

ETUDES PRELIMINAIRES SUR QUATRE ARBRES

FIXATEURS D'AZOTE

PAR

Ousmane DIAGNE *

RESUME

A cause de la destruction des forêts pour les besoins agricoles, il y a une dégradation continue des sols. Pour reforester, il est nécessaire d'utiliser des arbres qui peuvent croître rapidement sur ces sols dégradés. Heureusement, de tels arbres existent : ce sont des arbres fixateurs d'azote (AFA).

Nous avons étudié quatre espèces d' AFA : *Prosopis africana*, *Prosopis juliflora*, *Albizia lebbbeck* et *Leucaena leucocephala*.

Prosopis africana et *Albizia lebbbeck* ont été bien nodulés dans les sols du sud du Sénégal tandis que *Prosopis juliflora* et *Leucaena leucocephala* ne l'ont pas été.

Des souches de *Rhizobium* ont été isolées de ces espèces d' AFA et leur spectre d'hôte déterminé. Leur aptitude à fixer l'azote a été estimée au laboratoire.

SUMMARY

Due to forest destruction for agricultural purposes, soils are being continuously damaged. To reforest, it is necessary to use trees capable of growing rapidly on these damaged soils. Fortunately, such trees do exist : nitrogen fixing trees.

Four species of nitrogen fixing trees have been studied : *Prosopis africana*, *Prosopis juliflora*, *Albizia lebbbeck* and *Leucaena leucocephala*.

Prosopis africana and *Albizia lebbbeck* have been successfully nodulated

* Chercheur de I.T.S.R.A - Direction des Recherches sur les Productions Forestières

in southern **Senegal** soils, whereas *Prosopis juliflora* and *Leucaena leucocephala* have not.

Rhizobium clones of these species have been isolated and their host characteristic determined. Their ability to fix **nitrogen** was estimated in the laboratory.

RESUMO

Devido à **destruição** das florestas para satisfazer as necessidades agícolas, existe uma **degradação** continua dos solos. Para uma **repovoação** florestal, é preciso utilizar **árvores** que possam **crescer** rapidamente nestes solos **degradados**. Felizmente, tais **árvores** existem : **são árvores** fixadores de azoto (**AFA**).

Vimos estudando quatro **espécies** de **AFA** : *Prosopis @ricana*, *Prosopis juliflora*, *Albizia lebbbeck* e *Leucaena leucocephala*.

Prosopis africana e *Albizia lebbbeck* foram noduladas com sucesso nos solos do sul do Senegal, enquanto que *Prosopis juliflora* e *Leucaena leucocephala* **não** foram.

Talos de *Rhizobium* foram **isolados** destas espécies de **AFA**, e **determinou-se** o seu espectro de **hóspede**. As suas **aptidões** a **fixar** o azoto foram **avaliadas** em **laboratório**.

INTRODUCTION

L'étude des arbres fixateurs d'azote (**AFA**) répond à la **préoccupation** des pays tropicaux et subtropicaux de trouver des arbres capables d'augmenter la production en **biomasse** **susceptibles** de contribuer à la lutte contre la **dégradation** continue de leurs sols.

Les **AFA** ont l'avantage de s'adapter aux conditions écologiques assez rudes des pays **soudano-sahéliens**, de croître rapidement et surtout d'être peu exigeants sur le plan nutritionnel.

Les **AFA non-légumineuses** sont l'objet de plusieurs travaux (DIEM et DOMMERGUES 1984).

Parmi les **légumineuses**, le genre *Acacia* a déjà été très étudié (ALLEN et ALLEN, 1981). Nous avons entrepris l'étude d'autres **légumineuses** arborescentes très utilisées actuellement par les services forestiers de la zone **soudano-sahélienne** dans les campagnes de reboisement et peu étudiées sur le plan microbiologique.

Les **AFA** ont besoin pour leur nutrition **azotée** de s'associer au *Rhizobium* qui est leur endophyte responsable de la fixation d'azote (**N₂**). La fixation a lieu au niveau des excroissances racinaires **appelées** nodules. Elle se manifeste au niveau de la plante hôte par une stimulation de la croissance et un meilleur aspect végétatif dans les sols déficients en azote.

Nos recherches préliminaires ont porté sur l'étude de la nodulation de quatre **AFA** : *Prosopis africana*, *Prosopis juliflora*, *Albizia lebbbeck* et *Leucaena leucocephala*.

L'objectif de ce travail est orienté d'abord vers le piégeage et l'isolement de souches de *Rhizobium* à partir de plusieurs sols du sud du **Sénégal**, puis vers la sélection de souches effectives et de plantes-hôtes.

MATERIEL ET METHODE

Matériel végétal

Les graines des plantes que nous avons étudiées ont été prélevées dans différentes stations de recherches du Centre National de Recherches Forestières de Dakar. Il s'agit des

graines de :

<i>Prosopis africana</i> :	Forêt des Bayottes-Avril 1982
<i>Prosopis juliflora</i> :	Saint-Louis-Mars 1979
<i>Albizia lebeck</i> :	Bandia - Janvier 1981
<i>Leucaena leucocephala</i> :	Yoff - Juillet 1980.

Sols utilisés

Les sols utilisés au cours des piégeages de *Rhizobium* ont été prélevés entre 5 et 15 cm de profondeur. Il s'agit de sols provenant de la forêt naturelle, prélevés dans différentes localités du sud du Sénégal, à savoir : Diouloulou, **Djibélor**, Bayottes, Dabo et Botou.

Ce sont des sols essentiellement sableux (60 à 80 %), pauvres en azote (0,055 %) et déficients en phosphore assimilable (12 ppm de $P_2 O_5$).

Dans les expériences de testage de souches de *Rhizobium* nous avons utilisé du sol de la localité de **Cambérène**, constitué surtout de sable (98 %).

Méthode de prégermination des graines

Les graines ont été d'abord stérilisées superficiellement par immersion dans H_2SO_4 concentré puis rincées abondamment dans de l'eau stérile. Les temps d'immersion sont variables selon les espèces végétales : *Prosopis africana* (2h) *P. juliflora* (15 mn) ; *Albizia lebeck* (1h) ; *Leucaena leucocephala* (30mn).

Les graines ont été ensuite transférées aseptiquement pour être mises à germer dans un plateau contenant du sable stérilisé à l'autoclave pendant 1h à 120 °C. Les récipients de germination ont été placés à l'obscurité dans une pièce à 30°C.

Méthode de piégeage

Nous avons utilisé des sachets en polyéthylène de 24 cm x 11 cm percés de quatre trous à la base. Ces sachets ont été remplis aux 3/4 de sol provenant des cinq stations de prélèvement précitées. Une couche de 3 cm d'épaisseur de billes de polystyrène a été déposée à la surface des sols pour conserver leur humidité et diminuer les risques de contaminations.

Les plantules-pièges ont été apportées dans les sachets par repiquage après prégermination des graines. Dans chaque sachet, nous avons repiqué trois plantules à raison de cinq sachets par espèce végétale. Au total il y a eu alors quinze répétitions par traitement.

Les plantes ont été maintenues en serre à température ambiante (25 à 30 °C) et sous éclairage naturel. L'arrosage a été fait tous les jours avec de l'eau de robinet.

Isolement des souches de *Rhizobium*

Le milieu d'isolement utilisé est le milieu classique à base d'extrait de levure et de mannitol YEMA (VINCENT, 1970). Cependant, il est à noter que le développement de différentes souches de *Rhizobium* est influencé par le pH du milieu de culture (HAL-LIDAY et SOMASEGARAN, 1982).

Les nodules issus du piégeage ont été désinfectés à l'alcool 90 °C puis à l'aide d'une solution de $HgCl_2$. Après rinçage à l'eau stérile, les nodules ont été coupés et une suspension du tissu central a été prélevée puis étalée sur une boîte de Pétri contenant du milieu YEMA.

Après incubation à l'étuve à 30 °C, les colonies formées ont été repiquées pour vérifier leur pureté.

Culture des plantes dans les tests d'infection

Pour confirmer l'appartenance des souches **isolées** au genre *Rhizobium*, nous avons élevé les plantes dans des tubes de GIBSON (1963). Ces tubes contiennent du milieu nutritif **JENSEN** **gélifié** autoclave à 120 C pendant 20 mn puis incliné. Ils ont été incubés dans une pièce à 27°C sous un éclairage de 20 000 lux pendant 16h par jour.

Dans **les** tests de nodulation sur sol stérilisé, nous avons utilisé des pots en plastique de 6 cm de diamètre. Ces pots ont été remplis d'un **mélange** de sol et de coques d'arachide préalablement stérilisées à l'autoclave pendant 1 h à 120°C.

Après **prégermination**, les plan **tules** ont été repiquées dans les pots au nombre de trois par pot avec trois pots par traitement, d'où **neuf** répétitions au total.

Nous avons apporté tous les mois dans chaque pot 25 ml d'un milieu nutritif HOAGLANG dilué au 1/4 et sans azote. L'arrosage journalier a **été** fait avec de l'eau de robinet. Une couche de gravier fin a été déposée dans les pots pour diminuer l'**évapo**-ration. Le dispositif est placé en serre à la température ambiante (voir Fig1 : **méthodes** de culture).

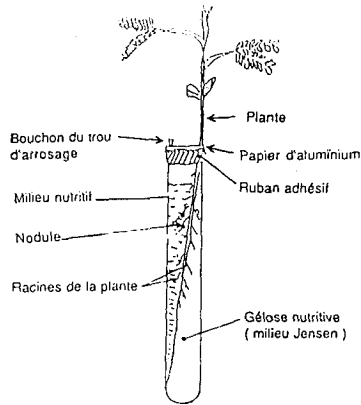


Fig. 1A : Culture en tube (tube de GIBSON)

(1963)

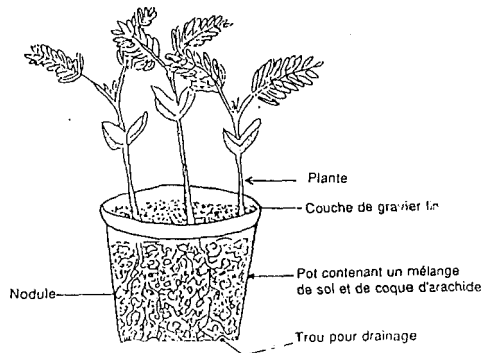


Fig. 1B : Dispositif utilisé pour la culture des plantes en pot

Contrôle du pouvoir de fixation de l'azote

A partir des cultures solides conservées dans des tubes, nous avons préparé des cultures en milieu **YEMA** liquide correspondant à une population bactérienne de 10^9 bact./ml. Ces cultures ont servi d'inoculum. L'inoculation a été faite dans les tubes sur des plants âgés de deux semaines. Dans le cas des cultures en pot, sur sol stérilisé, pauvre en azote, l'inoculum est apporté dans le trou de repiquage en même temps que les plantules.

Pour estimer l'effet de l'inoculation, nous avons à la fin des expériences :

- mesure le poids sec des nodules
- mesure le poids sec des parties aériennes
- fait le dosage d'azote des parties aériennes.

Pour cela, les plantes ont été dépotées à la fin des expériences, les nodules ont été prélevés, lavés et mis à sécher à l'étuve à 65°C pendant 48 h avant d'être pesés.

Les parties aériennes des plantes ont été mises à sécher à l'étuve à 65 C pendant 72h avant d'être pesées. Ensuite elles ont été broyées puis minéralisées après addition de H_2SO_4 concentré. Le dosage d'azote a été effectué selon la méthode de KJELDAHL (JACKSON, 1958).

Nous avons soumis nos résultats à l'analyse statistique à plusieurs variables (DUNCAN, 1955).

RESULTATS

Piégeage de *Rhizobium* à partir de sols du Sénégal

L'expérience qui a porté sur les quatre espèces étudiées a duré trois mois. Les observations sur la nodulation de ces espèces sont consignées dans le tableau 1.

Ce tableau montre que *Prosopis africana* et *Albizia lebbek* sont nodules dans tous les sols utilisés. En plus, la nodulation de ces espèces dans le sol de Djibélor est relativement faible (1,1 à 1,3 nodule/plante) par rapport aux autres sols. Par contre *Prosopis juliflora* et *Leucaena leucocephala* ne sont pas nodulés dans les sols utilisés.

Ces résultats montrent que *P. africana* et *A. lebbek* sont largement nodules dans les sols prélevés du Sud du Sénégal. Leur introduction dans ces sols ne nécessite pas alors une inoculation de *Rhizobium*.

Prosopis juliflora et *leucaena leucocephala* peuvent être considérés comme des plantes spécifiques vis-à-vis de la nodulation. Leur introduction dans les sols du Sud du Sénégal utilisés, nécessite une inoculation par un *Rhizobium* effectif.

Les observations faites sur les nodules issus du piégeage ont montré que la plupart des nodules de *P. africana* sont de petite taille et très peu colorés alors que ceux de *A. lebbek* sont généralement de grande taille (0,5 à 1 cm de diamètre), ramifiées et légèrement teintées.

L'isolement des souches de *Rhizobium* a montré que les deux espèces végétales peuvent être nodulées par des souches à croissance lente et par des souches à croissance rapide. Cependant et en général *P. africana* est nodulé par des souches à croissance lente et *A. lebbek* par des souches à croissance rapide.

Tableau 1 : Nodulation de *P. africana*, *P. juliflora*, *A. kbbeck* et *L. leucocephala* dans différents sols du Sénégal.

Les chiffres dans les parenthèses indiquent le nombre de plantes testés.

ORIGINE DES SOLS										
Plante piège	DIOULOLOU		DJIBELOR		BAYOTTES		DABO		BOTOU	
	Plantes nodulées	Nodules/ plant	Plantes nodulées	Nodules/ plant	Plantes nodulées	Nodules/ plant	Plantes nodulées	Nodules/ plant	Plantes nodulées	Nodule plant
<i>P. africana</i>	8(15)	3,12	10(15)	1,01	14 (15)	221	15 (15)	4	12 (15)	3,4
<i>P. juliflora</i>	0(15)	0	0 (15)	0	0 (15)	0	0	0	0 (15)	0
<i>A. lebbeck</i>	12(15)	1,75	10(15)	1,30	12(15)	3.33	15(15)	4,60	12 (15)	3,38
<i>L. leucocephala</i>	0(15)	0	0 (15)	0	0 (15)	0	0 (15)	0	0 (15)	0

Résultats des tests d'infection

L'expérience a duré quatorze semaines. Les résultats obtenus sur le poids sec des nodules sont représentés sur la fig. 2.

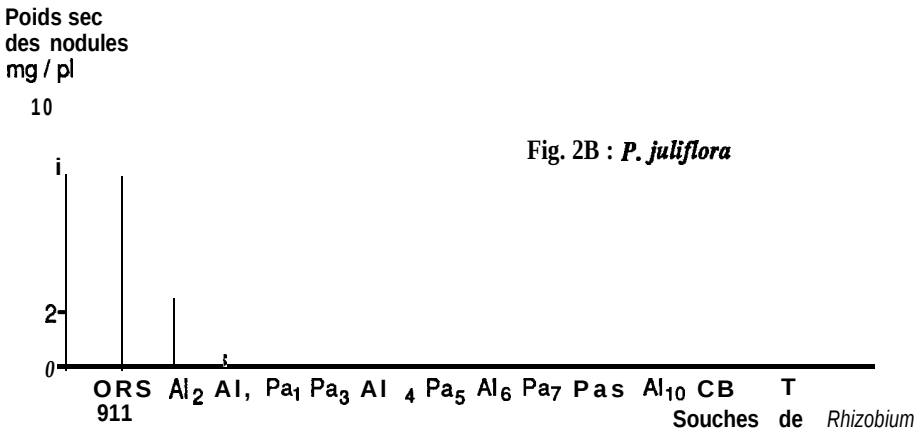
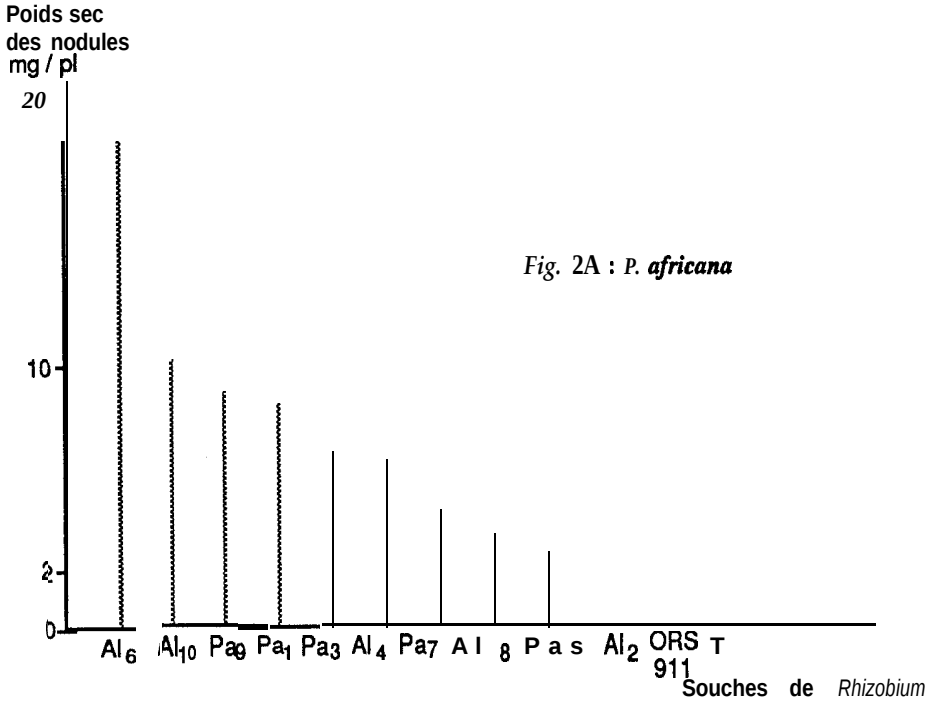


Figure 2 : Nodulation de *P. africana* (2A), *P. juliflora* (2B), *A. kbbek* (2C) et *L. leucocephala* par les souches de rhizobium isolées de sols du Sénégal

Chaque valeur représente la moyenne de 9 répétitions

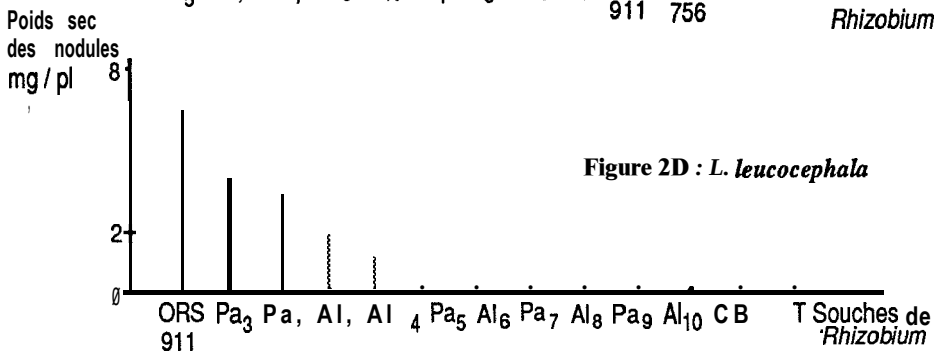
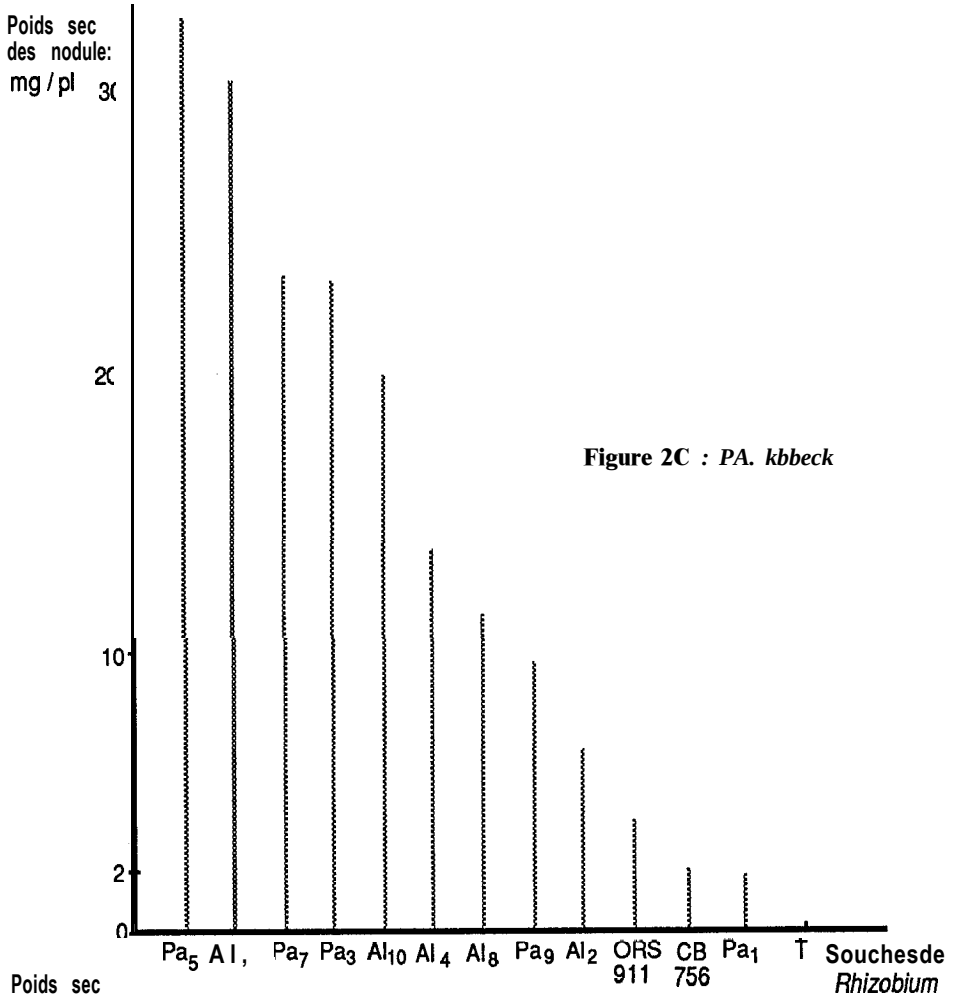


Figure 2 : Nodulation de *P. africana* (2A), *P. juliflora* (2B), *PA. kbbeck* (2C) et *L. leucocephala* (2D) par les souches de rhizobium isolées de sols du Sénégal

Ces résultats montrent toutes les souches isolées nodulent *P. africana* et *A. lebbeck* alors que *P. juliflora* et *L. leucocephala* ne sont pratiquement pas nodules par ces souches.

Ces observations ne sont pas surprenantes, elles confirment les résultats du piégeage qui ont montré que les sols à partir desquels ont été isolées les souches testées, ne renferment pas de *Rhizobium* nodulant *P. juliflora* et *L. leucocephala*. Nous avons remarqué que les deux meilleures souches sur *P. africana* ont été isolées d'*A. lebbeck* et que la meilleure souche sur cette dernière a été isolée de *P. africana*.

La capacité d'une souche de *Rhizobium* à noduler une plante donnée ne dépend donc que de sa plante d'isolement.

Nous pouvons considérer, au vu de ces résultats, que la meilleure souche à la fois sur *P. africana* et *A. lebbeck* est la souche A16.

Les résultats obtenus sur le poids sec des parties aériennes sont représentés sur la fig.3.

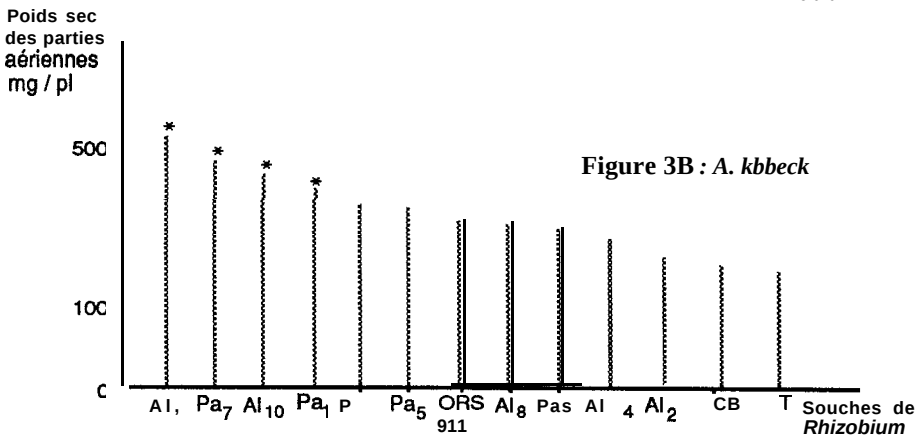
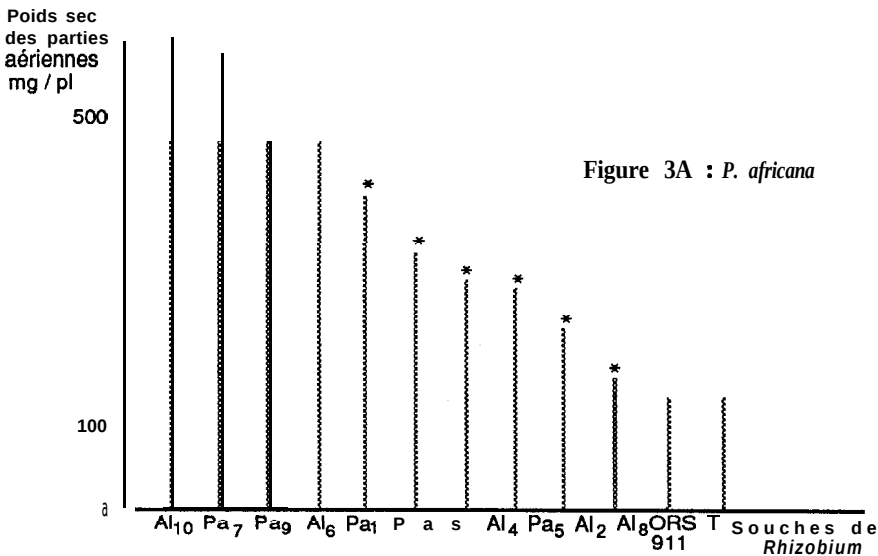


Figure 3 : Poids sec des parties aériennes de *P. africana* (3A) et *A. lebbeck* (3B) inoculés avec différentes souches de rhizobium.

Chaque valeur représente la moyenne de 9 répétitions. Les traitements sommés de * sont significativement différents du témoin au seuil de 5%.

Ces **résultats** montrent que la presque totalité des souches testées augmente significativement le poids sec des parties aériennes de *P. africana*, mais que seules quatre souches augmentent celui des parties aériennes d' *A. lebbeck*. Les deux meilleures souches sont ici Al 10 pour *P. africana* et A16 pour *A. lebbeck*.

Pour *P. juliflora* et *L. leucocephala*, nous n'avons observé aucune différence significative entre les plants inoculés et les témoins. Ce **résultat** peut s'expliquer par le fait que ces plantes n'ont pratiquement pas été **nodulées** par les souches isolées.

Les **résultats** obtenus sur la teneur en azote total des parties **aériennes** sont représentés sur la fig. 4.

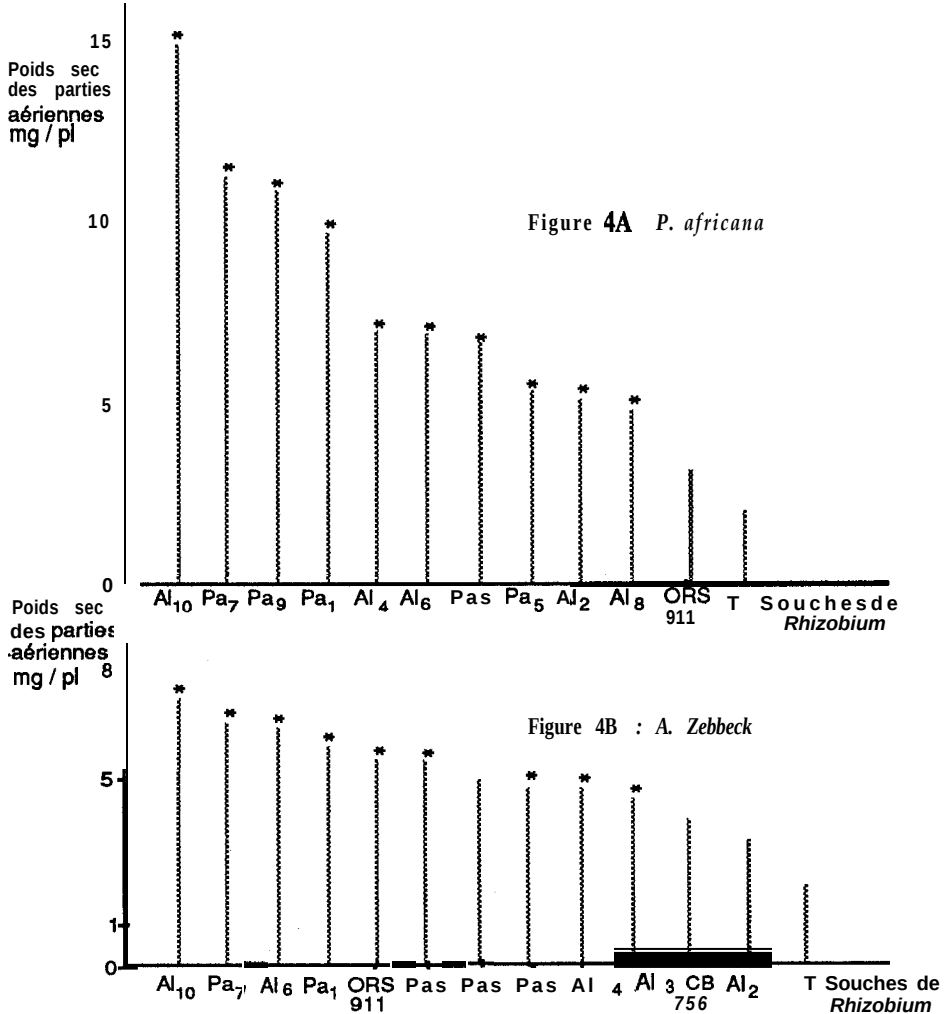


Figure 4 : Teneur en azote total des parties **aériennes** de *P. africana* (4A) et *A. lebbeck* (4B) inoculés avec **différentes** souches de rhizobium

Chaque valeur représente la moyenne de 9 répétitions. Les traitements surmontés de * sont significativement différents du témoin au seuil de 5%

Ces résultats montrent que la teneur moyenne en azote total des parties aériennes a été **améliorée** chez la plupart des plants inoculés de *P. africana* et d'*A. lebbeck*. La souche Al 10 peut être **considérée** ici comme la meilleure. D'une façon globale, les meilleures souches ont été celles qui ont donné les poids secs de parties aériennes les plus élevés. Cette remarque classique montre qu'il y a une **corrélation** positive entre le poids sec des parties aériennes et leur teneur en azote total.

Nous n'avons **observé** aucune différence pour *P. juliflora* entre la teneur en azote total des parties aériennes des plants inoculés et celle des parties aériennes des témoins. Les différences **observées** chez *L. leucocephalu* sont **négligeables**.

Ces **résultats confirment** la non **effectivité** des souches isolées sur ces plantes.

CONCLUSION

Les **résultats** de nos travaux nous ont **montré** que *P. africana* et *A. lebbeck* sont largement **nodulés** dans les sols du Sud du **Sénégal** utilisés. Leur introduction dans ces sols ne demande donc pas l'apport **préalable** de *Rhizobium* spécifique pour assurer leur **nodulation**. Toutefois, le sol de **Djibélor** se dégage comme **étant** intéressant à étudier sur le plan microbiologique pour essayer d'expliquer la faiblesse relative de la nodulation des espèces **végétales** en son sein.

Nous avons par ailleurs remarqué une absence de nodulation de *P. juliflora* et de *L. leucocephala* dans les sols utilisés. Leur introduction dans ces sols nécessite alors une inoculation par un *Rhizobium* effectif.

Les tests de nodulation ne nous permettent pas de dire si les souches isolées sont toutes différentes ou non. Néanmoins nous avons pu dégager un certain nombre de souches qui nous semblent les plus effectives **sur** *P. africana* et *A. lebbeck* parmi lesquelles, Pa7 et Al 10. Ces tests ont **montré** aussi que les souches les plus effectives sur une plante donnée ne sont pas **forcément** celles qui **ont été** isolées de cette plante. C'est ainsi que **sur** *P. africana* la meilleure souche (Al 10) a été isolée d'*A. lebbeck*.

Ce travail nous a aussi **montré** que les sols du Sénégal renferment des souches de *Rhizobium* à croissance rapide et que l'inoculation par des souches effectives peut augmenter le poids sec et la teneur en azote total des parties aériennes de *P. africana* et d'*A. lebbeck* dans les sols **carencés** en azote.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 ALLEN, O. N., and ALLEN, E. K., 1981. The Leguminosae. A source Book of Characteristics, Uses and Nodulation. The University of Wisconsin Press.
- 2 DIEM, H. G. and DOMMERGUES, Y. R., 1984. In vitro production of specialized reproductive Torulose Hyphae by Frankia strain ORS 02 100 1 isolated from *Casuarina Junghuhniana* Plant and Soil (submitted).
- 3 DUNCAN, D. B., 1955. Multiple range and multiple F tests. Biometrics. 11,1-42.
- 4 GIBSON, A. H., 1963. Physical environment in symbiotic nitrogen fixation. The effect of root temperature on **rently** nodulated *Trifolium subterraneum* plants. Aust. J. Biol. Sci 16 : 28-42
- 5 HALLIDAY, J., SOMASEGARAN, P., 1982. Nodulation, Nitrogen Fixation and *Rhizobium* strain afimities in the Genus *Leucaena*. In : leucaena research in the Asian-Pacific Region. Proceedings of a Workshop held in Singapore, 23-26 Nov. 1982. P. 27-32.
- 6 JACKSON, M. L., 1958. Soil Chemical Analysis. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J
- 7 VINCENT, J. M., 1970. A manual for the practical study of root nodules bacteria. 1. B. P. Hand book n°15. Blacwell Sci. Publications Oxford and Edinburgh.



INSTITUT SENEGALAIS DE
RECHERCHES AGRICOLES

CAHIERS D'INFORMATION

**ROLE EPIDEMIOLOGIQUE
DES MOLLUSQUES
DANS LA TRANSMISSION
DES TREMATODOSES
HUMAINES ET ANIMALES
AU SENEGAL**

O.T DIAW

ISSN 0850-8798

VOL 2 N° 3

mai 1988