

## Diversité des souches de rhizobiums et potentialités symbiotiques de *Mimosa caesalpinifolia* Benth, *Hardwickia binata* Roxb. et *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb sur des sols du Sénégal

## Diversity of rhizobia strains and symbiotic potentialities of *Mimosa caesalpinifolia* Benth, *Hardwickia binata* Roxb. et *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb in senegalese soils.

Thiao M<sup>1\*</sup>, Lesueur D<sup>2</sup> et Sylla SN<sup>(1)</sup>

### Résumé :

Dans le but d'évaluer les potentialités en agroforesterie de *Mimosa caesalpinifolia*, *Hardwickia binata* et *Enterolobium cyclocarpum* au Sénégal, nous avons étudié les caractéristiques et le potentiel symbiotiques de ces trois espèces. Une collection de souches de rhizobiums a été constituée à partir d'échantillons de sols prélevés dans différentes localités du Sénégal. Ces souches ont été isolées de nodosités de *M. caesalpinifolia* et *E. cyclocarpum*. Aucune nodosité n'a été obtenue avec *H. binata*. Ces souches ont été caractérisées avec des outils phénotypiques et leur spectre d'hôtes a été étudié. Un groupe d'inoculation croisée auquel peuvent appartenir ces trois espèces a été déterminé. Les résultats ont montré une diversité de souches. Toutes les souches isolées de *M. caesalpinifolia* ont une croissance rapide. Les souches de *E. cyclocarpum* forment deux groupes selon leur vitesse de croissance, un groupe à croissance rapide et un groupe à croissance lente. Les souches dans l'ensemble sont constituées de biotypes tolérants au NaCl avec un large spectre de résistance aux antibiotiques et des biotypes sensibles au NaCl et aux antibiotiques. En termes d'effectivité de leur potentiel symbiotique fixateur d'azote, les souches sont capables de former des nodosités avec leur plante d'isolement et la plupart des souches sont infectives chez *Acacia albida*., *A. seyal* et *Leucaena leucocephala*. *E. cyclocarpum* et *M. caesalpinifolia* sont dans le même groupe d'inoculation croisée que *Pterocarpus erinaceus*, *A. albida*, *A. senegal*, *A. mangium*, *A. nilotica* et *Calliandra calothyrsus*. Les souches M2, 10a et E6 ont un très bon potentiel fixateur d'azote respectivement chez *Mimosa caesalpinifolia* Benth et *Enterolobium cyclocarpum*.

### Mots clés :

Diversité, Potentialités symbiotiques, rhizobium, *Mimosa caesalpinifolia*, *Hardwickia binata*, *Enterolobium cyclocarpum*

### Abstract:

We aimed to evaluate agroforestry potentialities of *Mimosa caesalpinifolia* Benth, *Hardwickia binata* Roxb. and *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb in Senegal, so we studied characteristics and symbiotic potential of these three species. A collection of rhizobia strains was made from soil samples collected from in several areas in Senegal. These strains were isolated from nodules of *M. caesalpinifolia* and *E. cyclocarpum*. No nodule was obtained with *H. binata*. Strains were characterized with phenotypic tools and their hosts' spectrum was studied. A cross inoculation group to which these three species could belong was found. Results showed a diversity of strains. All the strains isolated from *M. caesalpinifolia* have a fast growth. The strains isolated from *E. cyclocarpum* form two groups according to their speed of growth, a group with fast growth and a group with slow growth. Strains showed biotypes that tolerate high level NaCl in medium with a wide spectrum of antibiotics resistance and biotypes that are sensitive to NaCl and antibiotics. In terms of effectiveness of their symbiotic potential for nitrogen fixation, the strains are able to form nodules with their host plant and most of them formed nodules on *Acacia albida*, *A. seyal* and *Leucaena leucocephala*. None of strains is infective on *Hardwickia binata*. *E. cyclocarpum* and *M. caesalpinifolia* are in the same cross inoculation group with *Pterocarpus erinaceus*, *A. albida*, *A. senegal*, *A. mangium*, *A. nilotica* and *Calliandra calothyrsus*. Strains M2, 10a and E6 respectively have a very good potential of nitrogen fixation with *M. caesalpinifolia* Benth and *E. cyclocarpum*.

### Key words:

Diversity, Symbiotic potentialities, rhizobia, *Mimosa caesalpinifolia*, *Hardwickia binata*, *Enterolobium cyclocarpum*.

<sup>1</sup> \*Correspondant : THIAO Mansour, Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/ISRA/UCAD, BP 1386, CP 18524, Centre de Recherche et de Formation à la recherche de Bel-Air, Dakar, SENEGAL. Email : [mansour.thiao@ird.sn](mailto:mansour.thiao@ird.sn) – Tel. : 221.33.849.33.33 - Mobile: 221.77.568.95.77 Fax : 221.33.832.16.75 ou 221.33.849.33.02.

<sup>2</sup> CIRAD, Dept PERSYST, UPR 80 "Ecosystems of Plantations", Tropical Soil Biology and Fertility Institute of CIAT, World Agroforestry Centre, PO Box 30677, Nairobi, KENYA.

## 1. Introduction

En zone tropicale aride et semi-aride, l'une des contraintes majeures de la production végétale est la dégradation des sols. Plusieurs solutions techniques ont été proposées pour améliorer la fertilité des sols, mais toutes n'ont pas donné les résultats escomptés.

L'utilisation d'engrais minéraux a connu de réels succès dans les pays du Nord (révolution verte) mais n'a pas profité aux pays du Sud à cause du coût onéreux. La voie d'intensification biologique jugée très réaliste et durable est celle qui est basée sur l'agroforesterie. Elle consiste en la protection et au maintien des arbres à ombrages légers produisant du fourrage et fixateurs d'azote. Les arbres fixateurs d'azote (AFN) possèdent la propriété de fixer l'azote de l'air ; ce qui leur permet de satisfaire leur propre exigence en azote mais aussi de fertiliser le sol. En zone tropicale, les agriculteurs conscients des rôles joués par l'arbre, ont pu entretenir des peuplements de certaines espèces dans les champs (parc à *Faidherbia albida* dans le bassin arachidier au Sénégal). En Amérique latine (Brésil, Honduras) l'utilisation d'AFN dans les programmes de revégétalisation des terres dégradées a connu des succès très probants (Franco *et al.*, [1] ; Dommergues *et al.*, [2]).

Les travaux menés dans cette étude s'intéressent aux possibilités et aux promesses offertes par les AFN pour assurer la revégétalisation et l'amélioration durable de la productivité des sols. Les modèles utilisés sont des associations symbiotiques chez *Mimosa caesalpinifolia* Benth, *Hardwickia binata* Roxb. et *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb pour la réhabilitation des terres dégradées.

*M. caesalpinifolia* est une espèce très prisée pour son fourrage qui sert à alimenter le bétail pendant la longue saison sèche des régions semi-arides. Son bois est lourd, compact avec un beau poli et sert comme

bois d'œuvre et de combustible. Il en est de même pour *E. cyclocarpum* et *H. binata* qui servent de fourrage avec un bois de qualité et qui sont très souvent utilisées dans les programmes de reforestation et de restauration de terres dégradées (Standey et Steyermark [3] ; Dommergues *et al.*, [2]). Toutes ces propriétés de ces trois espèces ainsi que leur potentiel à fertiliser les sols sont améliorés lorsque qu'elles sont associées à des souches de rhizobium compatibles et efficaces dans la fixation biologique de l'azote. Il est par conséquent opportun de connaître la diversité des souches de rhizobium qui leur sont compatibles sur des sols du Sénégal afin de trouver les meilleures combinaisons plantes-rhizobiums dans différentes conditions écologiques.

Les avantages économiques et écologiques que présentent ces trois espèces de légumineuses ligneuses, exotiques à croissance rapide et fixatrices d'azote pourraient susciter leur introduction au Sénégal, à l'image d'autres espèces exotiques telles *A. albida* Del., *L. leucocephala* (Lam.), *Casuarina equisetifolia* et les acacias australiens. Cependant malgré les avantages que l'on peut attendre des trois espèces (*M. caesalpinifolia*, *H. binata* et *E. cyclocarpum*) dans le paysage agrosylvopastorale, leurs propriétés symbiotiques sur des sols du Sénégal ne sont pas connues. C'est pourquoi, nous avons axé notre étude sur la mise en évidence des potentialités symbiotiques de ces trois AFN au Sénégal.

## 2. Matériel et méthodes

Les méthodes utilisées sont basées sur des caractérisations phénotypiques et physiologiques.

### Provenance des graines et des sols

Les graines de *E. cyclocarpum* utilisées dans ce travail sont issues du lot n°89/03777N de la collection du CIRAD-Forêt (Centre de coopération internationale

en recherche agronomique pour le développement). Les graines de *M. caesalpinifolia* sont issues de la collection de l'Embrapa (Rio de Janeiro, Brésil). Les graines de *H. binata* (lot n°97/6259/R) ont été récoltées à Bandia par le Centre National de Recherche Forestière.

Les sols utilisés (Tableau I) ont été collectés de divers sites au Sénégal (Bambey, Bel Air, CDH, Kébémér, Sangalkam, Yoff, Dahra, Matam, Goumel Niandane, Sedhiou, Dagana, Massaria, Diarra, Kanialo, Kassanki, Wala et Sarre Diame) et en Côte d'Ivoire (Oumé et Korhogo). Ce sont des sols sableux pour la plupart et pauvres en éléments minéraux et en matière organique.

**Tableau I :** Sites de collecte des sols et pays d'origine

N° de sols	Sites de collecte de sols	Pays d'origine
1	Bambey	Sénégal
2	Bel Air	Sénégal
3	CDH	Sénégal
4	Kébémér	Sénégal
5	Sangalkam	Sénégal
6	Yoff	Sénégal
7	Dahra	Sénégal
8	Matam dans un verger <i>A. melifera</i>	Sénégal
9	Goumel Niandane	Sénégal
10	Sedhiou 2 sous <i>A auriculiformis</i>	Sénégal
11	Sedhiou I sous <i>A auriculiformis</i>	Sénégal
12	Dagana, exploitation avec une haie <i>A. melifera</i> I	Sénégal
13	Massaria	Sénégal
14	Diarra dans un I champ de Sorgho	Sénégal
15	Diatock parcelle de Kanialo	Sénégal
16	Kassanki	Sénégal
17	Dagana Canal B1 sous <i>A. melifera</i> I	Sénégal
18	Cascas Forêt de Wala I Goniakier non élagués	Sénégal
19	JPK culture de témoins Sorgho	Sénégal
20	Sarre Diame J témoin	Sénégal
21	OFI 11 Oumé	Côte d'Ivoire
22	Oumé DI	Côte d'Ivoire
23	KA 1 Oumé	Côte d'Ivoire
24	FI Oumé	Côte d'Ivoire
25	E II Oumé	Côte d'Ivoire
26	JPK 3 Korhogo	Côte d'Ivoire
27	KG 2 Korhogo	Côte d'Ivoire
28	KE 1 Korhogo	Côte d'Ivoire
29	D III Korhogo	Côte d'Ivoire

### Prétraitement des graines

Les graines de *E. cyclocarpum* et de *M. caesalpinifolia* ont été scarifiées par trempage dans l'acide chlorhydrique concentré respectivement pendant 90 min et 30 min. Les graines de *H. binata* n'ont pas été traitées à l'acide. La surface des graines a été aseptisée avec du chlorure de mercure ( $HgCl_2$ ) à 1‰ pendant 5 min. Elles ont ensuite été rincées avec de l'eau distillée stérile et trempées pendant 24 h. Les graines gonflées ont ensuite été mises à germer sur milieu gélosé (8‰) contenu en boîte de Petri.

### Piégeage en tubes des rhizobiums

Dans le but de disposer d'une collection de souches natives de sols du Sénégal et compatibles avec les trois espèces étudiées, nous avons fait un piégeage de rhizobiums. Dans le premier type de piégeage, la technique de Gibson [4] a été utilisée. Les graines prégermées ont été mises en tubes de 22 x 220 mm contenant 30 ml de gélose nutritive Jensen inclinée (Vincent [5]) et remplis d'eau distillée stérile (EDS). Les jeunes plantes ont chacune été inoculées avec 1 ml d'une solution de sol (10g dans 90 ml de EDS) pour un total de 29 types de sols. Huit répétitions ont été faites par sol. Les plantes ont été maintenues en chambre de culture à 28°C sous un rayonnement photosynthétique actif de  $120\mu mol.m^{-2}.s^{-2}$  avec une photopériode de 16h d'éclairage par jour pendant un mois.

### Piégeage en gaines en serre

Dans le but de piéger un plus grand nombre de rhizobiums et rencontrant des difficultés à cultiver *E. cyclocarpum* en tubes, nous avons fait un deuxième piégeage en serre. Les graines prétraitées ont été semées directement dans les sols en gaines à raison de huit répétitions par sol. Les jeunes plantes ont été arrosées régulièrement pendant 3 mois.

### Récolte des nodosités et isolement de souches

Au bout d'un mois de culture, les plantes en tubes ont été sorties et les nodosités formées ont été récoltées municieusement. Leur surface a ensuite été aseptisée avec du HgCl<sub>2</sub> puis rincée avec de l'EDS. Les nodosités des plantes en serre ont été récoltées après 3 mois de culture. Les gaines ont été fendues et les racines lavées sous un filet d'eau de robinet. Les nodosités ont ensuite été aseptisées en surface selon le même protocole que précédemment.

L'isolement des souches de rhizobium a été fait en écrasant chaque nodosité aseptisée en surface dans une goutte d'EDS à l'aide d'une tige de verre stérilisée au préalable. Une quantité du broyat de chaque nodosité a ensuite été étalée sur milieu de culture YMA en boîte de Petri. Les boîtes ont été incubées à 28°C. Les colonies bactériennes apparues ont été purifiées par repiquages successifs sur nouveau milieu YMA solide. Plusieurs séries de repiquages ont été réalisées.

### Spectre d'hôtes et groupe d'inoculation croisée

Les souches bactériennes isolées ont d'abord été testées pour leur aptitude à former à nouveau des nodosités sur leurs plantes d'isolement. Un volume de 1 ml de culture bactérienne liquide en phase exponentielle de croissance a été inoculé à des plantes cultivées en tubes (Gibson [4]). Le groupe d'inoculation croisée a été étudié en testant sur différentes légumineuses ligneuses *E. cyclocarpum*, *M. caesalpinifolia*, *H. binata*, *A. albida*, *A. senegal*, *A. seyal* et *Leucaena leucocephala*. Le même principe d'inoculation a été utilisé et les souches sur le tableau II ont été utilisées.

**Tableau II** : Souches de rhizobium utilisées et plantes d'isolement

Souches de rhizobium	Plantes d'isolement
ORS 167	<i>Acacia albida</i>
ORS 188	<i>A. albida</i>
ORS 66	<i>A. albida</i>
ORS 202	<i>Pterocarpus erinaceus</i>
ORS 227	<i>P. erinaceus</i>
ORS 1760	<i>Acacia senegal</i>
Br 2624	<i>M. caesalpinifolia</i>
Br 2625	<i>M. caesalpinifolia</i>
11c	<i>Acacia mangium</i>
13c	<i>A. mangium</i>
TAL 2452	<i>Acacia nilotica</i>
TAL 1806	<i>Gliricidia sepium</i>
CCK13II	<i>Calliandra calothyrsus</i>
AHB	<i>Acacia holosericea</i>
M1	<i>M. caesalpinifolia</i>
M2	<i>M. caesalpinifolia</i>
M3	<i>M. caesalpinifolia</i>
M4	<i>M. caesalpinifolia</i>
M5	<i>M. caesalpinifolia</i>
M6	<i>M. caesalpinifolia</i>
10a	<i>M. caesalpinifolia</i>
10b	<i>M. caesalpinifolia</i>
Am	<i>M. caesalpinifolia</i>
E1	<i>E. cyclocarpum</i>
E2	<i>E. cyclocarpum</i>
E3	<i>E. cyclocarpum</i>
E4	<i>E. cyclocarpum</i>
E5	<i>E. cyclocarpum</i>
E6	<i>E. cyclocarpum</i>

### - Résistance aux antibiotiques

La méthode de diffusion en milieu solide a été utilisée. Des disques des antibiotiques suivants Gentamicine (500 µg), Kanamycine (1000 µg), Acide nalidixique (30 UI), Néomycine (30 UI), Streptomycine (500 µg) et Tétramycine (30 UI) ont été utilisés. Un volume de 100 µl de culture liquide de chaque souche a été étalé sur milieu YMA coulé en boîte de Petri. Les disques d'antibiotiques ont ensuite été placés au centre sur les cultures qui ont ensuite été incubées à 28°C. Le diamètre du halo correspondant à la zone d'inhibition a été mesuré avec une règle graduée. Les données obtenues ont été rapportées à l'échelle d'interprétation fournie par le fabricant des antibiotiques. Les souches résistantes ont été notées R, les souches sensibles S et les souches intermédiaires I.

Des cultures sans antibiotiques ont été utilisées comme témoins.

#### **- Tolérance au chlorure de sodium et au nitrate de potassium**

Le niveau de tolérance au chlorure de sodium des souches bactériennes a été testé sur milieu YMA auquel ont été ajoutées des concentrations croissantes de NaCl (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 8% et 10%). Le repiquage des souches bactériennes a été fait par la technique d'épuisement d'une colonie bactérienne pure sur la surface de la gélose. Les cultures ont ensuite été incubées à 28°C. Des cultures sans NaCl ont été utilisées comme témoins. Les données obtenues ont été notées +++ pour les souches très tolérantes, ++ pour les souches moyennement tolérantes, + pour les souches peu tolérantes et – pour les souches pas tolérantes. La capacité des souches bactériennes à réduire le nitrate a été étudiée en milieu YMA additionné de concentrations croissantes de KNO<sub>3</sub> (2%, 4%, 8% et 10%). Le protocole utilisé est le même que celui décrit précédemment.

#### **- Croissance sur milieu additionné de Bleu de Bromothymol**

L'aptitude des souches à acidifier le milieu lorsqu'elles ont une croissance rapide ou à l'alcaliniser lorsqu'elles ont une croissance lente a été testée. Le milieu de culture YMA utilisé a été additionné de Bleu de Bromothymol à 5%. La lecture du test a été faite en utilisant les propriétés d'indicateur coloré du Bleu de Bromothymol qui, vert à pH neutre, vire au jaune lorsque le milieu est acide et au bleu lorsque le milieu est alcalin.

#### **- Estimation de la fixation biologique d'azote et mesure des biomasses**

Les plantes inoculées et cultivées pendant 3 mois ont été testées pour leur capacité à fixer l'azote atmosphérique. La méthode de mesure de l'activité réductrice de l'acétylène (ARA) a été utilisée (Roskoski [6]). Les parties aériennes des plantes ont été sectionnées, les racines hermétiquement

fermées dans des tubes à bouchon à jupe en caoutchouc. L'acétylène a été injecté à l'aide d'une seringue dans les tubes à raison de 5 ml/tube (10% du volume). Après 30 min d'incubation à température ambiante, la quantité d'éthylène formé a été évaluée par chromatographie en phase gazeuse sur une prise de 0,5 ml du mélange gazeux des tubes. Les données ont été analysées par le test de Fisher et la fixation biologique de l'azote a été notée très efficace, efficace ou non efficace après analyse. Les mesures de biomasses ont été effectuées sur les plantes ayant servi à estimer la fixation biologique de l'azote. Les parties aériennes des plantes et les racines ont été séchées à l'étuve et pesées. Les valeurs obtenues ont été analysées par ANOVA et test de Fisher.

### **3. Résultats**

#### **Piégeage, isolement et types de croissance des rhizobiums**

Les résultats des piégeages de rhizobiums sur les différents sols utilisés sont présentés dans le tableau III. Les signes positifs (+) signifient la présence de nodosités et les signes négatifs (–) signifient l'absence de nodosités. *M. caesalpinifolia* a formé des nodosités sur les sols de Bel Air, Sangalkam, Dagana, KA Oumé et DIII Korhogo. Des nodosités ont été récoltées aussi bien sur les plants cultivés en tubes que sur les plants cultivés en gaines sur un support sol. Les plantes de *E. cyclocarpum* ont formé des nodosités sur leurs racines lorsqu'elles ont été cultivées sur les sols de Bambey, Bel Air, CDH, Kébémér, Sangalkam et Yoff et ce sont seulement les plants cultivés en gaines qui ont formé des nodosités. Aucun des plants inoculés avec les solutions de sols cultivés en tubes n'a formé de nodosités. Les plants de *H. binata* n'ont formé de nodosités sur aucun sol aussi bien en tubes qu'en gaines en serre. L'isolement des rhizobiums à partir de ces nodosités a permis de collecter une quinzaine de souches de rhizobium (voir tableau IV). Au total, 9 souches ont été isolées de *M. caesalpinifolia* et 6 souches de *E. cyclocarpum*. Des rhizobiums n'ont

pas été isolés des nodosités récoltées dans les sols de KA1 Oumé et DIII Korhogo. Le test de réinfection sur les plantes d'isolement a montré que toutes les souches réinfectent leur plante d'isolement.

**Tableau III :** Résultats des piégeages de rhizobiums

N°	Noms de sols	<i>M. caesalpinifolia</i>	<i>E. cyclocarpum</i>	<i>H. binata</i>
1	Bambey	–	+	–
2	Bel Air	+	+	–
3	CDH	–	+	–
4	Kébémér	–	+	–
5	Sangalkam	+	+	–
6	Yoff	–	+	–
7	Dahra	–	–	–
8	Matam dans un verger <i>A. melifera</i>	–	–	–
9	Goumel Niandane	–	–	–
10	Sedhiou 2 sous <i>A. auriculiformis</i>	–	–	–
11	Sedhiou I sous <i>A. auriculiformis</i>	–	–	–
12	Dagana, haie <i>A. melifera</i> I	–	–	–
13	Massaria	–	–	–
14	Diarra dans un I champ de Sorgho	–	–	–
15	Diatock parcelle de Kanialo	–	–	–
16	Kassanki	–	–	–
17	Dagana Canal B1 sous <i>A. melifera</i> I	+	–	–
18	Cascas Forêt de Wala I Goniakier non élagués	–	–	–
19	JPK culture de témoins Sorgho	–	–	–
20	Sarre Diame J témoin	–	–	–
21	OFI 11 Oumé	–	–	–
22	Oumé DI	–	–	–
23	KA 1 Oumé	+	–	–
24	FI Oumé	–	–	–
25	E II Oumé	–	–	–
26	JPK 3 Korhogo	–	–	–
27	KG 2 Korhogo	–	–	–
28	KE 1 Korhogo	–	–	–
29	D III Korhogo	+	–	–

+ : présence de nodosités ; – : absence de nodosités

**Tableau IV :** Listes des souches isolées, plantes d'isolement et provenance de sols

Noms des souches	Plantes d'isolement	Provenances de sols
10a	<i>M. caesalpinifolia</i>	Dagana
10b	<i>M. caesalpinifolia</i>	Dagana
Am	<i>M. caesalpinifolia</i>	Bel Air
M1	<i>M. caesalpinifolia</i>	Sangalkam
M2	<i>M. caesalpinifolia</i>	Sangalkam
M3	<i>M. caesalpinifolia</i>	Sangalkam
M4	<i>M. caesalpinifolia</i>	Sangalkam
M5	<i>M. caesalpinifolia</i>	Sangalkam
M6	<i>M. caesalpinifolia</i>	Sangalkam
E1	<i>E. cyclocarpum</i>	Bambey
E2	<i>E. cyclocarpum</i>	Bel Air
E3	<i>E. cyclocarpum</i>	CDH
E4	<i>E. cyclocarpum</i>	Kébémér
E5	<i>E. cyclocarpum</i>	Sangalkam
E6	<i>E. cyclocarpum</i>	Yoff

Vitesse de croissance, tolérance aux sels (NaCl et KNO<sub>3</sub>) et résistance aux antibiotiques

Les résultats des tests phénotypiques sont présentés dans le tableau V. Les tests de croissance sur milieu YMA additionné de Bleu de Bromothymol révèlent que les boîtes où sont cultivées les souches bactériennes isolées de *M. caesalpinifolia* montrent une couleur jaune. Ces souches acidifient le milieu et sont à croissance rapide. En revanche, sur les boîtes où sont cultivées les souches isolées de *E. cyclocarpum*, certaines ont viré au jaune ; donc les souches correspondantes (E1, E3, E5 et E6) sont à croissance rapide et d'autres ont viré au bleu et les souches (E2 et E4) sont à croissance lente. En culture sur milieu YMA, les souches E2 et E4 poussent après 4 jours d'incubation. Les tests de tolérance montrent que les souches M1, M3, M4, M5, M6, 10b et Am tolèrent très peu ou pas la présence de NaCl dans le milieu de culture. Il en est de même pour la souche E3. Les souches E1, E2, E4, M2 et 10a tolèrent des concentrations de NaCl jusqu'à 4% dans le milieu. Les souches E5 et E6 tolèrent le mieux et résistent jusqu'à 8% de NaCl dans le milieu. Les souches E5, E6, M1, M2, M3 et Am tolèrent jusqu'à 10% de KNO<sub>3</sub> dans le milieu. Les souches E1, E2, E4, M5 et 10b tolèrent jusqu'à 4% de KNO<sub>3</sub>. Les souches E3, M4, M6, et 10a tolèrent jusqu'à 8% de KNO<sub>3</sub>.

**Tableau V :** Tolérance au NaCl, au KNO<sub>3</sub>, résistance aux antibiotiques et croissance en présence de Bleu de Bromothymol

Tests	E1	E2	E3	E4	E5	E6	M1	M2	M3	M4	M5	M6	10a	10b	Am	
YMA avec B de B	Acid	Alcal	Acid	Alcal	Acid											
NaCl 1%	+++	+++	+++	++	++	++	+	++	++	+	++	++	++	-	++	
NaCl 2%	+++	+++	-	+++	+++	+++	+	++	-	+	+	+	+++	-	-	
NaCl 3%	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	++	-	-	-	-	++	-	-	
NaCl 4%	++	++	-	+++	++	++	-	++	-	-	-	-	+	-	-	
NaCl 5%	-	-	-	-	++	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	
NaCl 8%	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
NaCl 10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
KNO <sub>3</sub> 2%	+++	++	++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	++	+	
KNO <sub>3</sub> 4%	++	+	+	+	++	+++	+	++	+	+	+	+	+	+	+	
KNO <sub>3</sub> 8%	-	-	+	-	+	+	+	++	+	+	-	+	+	-	+	
KNO <sub>3</sub> 10%	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	
Gentamycine	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S
Kanamycine	S	I	S	I	I	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	S
Néomycine	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Acide nalidixique	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
Streptomycine	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	R
Tétramycine	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R

Tableau VI : Spectre d'hôtes et groupe d'inoculation croisée

Souches	Plantes d'isolement	Plantes testées						
		<b>A. albida</b>	<b>A. seyal</b>	<b>A. senegal</b>	<i>L. leucocephala</i>	<b>H. binata</b>	<b>M.caesalpinifolia</b>	<b>E. cyclocarpum</b>
ORS 167	<b>A. albida</b>							
ORS 188	<i>A. albida</i>	+	nt	nt	nt	-	+	+
ORS 66	<i>A. albida</i>	+	nt	nt	nt	-	+	+
ORS 202	<i>P. erinaceus</i>	nt	nt	nt	nt	-	+	+
ORS 227	<i>P. erinaceus</i>	nt	nt	nt	nt	-	+	+
CCK13II	<i>C. calothyrsus</i>	nt	nt	nt	nt	-	+	+
TAL 1806	<b>G. sepium</b>	nt	nt	nt	nt	-	-	+
ORS 1760	<b>A. senegal</b>	nt	nt	+	nt	-	+	+
Br 2624	<i>M. caesalpinifolia</i>	nt	nt	-	nt	-	+	+
Br 2625	<i>M. caesalpinifolia</i>	nt	nt	-	nt	-	+	+
11c	<i>A. mangium</i>	nt	nt	nt	nt	-	+	+
13c	<i>A. mangium</i>	nt	nt	nt	nt	-	+	+
TAL 2452	<b>A. nilotica</b>	nt	nt	nt	nt	-	+	+
AHB	<i>A. holosericea</i>	nt	nt	nt	nt	-	-	+
M1	<i>M. caesalpinifolia</i>	+	+	-	+	-	+	+
M2	<i>M. caesalpinifolia</i>	+	+	-	+	-	+	+
M3	<i>M. caesalpinifolia</i>	+	+	-	+	-	+	+
M4	<i>M. caesalpinifolia</i>	+	+	-	+	-	+	+
M5	<i>M. caesalpinifolia</i>	+	+	-	+	-	+	+
M6	<i>M. caesalpinifolia</i>	+	+	-	+	-	+	+
10a	<i>M. caesalpinifolia</i>	+	+	-	+	-	+	+
10b	<i>M. caesalpinifolia</i>	-	+	-	+	-	+	+
Am	<i>M. caesalpinifolia</i>	+	+	+	+	-	+	+
E1	<i>E. cyclocarpum</i>	+	+	+	+	-	+	+
E2	<i>E. cyclocarpum</i>	+	+	-	-	-	+	+
E3	<i>E. cyclocarpum</i>	+	+	-	+	-	+	+
E4	<i>E. cyclocarpum</i>	+	+	-	-	-	+	+
E5	<i>E. cyclocarpum</i>	+	+	-	+	-	+	+
E6	<i>E. cyclocarpum</i>	+	+	-	+	-	+	+

+ : présence de nodosités ; - : absence de nodosités ; nt : non testé

Toutes les souches sont résistantes à la Néomycine. Toutes les souches sont résistantes à la Gentamycine à l'exception de la souche Am (sensible). La Kanamycine est l'antibiotique le moins toléré dans l'ensemble. Seules les souches M2, M6 et 10a sont résistantes. Les souches E2, E4 et E5 ont une résistance intermédiaire et, toutes les autres souches sont sensibles.

Toutes les souches sont résistantes à l'acide nalidixique sauf 10b, à la streptomycine sauf E4 et 10b et à la Tétramycine sauf les souches M4, M5 et 10b. La souche 10b est la plus sensible aux antibiotiques.

### Spectre d'hôte et groupe d'inoculation croisée

Les résultats du spectre d'hôtes et du groupe d'inoculation croisée sont présentés dans le tableau VI. Les nodosités sont apparues entre le 12<sup>e</sup> et le 25<sup>e</sup> jour. Les résultats montrent qu'à l'exception de 10b, toutes les souches de *M. caesalpinifolia* et de *E. cyclocarpum* forment des nodosités avec *A. albida* et *A. seyal*. Toutes les souches de notre collection, à l'exception de E2 et E4 forment des nodosités avec *L. leucocephala*. Aucune des souches testées ne forment des nodosités avec *H. binata*. Parmi les souches de notre collection, seules Am et E1 forment des nodosités avec *A. senegal*. Toutes les souches testées forment des nodosités avec *M. caesalpinifolia* et *E. cyclocarpum* à l'exception de TAL 1806 avec *G. sepium*. Les souches isolées des acacias testés, de *P. erinaceus* et de *C. calothyrsus* sont capables de former des nodosités avec *M. caesalpinifolia* et *E. cyclocarpum*.

### Estimation du potentiel fixateur d'azote

Les résultats des mesures de biomasse et d'activité réductrice de l'acétylène (ARA) sont consignés sur les tableaux VII et VIII. Sur les plants de *E. cyclocarpum*, la souche E2 a induit une augmentation significative du poids des parties aériennes. Les effets induits par les autres souches ne sont pas significatifs. La souche E6 a induit une augmentation significative du poids des

racines séchées. Les autres souches n'ont pas eu d'effets significatifs. L'activité réductrice de l'acétylène est très peu efficace avec les souches E1, E3, E4 et E5. Elle est moyennement efficace avec la souche E6 et efficace avec la souche E2.

Sur les plants de *M. caesalpinifolia*, des augmentations significatives de biomasse sont notées sur les plantes inoculées avec les souches M2, M3, M4, M6, 10b et Am. L'effet de l'inoculation est très significatif avec la souche M5 qui induit la production de plus de biomasse. Au niveau des racines, l'effet n'a été significatif qu'avec la souche M2. L'activité réductrice de l'acétylène est très peu efficace avec les souches M3 et M5 et est très efficace avec la souche 10a.

Sur les tableaux VII et VIII, les moyennes suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes selon le test de Fisher.

**Tableau VII :** Estimation du potentiel fixateur des souches de *E. cyclocarpum* par mesure de biomasse et activité réductrice de l'acétylène (ARA)

Souches	Parties aériennes	Racines	ARA (nmol/h/plante)
E1	3,04ab	2,07ab	e
E2	4,15b	2,33ab	E
E3	3,16ab	2,48ab	e
E4	2,93a	2,46ab	e
E5	3,30ab	2,50ab	e
E6	3,68ab	2,92b	e à E
Témoin	3,33ab	2,00a	i

*E* : très efficace, *e* : efficace, *i* : inefficace,

**Tableau VIII :** Estimation du potentiel fixateur des souches de *M. caesalpinifolia* par mesure de biomasse et activité réductrice de l'acétylène (ARA)

Souches	Parties aériennes	Racines	ARA (nmol/h/plante)
M1	0,81ab	0,62a	i
M2	1,50cd	1,32b	E
M3	1,25bcd	0,78ab	e
M4	1,25bcd	0,60a	i
M5	1,56d	0,80ab	e
M6	1,03bcd	0,70a	i
10a	0,95abcd	0,60a	HE
10b	1,17bcd	0,80ab	i
Am	1,15bcd	0,80ab	i
Témoin	0,38a	0,51a	i

*E* : très efficace, *e* : efficace, *i* : inefficace, *HE* : très efficace

#### 4. Discussion

L'obtention de nodosités par piégeages avec des plantes cultivées en tubes Gibson et des plantes cultivées en gaines varie en fonction de la plante utilisée pour le piégeage et du type de sol. Dans le cas de *M. caesalpinifolia*, les plantes forment des nodosités aussi bien en tubes qu'en gaines mais le nombre de nodosités formées est plus élevé en serre sur gaines qu'en chambre de culture en tubes. Les plants de *E. cyclocarpum* ne forment pas de nodosités en tubes mais, en forment lorsqu'ils sont cultivés en gaines pour un même sol. Ces plants semblent ne pas tolérer l'immersion de leurs racines directement dans l'eau. Les plants de *H. binata* n'ont formé de nodosités dans aucune des conditions de culture. *H. binata* serait d'après nos résultats une légumineuse qui ne forme pas de nodosités ; et pourtant Brewbaker *et al.*, [7] ont rapporté la présence de nodosités sur leurs racines. Parmi les sols que nous avons utilisés, celui de Sangalkam contient la population de rhizobiums la plus diversifiée et possède les rhizobiums les plus aptes à former des nodosités avec *E. cyclocarpum* et *M. caesalpinifolia*. Les sols des Dahra, Matam, Goumel, Sedhiou, Massaria, Diarra, Kanialo, Kassanki, Wala, Sarré Diamé et les sols en provenance de Côte d'Ivoire semblent ne pas contenir de rhizobiums capables de former des nodosités avec *E. cyclocarpum* et *M. caesalpinifolia* en tubes. Cette absence pourrait être liée à une incompatibilité entre souches et plante ou à des facteurs écologiques car sur le sol de Dahra par exemple, Sylla *et al.*, [8] ont rapporté une fréquente présence de nodosités au champ sur *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens*. Ce sol contient donc des rhizobiums. Les résultats du spectre d'hôte et du test d'inoculation croisée ont montré en culture *in vitro* que *P. erinaceus*, *A. albida*, *A. senegal*, *A. mangium*, *A. nilotica* et *C. calothyrsus* forment un même groupe d'inoculation croisée avec *E. cyclocarpum* et *M. caesalpinifolia*.

Les différents piégeages ont permis d'isoler une quinzaine de souches dont les tests effectués ont montré des biotypes différents. Le test au bleu de bromothymol avec YMA a montré que toutes les souches isolées de *M. caesalpinifolia* ont une croissance rapide car acidifient le milieu et appartiendraient donc au groupe II de Dreyfus et Dommergues [9]. Ces résultats concordent avec ceux de Campelo [10] qui a rapporté la formation de nodosités avec des souches à croissance rapide mais, ne confirment pas ceux de Döbereiner [11] selon lesquels *M. caesalpinifolia* ne forme de nodosités qu'avec des souches à croissance lente. Les souches isolées de *E. cyclocarpum* montrent, en fonction de leur vitesse de croissance, plus de diversité car certaines (E1, E3, E5 et E6) sont à croissance rapide et d'autres à croissance lente (E2 et E4). Ces différences de vitesse de croissance sont confirmées par les observations faites au cours des séries de cultures. Certaines souches présentent de haut niveau de tolérance aux sels (NaCl et KNO<sub>3</sub>) ; c'est le cas des souches E3, E5, E6, M1, M2, M3, M4, M5 et 10b qui tolèrent plus de 8% de KNO<sub>3</sub> et des souches E5 et E6 qui tolèrent jusqu'à 8% de NaCl dans le milieu. Dans l'ensemble, les souches isolées de *E. cyclocarpum* tolèrent le mieux la présence de sel. Les souches tolérantes aux sels présentent une plus forte résistance aux antibiotiques. Parmi celles-ci, il y a la souche E2 qui, de plus, a induit une augmentation significative de biomasse. Cette souche pourrait être recommandée comme inoculum de *E. cyclocarpum* sur des sols du Sénégal. Sur les plants de *M. caesalpinifolia*, l'inoculation a permis des augmentations significatives de biomasse et les souches M2 et 10a sont les plus efficaces. Elles peuvent être utilisées pour inoculer des plants de *M. caesalpinifolia* sur des sols du Sénégal.

Au vu de l'ensemble de ces résultats des tentatives d'introduction de *E. cyclocarpum* et *M. caesalpinifolia* pourraient être

entreprises dans la mesure où ils existent sur les sols du Sénégal, des rhizobiums capables de former des nodosités avec ces espèces et qui sont effectives dans leur fixation d'azote.

**Remerciements :**

Nous remercions Jean Bakhoun pour son assistance technique.

**6. Bibliographie**

- [1] Franco A.A. and de Faria S.M. The contribution of N<sub>2</sub> fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biology and Biochemistry*, 1997, **29** (5/6) : 897-903.
- [2] Dommergues Y., Duhou E. et Diem H.G. Les arbres fixateurs d'azote. 1998. 188-194 et 294-327.
- [3] Standey P.C. And Steyermark J.A. Flora of Guatemala. Field lana : Botany. Vol. 24 N°5 Nat. Hist. Museum, Chicago 1946.
- [4] Gibson A.H. Physical environment and symbiotic nitrogen fixation.I. The effect of teperature on recently nodulated *Trifolium repens* (L.) plants. *Australian Journal of Biological Sciencences*. 1963. **16** : 28-42.
- [5] Vincent J.M. A Manual for practical study of root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriologic, Programme Handbook* (15) 164. Oxford blackwell scientific Publication LTD. 1970.
- [6] Roskoski J.P., Montano J., van Kessel C. and Castillejo G. Nitrogen fixation by tropical woody legumes : Potential source of soil enrichment. In *BNF Technology for tropical agriculture*. Cali. Graham PH. And Harris SC. (edit. CIAT. 1981. 447-454.
- [7] Brewk-baker J.L., Kathryn B.W., and Mcklin W. Nitrogen fixing trees; validation and prioritization. *Proceeding of 19th NFRO World congres Montreal NFRO*. 1990. 335-349.
- [8] Sylla SN. Noye I., Ba A.T. et Dreyfus B. Potentiel fixateur d'azote de la symbiose rhizobium-Pterocarpus. *Annales de la faculté des sciences et techniques, UCAD*. 1997.**1**. 11-19.
- [9] Dreyfus BL. and Dommergues Y.R. Nodulation of Acacia species by fast and slow growing tropical strains of rhizobium. *Applied and Environment Microbiology*. 1981. **41**. 97-99.
- [10] Campelo A.B. And Dobereiner J. estudo sôbre inocucao cruzada de algumas leguminosas florestais. *Pesqui. Agripecu. Bras*. 1969. **4**. 67-72.
- [11] Dobereiner J. Efito da inoculaçao de sementeiras da sabia (*Mimosa caesalpinifolia*) no estabelicimento e desenvolvimento das mudas no campo. *Presq. Agropec. Bras*. **2**. 301-305.