhizobium	13	00	
14	rhizobium	14	00	Sénégal
15	rhizobium	15	00	Baol
16	rhizobium	16	00	Bambey
17	rhizobium	17	00	0
18	rhizobium	18	00	14° 43'N
19	rhizobium	19	00	16° 27'O
20	rhizobium	20	00	5100
21	rhizobium	21	00	380
22	rhizobium	22	00	103,5
23	rhizobium	23	00	74,8
24	rhizobium	24	00	4,4
25	rhizobium	25	00	6,4
26	rhizobium	26	00	7,3
27	rhizobium	27	00	86,0
28	rhizobium	28	00	7,0
29	rhizobium	29	00	7,8
30	rhizobium	30	00	GUEYE, M.
31	rhizobium	31	00	1981
32	rhizobium	32	00	GUEYE, M.
33	rhizobium	33	00	1981
34	rhizobium	34	00	c. -80°C
35	rhizobium	35	00	Glycérol
36	rhizobium	36	00	YEM
37	rhizobium	37	00	28°C
38	rhizobium	38	00	
39	rhizobium	39	00	Slow
40	rhizobium	40	00	
41	rhizobium	41	00	
42	rhizobium	42	00	
43	rhizobium	43	00	V. unguiculata
44	rhizobium	44	00	
45	rhizobium	45	00	V. unguiculata
46	rhizobium	46	00	
47	rhizobium	47	00	
48	rhizobium	48	00	ORSTOM

Fiche N°2

1. N° de l'échantillon
 2. Date de l'échantillonnage
 3. Lieu de l'échantillonnage
 4. Nom de l'échantillonneur
 5. Nom de l'organisme

N°	Description	Unité	Volume	Contenu
1	Rhizobium	g	100	Rhizobium
2	SP.	g	100	SP.
3	YAO 2	g	100	YAO 2
4	1983	g	100	1983
5	ORS 571	g	100	ORS 571
6	oui	g	100	oui
7	Sesbânia	g	100	Sesbânia
8	rostrata	g	100	rostrata
9	N0n	g	100	N0n
10	Tige	g	100	Tige
11	Sénégal	g	100	Sénégal
12	Fleuve	g	100	Fleuve
13	Richard-Toli	g	100	Richard-Toli
14	0	g	100	0
15	16" 20'N	g	100	16" 20'N
16	15° 45'c	g	100	15° 45'c
17		g	100	
18		g	100	
19		g	100	
20		g	100	
21		g	100	
22		g	100	
23		g	100	
24		g	100	
25		g	100	
26		g	100	
27		g	100	
28		g	100	
29		g	100	
30		g	100	
31		g	100	
32		g	100	
33		g	100	
34		g	100	
35		g	100	
36		g	100	
37		g	100	
38		g	100	
39		g	100	
40		g	100	
41		g	100	
42		g	100	
43		g	100	
44		g	100	
45		g	100	
46		g	100	
47		g	100	
48		g	100	
49		g	100	
50		g	100	
51		g	100	
52		g	100	
53		g	100	
54		g	100	
55		g	100	
56		g	100	
57		g	100	
58		g	100	
59		g	100	
60		g	100	
61		g	100	
62		g	100	
63		g	100	
64		g	100	
65		g	100	
66		g	100	
67		g	100	
68		g	100	
69		g	100	
70		g	100	
71		g	100	
72		g	100	
73		g	100	
74		g	100	
75		g	100	
76		g	100	
77		g	100	
78		g	100	
79		g	100	
80		g	100	
81		g	100	
82		g	100	
83		g	100	
84		g	100	
85		g	100	
86		g	100	
87		g	100	
88		g	100	
89		g	100	
90		g	100	
91		g	100	
92		g	100	
93		g	100	
94		g	100	
95		g	100	
96		g	100	
97		g	100	
98		g	100	
99		g	100	
100		g	100	

Dreyfus
 1981
 Dreyfus
 1981
 C.-80°C
 Glycérol
 YEM
 28°C
 N₂, 66% GC
 Past
 S. rostrata
 S. rostrata
 ORSTOM-Dakar

Fiche N°20

1. Rhizobium
 2. MAO 20
 3. 1983
 4. ORS 923
 5. Non
 6. Acacia
 7. raddiana
 8. oui
 9. Sénégal
 10. Sénégal-Oriental
 11. Bakel
 12. 0
 13. 14° 50'N
 14. 12° 30'O
 15. Cornet, F
 16. 1981
 17. Cornet, F.
 18. 1981
 19. c. -80°C
 20. Glycérol
 21. YVM
 22. 28°C
 23. Fast
 24. A. raddiana
 25. A. raddiana
 26. ORSTOM-Dakar

no	description	no	no	no
1	Rhizobium	1	14	Rhizobium
2	MAO 20	2	15	sp.
3	1983	3	16	MAO 20
4	ORS 923	4	17	1983
5	Non	5	18	ORS 923
6	Acacia	6	19	Non
7	raddiana	7	20	Acacia
8	oui	8	21	raddiana
9	Sénégal	9	22	oui
10	Sénégal-Oriental	10	23	Sénégal
11	Bakel	11	24	Sénégal-Oriental
12	0	12	25	Bakel
13	14° 50'N	13	26	0
14	12° 30'O	14	27	14° 50'N
15	Cornet, F	15	28	12° 30'O
16	1981	16	29	Cornet, F
17	Cornet, F.	17	30	1981
18	1981	18	31	Cornet, F.
19	c. -80°C	19	32	1981
20	Glycérol	20	33	c. -80°C
21	YVM	21	34	Glycérol
22	28°C	22	35	YVM
23	Fast	23	36	28°C
24	A. raddiana	24	37	Fast
25	A. raddiana	25	38	A. raddiana
26	ORSTOM-Dakar	26	39	A. raddiana

1. N° de l'échantillon
 2. Date de l'échantillonnage
 3. Lieu de l'échantillonnage
 4. Nom de l'échantillonneur
 5. Nom de l'organisme

N°	DESCRIPTION	PRO	INDIC	REMARQUES
1	1. B. JAPON	1	1	Rhizobium
2	2. B. JAPON	1	1	japonicum
3	3. B. JAPON	1	1	
4	4. B. JAPON	1	1	MAO 33
5	5. B. JAPON	1	1	1983
6	6. B. JAPON	1	1	USDA 138
7	7. B. JAPON	1	1	
8	8. B. JAPON	1	1	oui
9	9. B. JAPON	1	1	Glycine
10	10. B. JAPON	1	1	max
11	11. B. JAPON	1	1	
12	12. B. JAPON	1	1	oui
13	13. B. JAPON	1	1	
14	14. B. JAPON	1	1	U.S.A.
15	15. B. JAPON	1	1	Missipi
16	16. B. JAPON	1	1	
17	17. B. JAPON	1	1	
18	18. B. JAPON	1	1	
19	19. B. JAPON	1	1	
20	20. B. JAPON	1	1	
21	21. B. JAPON	1	1	
22	22. B. JAPON	1	1	
23	23. B. JAPON	1	1	
24	24. B. JAPON	1	1	
25	25. B. JAPON	1	1	
26	26. B. JAPON	1	1	
27	27. B. JAPON	1	1	
28	28. B. JAPON	1	1	
29	29. B. JAPON	1	1	
30	30. B. JAPON	1	1	
31	31. B. JAPON	1	1	
32	32. B. JAPON	1	1	
33	33. B. JAPON	1	1	
34	34. B. JAPON	1	1	
35	35. B. JAPON	1	1	
36	36. B. JAPON	1	1	
37	37. B. JAPON	1	1	
38	38. B. JAPON	1	1	
39	39. B. JAPON	1	1	
40	40. B. JAPON	1	1	
41	41. B. JAPON	1	1	
42	42. B. JAPON	1	1	
43	43. B. JAPON	1	1	
44	44. B. JAPON	1	1	
45	45. B. JAPON	1	1	
46	46. B. JAPON	1	1	
47	47. B. JAPON	1	1	
48	48. B. JAPON	1	1	
49	49. B. JAPON	1	1	
50	50. B. JAPON	1	1	
51	51. B. JAPON	1	1	
52	52. B. JAPON	1	1	
53	53. B. JAPON	1	1	
54	54. B. JAPON	1	1	
55	55. B. JAPON	1	1	
56	56. B. JAPON	1	1	
57	57. B. JAPON	1	1	
58	58. B. JAPON	1	1	
59	59. B. JAPON	1	1	
60	60. B. JAPON	1	1	
61	61. B. JAPON	1	1	
62	62. B. JAPON	1	1	
63	63. B. JAPON	1	1	
64	64. B. JAPON	1	1	
65	65. B. JAPON	1	1	
66	66. B. JAPON	1	1	
67	67. B. JAPON	1	1	
68	68. B. JAPON	1	1	
69	69. B. JAPON	1	1	
70	70. B. JAPON	1	1	
71	71. B. JAPON	1	1	
72	72. B. JAPON	1	1	
73	73. B. JAPON	1	1	
74	74. B. JAPON	1	1	
75	75. B. JAPON	1	1	
76	76. B. JAPON	1	1	
77	77. B. JAPON	1	1	
78	78. B. JAPON	1	1	
79	79. B. JAPON	1	1	
80	80. B. JAPON	1	1	
81	81. B. JAPON	1	1	
82	82. B. JAPON	1	1	
83	83. B. JAPON	1	1	
84	84. B. JAPON	1	1	
85	85. B. JAPON	1	1	
86	86. B. JAPON	1	1	
87	87. B. JAPON	1	1	
88	88. B. JAPON	1	1	
89	89. B. JAPON	1	1	
90	90. B. JAPON	1	1	
91	91. B. JAPON	1	1	
92	92. B. JAPON	1	1	
93	93. B. JAPON	1	1	
94	94. B. JAPON	1	1	
95	95. B. JAPON	1	1	
96	96. B. JAPON	1	1	
97	97. B. JAPON	1	1	
98	98. B. JAPON	1	1	
99	99. B. JAPON	1	1	
100	100. B. JAPON	1	1	