

1002/83

450

REPUBLIQUE DU SENEGAL
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

SECRETARIAT D'ETAT
A LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

CN0100845
P342
NDI

ASPECTS QUANTITATIFS ET QUALITATIF
DES SOUCHES DE RHIZOBIIUM SPECIFIQUES DE L'ARACHIDE DANS
3 SOLS Du SENEGAL

ETUDE PRELIMINAIRE

par

Mamadou NDIAYE

Centre National de Recherches Agronomiques
de Bambey

INSTITUT SENEGALAIS DE RECHERCHES AGRICOLES
(I.S.R.A.)

AVANT PROPOS

Ce travail est une partie d'une étude qui a été réalisée dans le laboratoire de Microbiologie de l'INRA de Dijon sous les directives de Mademoiselle AMARGER, Maître de Recherches à l'INRA (France).

Il a fait l'objet d'un mémoire soutenu le 18 mars 1980 en vue d'obtenir le diplôme d'ingénieur de l'Ecole Nationale d'Ingénieur des Techniques Agricoles de Dijon-Quétigny.

1 - INTRODUCTION

Dans les pays tempérés, les souches de *Rhizobium* autochtones sont généralement efficaces : en France les souches de *Rhizobium meliloti* sont d'une efficacité moyenne ou élevée (OBATON, 1975) et celle de *Rhizobium leguminosarum* intermédiaire (AMARGER, 1974). En outre le nombre de ces souches natives varie très peu d'une saison de culture à l'autre. Par contre les *rhizobium* tropicaux sont fréquemment inefficaces, à cause des conditions extrêmes du milieu et des particularités propres aux légumineuses tropicales (OBATON, 1975). Dans ces zones, la richesse des sols en populations rhizobiales est sujette à d'énormes fluctuations en cours d'année.

Au Sénégal, peu d'investigations concernant le niveau d'efficacité des souches de *Rhizobium cowpea*, notamment celles spécifiques de l'arachide, ont été réalisées. Quelques travaux (JAUBERT, 1951 et 1952 ; OULIE, 1971 ; SARA, 1981) ont montré que les souches autochtones présentes dans les sols sont d'une efficacité très variable selon la légumineuse-hôte. Cependant, on ne dispose d'aucune donnée concernant le nombre de *Rhizobium* présents dans les sols.

Dans cette première étude, nous avons réalisé un sondage afin d'avoir une idée des populations rhizobiales spécifiques de l'arachide. Ce sondage porte sur trois échantillons de terre provenant de localités différentes et sur lesquels nous avons dénombré les *Rhizobium* et isolé des souches en vue de tester leur efficacité symbiotique.

2 - ISOLEMENT DE SOUCHES

21 - Matériel

Les échantillons de terre utilisés proviennent des localités suivantes : Bambey, Nioro, Louga et Thiilmakha. Un échantillonnage moyen de plusieurs prélèvements à l'horizon 0-20, a été effectué dans des champs de paysans.

Deux variétés d'arachide sont utilisées pour ce test ; il s'agit de la variété 73-33 semi tardive (110 jours) et de la variété 73-30 précoce (90 jours),

22 - Technique : Préage des *Rhizobium*

Lorsqu'une légumineuse est mise en culture dans un sol contenant les *Rhizobium* spécifiques, elle forme des nodosités visibles au bout d'un certain temps de végétation. Ces nodosités sont prélevées (après 2 mois de végétation) et désinfectées avec une solution aqueuse de HgCl₂ à 1% pendant 5 minutes, et rincées 7 fois à l'eau stérile. On fait ensuite une suspension nodulaire avec chaque nodosité et celle-ci estensemencée dans une boîte de pétri contenant du milieu de culture gelosé. Après incubation à 28°C dans une chambre de culture, des colonies bactériennes apparaissent au bout de 8 à 15 jours et elles sont purifiées par étalements successifs.

23 - Résultats - Discussion

Plusieurs souches ont été isolées des différents sols à partir des nodosités. Mais seules ont été gardées celles ayant induit la nodulation sur *Macroptilium atropurpureum* (tableau n° 1) ; on sait, en effet, que les *Rhizobium* du groupe cowpea forment des nodosités sur *Macroptilium atropurpureum* (Var. siratro) (VINCENT, 1970) et que le *Rhizobium* de l'arachide (*Arachis hypogaea*) de ce groupe.

Nous avons utilisé cette légumineuse à petites graines, facilement cultivable en tube, pour avoir assez rapidement des résultats et par défaut d'une technique rapide de culture de l'arachide (légumineuse à grosses graines). Cependant il n'a pu être procédé à un isolement d'un nombre important de souches. Ceci pourrait être dû à la prolifération de contaminants qui masquent ou inhibent la croissance du *Rhizobium*. Ainsi pour le sol de Thiilmakha aucune souche n'a pu être isolée à partir des quelques nodosités prélevées.

3 - ESTIMATION DES RHIZOBIUM DANS LE SOL

Afin d'estimer la richesse du sol en Rhizobium, nous avons réalisé un sondage portant sur 4 échantillons de sols sur lesquels nous avons dénombré les Rhizobium par la méthode des dilutions successives.

31 - Matériel

Les échantillons de terre de Bambey, Louga, Nioro et Thilmakha sont utilisés.

Comme plate-test, nous avons utilisé Macroptillium atropurpureum.

32 - Technique

Les graines désinfectées, sont semées dans des tubes de 22 mm de diamètre et 220 mm de long contenant 30 g de sable additionnés de 6 ml de milieu Pochon liquide dilué au 1/4 (l'ensemble du tube étant stérilisé à 120°C pendant 20 minutes, avant le semis des graines). A la levée des plantes, on les inocule avec les différentes dilutions à raison de 4 tubes par dilution. Au bout de 4 à 5 semaines, le nombre de tubes, où les plantes sont nodulées, est compté et le nombre le plus probable (Npp) de Rhizobium dans la dilution de départ, nous est donné par les tables de VINCENT.

On vérifie d'abord la validité de cette méthode en effectuant des dénombrements parallèles sur boîte dépetri et sur tube préparé comme décrit plus haut à partir de suspensions bactériennes de 2 souches spécifiques de l'arachide : GU₁ et GU₁₉.

Les résultats de ce test préliminaire sont les suivants :

Souches		Sur boîte		Sur tube
GU ₁	Bactéries par ml	13,6 x 10 ⁸	9,5 x 10 ⁸	~Intervalle de confiance à 95 % 2,03 x 10 ⁸ < x ₁ < 44,46 x 10 ⁸
GU ₁₉	Bactéries par ml	1,11 x 10 ⁹	2,5 x 10 ⁹	Intervalle de confiance à 95 % 0,53 x 10 ⁹ < x ₂ < 11,70 x 10 ⁹

On obtient donc le même nombre de bactéries pour chaque souche, ce qui nous autorise à utiliser le Macroptillium atropurpureum pour dénombrer les Rhizobium de l'arachide.

33 - Résultats - Discussion

Les résultats obtenus pour les dénombrements des Rhizobium cowpea des échantillons de terre sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Echantillons de terre	Humidité % de terre fraîche	PH	Nombre plus probable (N.P.P.) de Rhizobium par g de terre sèche.	Limite de confiance N.P.P. à 95%
BAMBEY	0,40	5,8	1,0 x 10 ³	2,60 x 10 ² < N.P.P. < 3,8 x 10 ³
LOUGA	0,25	5,7	5,9 x 10 ³	1,5 x 10 ³ < N.P.P. < 3,2 x 10 ⁴
NIORO	0,25	5,3	31	8,1 < N.P.P. < 120
THILMAKHA	5,75	5,2	33	8,7 < N.P.P. < 120

Les échantillons de terre en provenance de Bambey et de Louga contiennent environ 10^3 Rh/g de terre alors que ceux provenant de Nioro et de Thilmakha sont très peu peuplés en Rhizobium : 30 Rh/g terre sèche.

L'abondance de la population rhizobiale dans ces sols semble être de niveaux différents. Dans les zones de Nioro et de Thilmakha, le nombre de Rhizobium peut être un facteur limitant pour l'établissement d'une symbiose fixatrice d'azote auquel cas l'inoculation de souches efficaces est intéressante. Par contre les sols de Bambey et de Louga semblent bien pourvus en Rhizobium ; dans ce cas l'inoculation bactérienne n'est pas indispensable, si toutefois les souches autochtones sont efficaces.

Ces résultats apportent des éléments intéressants dans les études de l'écologie rhizobienne et mériteraient d'être confirmés avec des échantillons de taille plus importante afin de vérifier si les résultats obtenus traduisent bien la variabilité inter-zone.

4 - ETUDE COMPARATIVE DE L'EFFICIENCE DES SOUCHES DE RHIZOBIUM NATIVES

Cette étude a pour but de sélectionner des souches de Rhizobium spécifiques de l'arachide pour leur capacité à fixer N_2 .

41 - Méthode utilisée

L'inoculation bactérienne, de plantules cultivées dans un substrat inerte dépourvu d'azote minéral, permet d'apprécier le degré d'efficacité des souches. L'azote de la plante ne provient que de la fixation, hormis l'azote des réserves de la graine. Dans ce cas, la croissance de la plante est fonction de la quantité d'azote fixé, donc de l'efficacité de la souche de Rhizobium.

42 - Matériel expérimental

• La variété 73-30 semi-précoce et bien adaptée à la sécheresse, est utilisée.

• Une souche d'efficacité connue sur Arachis hypogea, en l'occurrence la CB 756, est testée avec des souches naturelles originaires du Sénégal et des mutants résistants à la moyenne. Ces souches sont les suivantes :

S E N E G A L				Mutants résistants à la neomycine	Australie	Guadeloupe
BAMBEY	LOUGA	NIORO	*			
B 36	L35	NO6	B 209	98 N ₂ , SU ₁ N ₁	CB 756	GU ₁
B 37	L05	N33		CBN ₁ , 298 AN ₁		
B 32	L02	N32				

* Souche isolée par le Dr. SCHMIDT, professeur à l'université du Minnesota.

Des pots en matière plastique munis à leur base de tuyau en caoutchouc pour permettre la percolation, sont désinfectés à l'eau de javel et remplis de perlite et de gravier au fond.

Le dispositif expérimental est une randomisation totale avec 3 répétitions.

43 - Réalisation de l'essai

Les graines sont préalablement désinfectées par trempage dans une solution d'hypochlorite de calcium à 6,7 % pendant 30 minutes et rincées 8 fois à l'eau stérile. Ensuite elles sont semées à raison de 6 graines/pot et les plantes sont ramenées à 3 par pot à la levée.

L'inoculation est faite avec 10 ml de suspension bactérienne soit l'équivalent de 10^{10} Rhizobium/pot (soit $3,3 \times 10^9$ Rhizobium/plante).

Les plantes sont cultivées en serre où la température et l'humidité sont contrôlées. La nutrition minérale est assurée par un apport de milieu minéral liquide sans azote.

44 - Résultats - Discussion

Les résultats de l'ensemble de l'essai ainsi que l'analyse et la comparaison des moyennes des souches sont données dans le tableau 2. Cette analyse fait ressortir un effet "souche" très hautement significatif. La comparaison des moyennes par le test de Newman et Keuls permet de distinguer deux groupes de souches qui diffèrent significativement :

- un groupe de 2 souches B209 et N33 inefficaces ;
- un groupe de 14 souches efficaces dans lesquels les souches extrêmes sont différentes.

On peut noter que les trois meilleures souches sont isolées à partir d'un même sol, celui de Bambey. En effet, si l'on exprime l'efficacité de chaque souche en pourcentage de la souche CB 756, jugée bonne fixatrice, on obtient un histogramme (graph:1) qui montre que 5 souches ont une performance supérieure à 100% parmi lesquelles les 3 souches de Bambey atteignent des niveaux supérieurs à 110%. Les souches isolées à partir du sol Bambey semblent être d'un niveau d'efficacité supérieur à celui des autres souches isolées des sols de Nioro et de Louga. Le nombre réduit de souches en testage ne nous permet cependant, de juger avec précision de la dispersion des populations naturelles ; mais nous obtenons déjà des souches supérieures à la référence CB 756.

5 - CONCLUSION

Cette étude préliminaire effectuée sur l'efficacité et la densité des populations du Rhizobium de l'arachide dans 3 types de sols sénégalais, permet de préciser des causes possibles de la limitation de la fixation symbiotique de l'arachide. Elle n'a cependant qu'une valeur préliminaire et devrait être contrôlée avec des échantillons représentatifs des différentes localités.

On sait, en effet, que la distribution des populations microbiennes du sol suit, soit la loi de Poisson (distribution au hasard) soit la loi binomiale négative (distribution en agrégat) mais jamais la loi de GAUSS. Elle est donc toujours hétérogène.

Pour tenir compte de cette hétérogénéité, il convient de choisir à bon escient la répartition et le nombre des échantillons.

Le travail de méthodologie accompli a permis de constituer un début de collection de souches de Rhizobium spécifiques de l'arachide.

Le nombre de Rhizobium de l'arachide est faible surtout dans les sols provenant de Nioro et de Thilmakha. Dans ces sols, l'inoculation du sol avec des souches efficaces pourrait être envisagée mais une correction du pH par des amendements calciques doit être un préalable à cette pratique. Par contre les sols de Bambey et de Louga sont bien pourvus en Rhizobium et l'inoculation ne saurait procurer des gains appréciables de rendements, du moins dans la zone de Bambey où les souches sont très efficaces. Dans la zone de Louga où les Rhizobium présents sont d'un niveau d'efficacité moyen, on pourrait faire former les nodosités par des souches plus efficaces et compétitives par l'inoculation du sol.

Ce résultat peut donc être pratiquement très important dans une perspective d'amélioration de la fixation symbiotique de l'arachide.

Tableau n° 1 : Origine des souches isolées

BAMBEY		LOUGA		NIORO	
Souches	Nodulation *	Souches	Nodulation #	Souches	Nodulation *
B 32	+	L ₃₁	4	N ₃₂	+
B 33	+	L ₃₅	+	N ₃₃	+
B 34	+	L ₀₁	+	N ₀₃	+
B 35	+	L ₀₂	+	N ₀₆	+
B 31	+	L ₀₃	+		
B 36	4	L ₀₄	+		
B 37	+	L ₀₅	+		
B 04	4	L ₀₇	+		
B 03	+	L ₀₈	+		
B 06	4	L ₃₃	+		
B 08	4				
B 09	4				

Légende du tableau

+ présence de nodosité

* nodulation sur Macroptillium atropurpureum

La lettre indique l'origine des sols à partir desquels les souches ont été isolées :

B = BAMBEY ; L = LOUGA ; N = NIORO

Le premier chiffre indique le variété d'arachide à l'origine des nodosités (3 = variété 73-33 0 = 73-30).

Tableau n° 2 : Classement des souches (risque 5 %)

Souches	Moyennes de 3 répétitions (M.S g/pot)	Comparaison NEWMAN et KEULS 5 %
B 36	12,97	
B 32	11,56	
B 37	11,28	
SU ₁ N ₁	10,73	
Sm ₁ N ₂	10,58	
CB756	10,11	
LO 2	9,11	
N 32	8,72	
CBN ₁	7,94	
NO ₆	7,84	
GU ₁	7,29	
L 35	6,82	
98 N ₂	6,32	
LO 5	5,81	
N 33	2,69	
B 209	2,15	

-- BIBLIOGRAPHIE --

AMARGER, N. (1974)

Aspect **microbiologique** de la culture de la **feverole** en **France**
Acad. Agr. Pr., 60, 105-112.

JARA, P. (1981)

Le continuum **japonicum** - **Rhizobium cowpea**
Thèse de Doctorat de Spécialité 132 pages.

JAUBERT, P. (1951)

Première étude au **Sénégal** des bactéries symbiotiques de l'arachide
Ann. du C.R.A. ; 5, 155-164.

JAUBERT, P. (1952)

Deuxième étude de la symbiose bactérienne des légumineuses au **Sénégal**
(**Casamance**)
Ann. du C.R.A., 8, 77-97.

OBATON, M. (1975)

Effectiveness, Saprophytic and Competitive Ability.
Three Properties of Rhizobium Essential for Increasing the yield of
Inoculated legumes.
In **Biological Nitrogen Fixation in Farming Systems of the Tropics**
edited by A. AYAMABA and P.J. DART. **John Wiley and Sons** Chichester
New-York **Bristono** - Toronto.

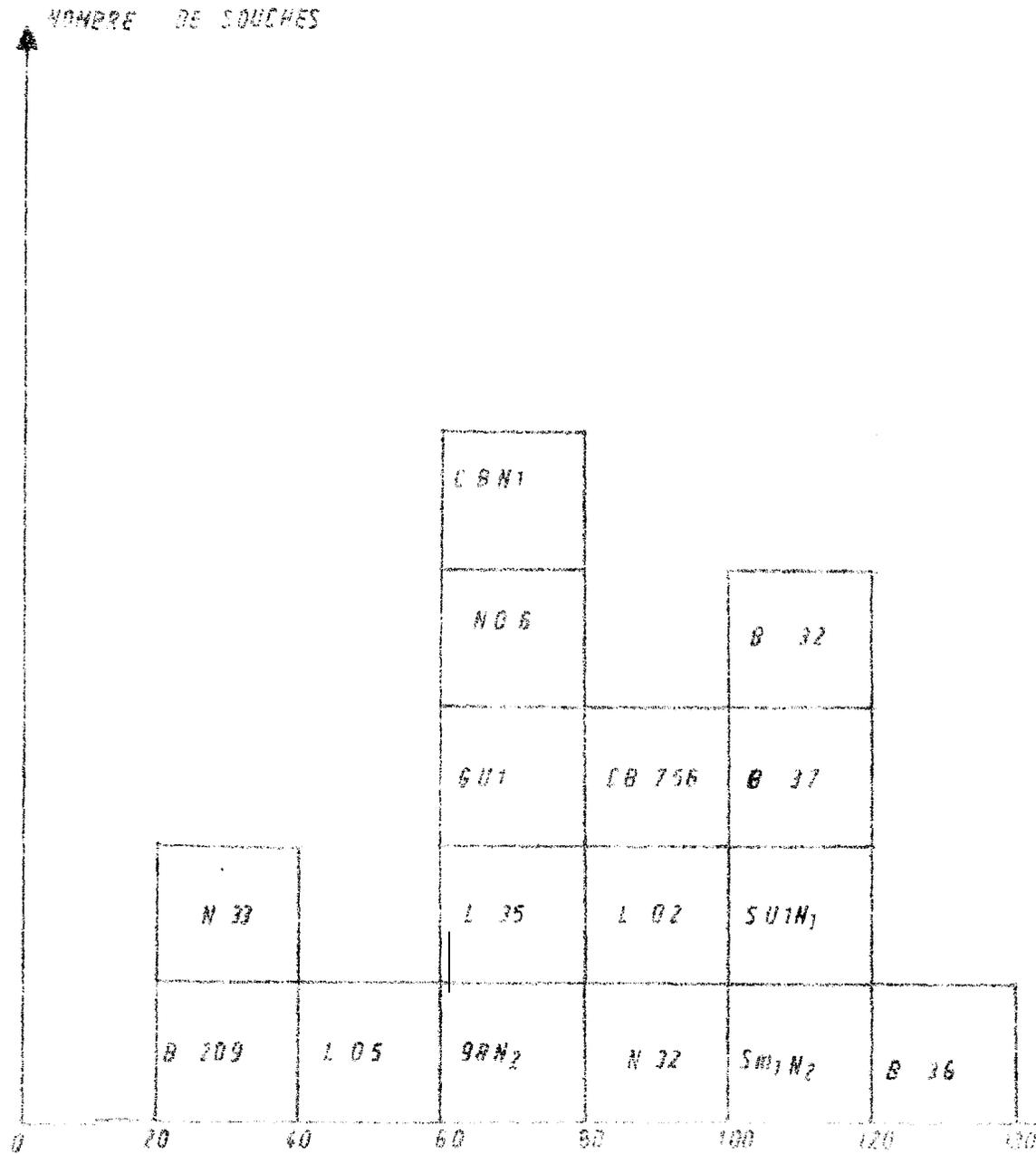
OULIE, B. (1971)

Synthèse des études réalisés au **Sénégal** sur la symbiose **Rhizobium-**
légumineuse
Doc. Ronéo **CNRA** **Bambey**, **Sénégal**.

VINCENT, J.M. (1970)

Amannual for practical study of **Root-Nodule Bacteria.**
I.B.P. Handbook, n° 15, p. 160.

GRAPHIQUE 1 HISTOGRAMME ET FREQUENCE DES DONNÉES



N 3

98 10 756