

**RACCOURCISSEMENT DU TEMPS DE JACHERE, BIODIVERSITE  
ET DEVELOPPEMENT DURABLE EN AFRIQUE CENTRALE  
(CAMEROUN) ET EN AFRIQUE DE L'OUEST (MALI, SENEGAL)**

Coordonnateur : C. Floret

**Rapport final**

**Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération**

ORSTOM, France (contractant principal)

**Institut de Recherche Agronomique pour le Développement**

IRAD, Cameroun

**Institut d'Economie Rurale**

IER, Mali

**Institut Sénégalais de Recherche Agricole**

ISRA, Sénégal

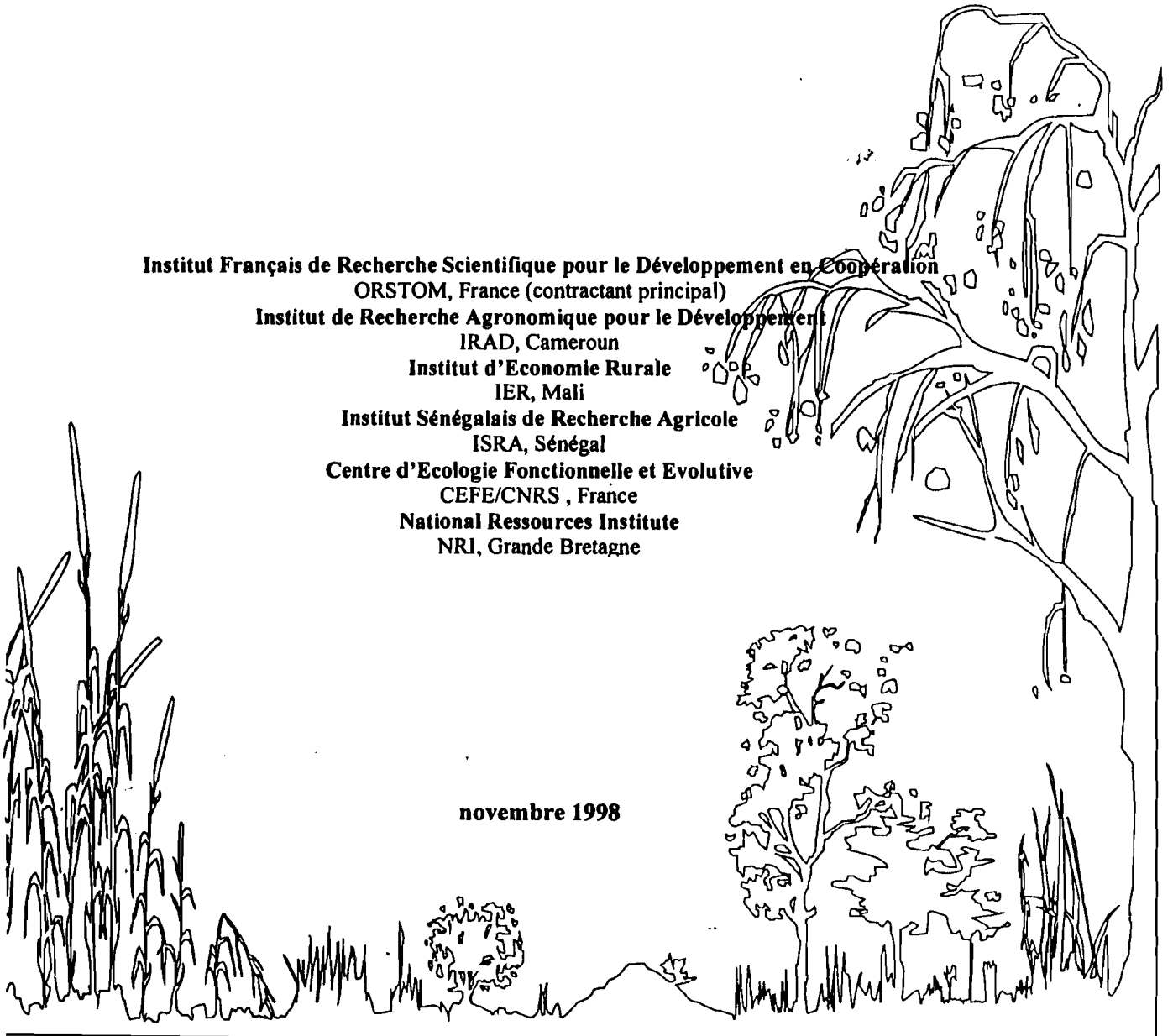
**Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive**

CEFE/CNRS, France

**National Resources Institute**

NRI, Grande Bretagne

novembre 1998



## 5.1 JACHERE ET RHIZOBIUMS

Bernard DREYFUS<sup>1</sup>, Etike FULELE-LAURENT<sup>1</sup>, Philippe de LAJUDIE<sup>1</sup>, Ibrahima NDOYE<sup>1</sup>, Marc NEYRA<sup>1</sup>, Ramatoulaye SAMBA<sup>1</sup>, Abdoulaye SY<sup>1</sup>, Samba SYLLA<sup>1</sup>, Inamoud YATTARA<sup>2</sup>

Laboratoire de Microbiologie ORSTOM/ISRA/UCAD de Bel-Air. <sup>2</sup> Laboratoire de Microbiologie ENSup/Fast/ISFRA de Bamako

### 5.1.1 Diversité des rhizobiums (M. Neyra, R. Samba, E. Fulele-Laurent, P. de Lajudie, I. Yattara, I. Ndoye, S. Sylla, B. Dreyfus)

Du fait de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique en symbiose avec les bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* (communément appelés rhizobiums), les légumineuses peuvent jouer un rôle important dans le maintien et l'amélioration de la fertilité des sols de jachère. Ce rôle peut être optimisé par l'inoculation des légumineuses avec des souches de rhizobiums sélectionnées pour leur infectivité (capacité à induire la formation de nodosités sur les racines et/ou les tiges des légumineuses associées) et leur efficacité (capacité fixatrice d'azote en symbiose).

Dans le cadre de ce projet, nos travaux avaient pour objectif d'étudier la diversité génotypique et symbiotique des rhizobiums associés aux légumineuses spontanées des zones de jachères, en essayant d'estimer l'impact éventuel de la réduction du temps de jachère sur cette diversité.

#### Analyse globale de la diversité de l'ensemble des rhizobiums isolés.

Différentes campagnes de prospection dans les trois pays (Sénégal, Mali et Cameroun) ont permis d'observer la présence de 58 espèces de légumineuses, herbacées, arbustives et arborescentes, appartenant à 18 genres différents.

Des nodules ont été récoltés *in situ* sur un nombre important de ces différentes espèces de légumineuses. L'isolement de souches de rhizobiums a été obtenu soit directement par étalement des nodules broyés sur milieu de culture gélosé, soit après obtention de nodules frais sur des plantes cultivées au laboratoire en milieu axénique et inoculées avec des broyats de nodules.

L'analyse globale des isolats obtenus par la comparaison des profils protéiques totaux en SDS-PAGE (de Lajudie *et al.*, 1995 ; Sylla *et al.*, 1997 ; Yattara *et al.*, 1996) a mis en évidence une grande diversité, et l'existence de nombreux groupes génomiques, souvent nouveaux, appartenant aux différents genres actuellement reconnus (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium*).

Le spectre d'hôte (ensemble des espèces végétales avec lesquelles une souche de rhizobium est capable de former des nodules et de fixer l'azote) a été étudié pour certaines souches sélectionnées et comparé à celui d'autres souches isolées dans des zones plus arides du Sénégal (Contrat CEE TS3\*-CT92-0047). Cette étude a été menée en inoculant des cultures bactériennes à des plantes cultivées en conditions axéniques dans des tubes contenant du milieu nutritif gélosé (milieu Jensen). 30 espèces de légumineuses rencontrées fréquemment au Sénégal ont été testées. L'apparition des nodules a été suivie pendant 4 semaines, et indique l'infectivité des isolats. Du fait du grand nombre d'isolats et de plantes testés, l'efficacité a été estimée par l'observation de la croissance et de la couleur des plantules, comparées à des témoins non inoculés. La majeure partie des isolats est capable de noduler l'ensemble des légumineuses testées (tableau 5.1-1). Par contre certaines souches ne sont capables de former des nodules que sur certaines de ces légumineuses, et présentent donc un spectre d'hôte réduit.

Des études plus approfondies ont été menées sur les souches bactériennes associées à différentes espèces végétales présentant un rôle potentiellement important pour les zones de jachère considérées, notamment *Acacia albida*, *A. senegal*, *Alysicarpus ovalifolius*, *A. glumaceus*, *Crotalaria* spp., *Dolichos lablab*, *Pterocarpus erinaceus*, *Tephrosia bracteolata*, *T. purpurea*, *Zornia glochidiata*. Seuls les résultats obtenus pour les rhizobiums isolés de crotalaires, pour lesquels les travaux sont actuellement les plus avancés, sont détaillés ci-dessous à titre d'exemple.



### Exemple de diversité : les rhizobiums de *Crotalaria* spp.

Les *Crotalaria* sont des légumineuses de la sous-famille des *Papilionnoaceae*. Le genre *Crotalaria* comporte 550 espèces connues (regroupées en sections et sous-sections) dont 63 en Afrique de l'ouest (Allen et Allen, 1981). 33 espèces sont présentes au Sénégal (Berhaut, 1976), partout en période humide, mais plus spécialement au sud où la diversité des espèces est plus grande ; *Crotalaria retusa* est l'espèce la plus répandue et se rencontre en toute saison de l'année.

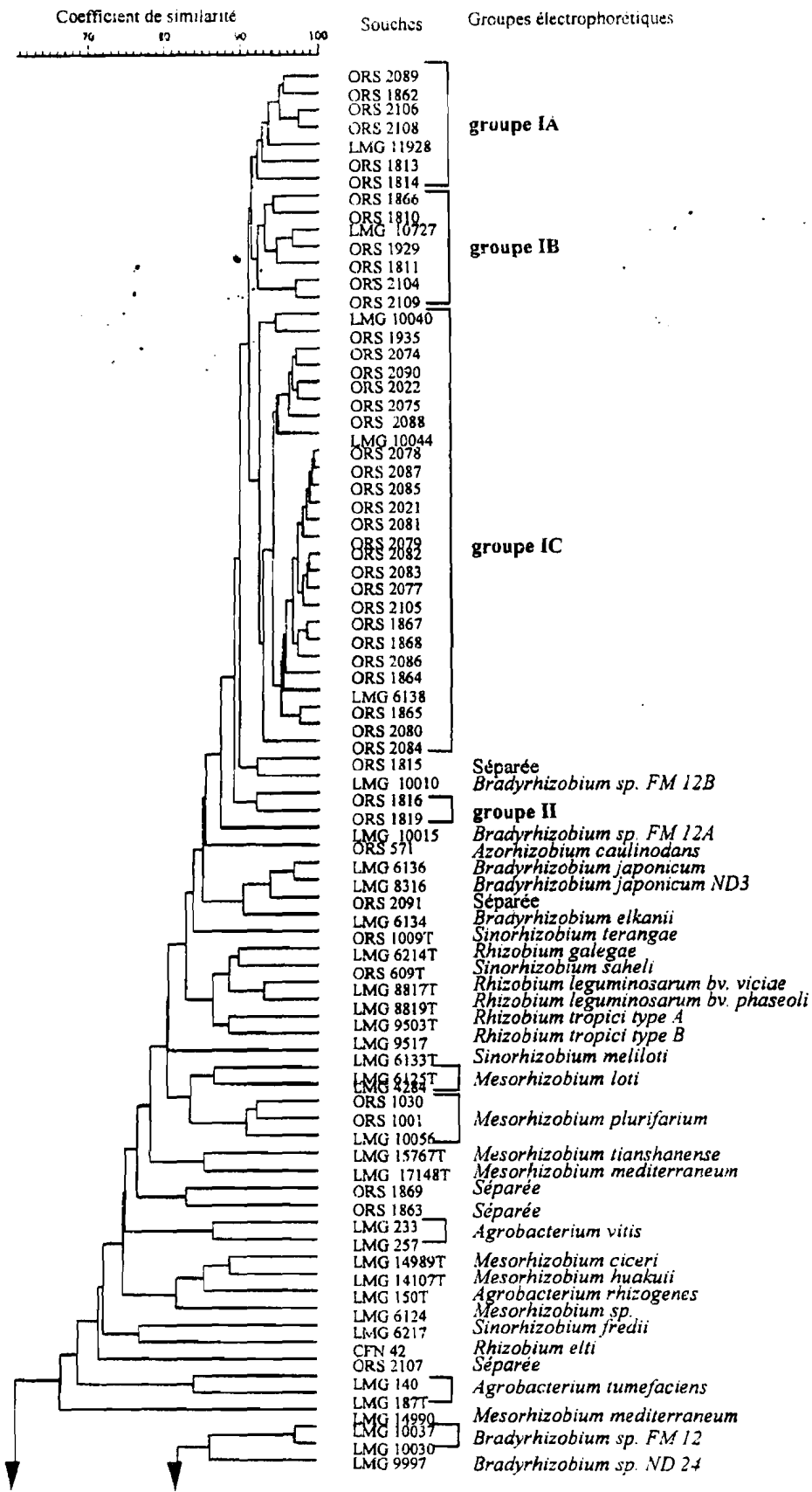
Différentes espèces de *Crotalaria* sont utilisées, essentiellement comme engrais vert, en association avec des plantes de culture ou préalablement enfouies dans le sol, mais également pour la fabrication de cordes, de filets de pêche, de sacs et de papier, pour l'alimentation humaine et animale, comme plantes ornementales ou encore pour leur effet insecticide. Les espèces les plus largement employées sont *C. ochroleuca* (Magingo, 1992) et *C. juncea* (Pandzou et Beunard, 1992 ; Mandimba, 1995 ; Beri *et al.*, 1989 ; Giller et Wilson, 1991) qui sont souvent associées au maïs ou au riz. Cependant, bien que prometteuses, les crotalaires sont apparemment peu utilisées au Sénégal, et nous ont parues particulièrement importantes à étudier du point de vue de leurs rhizobiums associés.

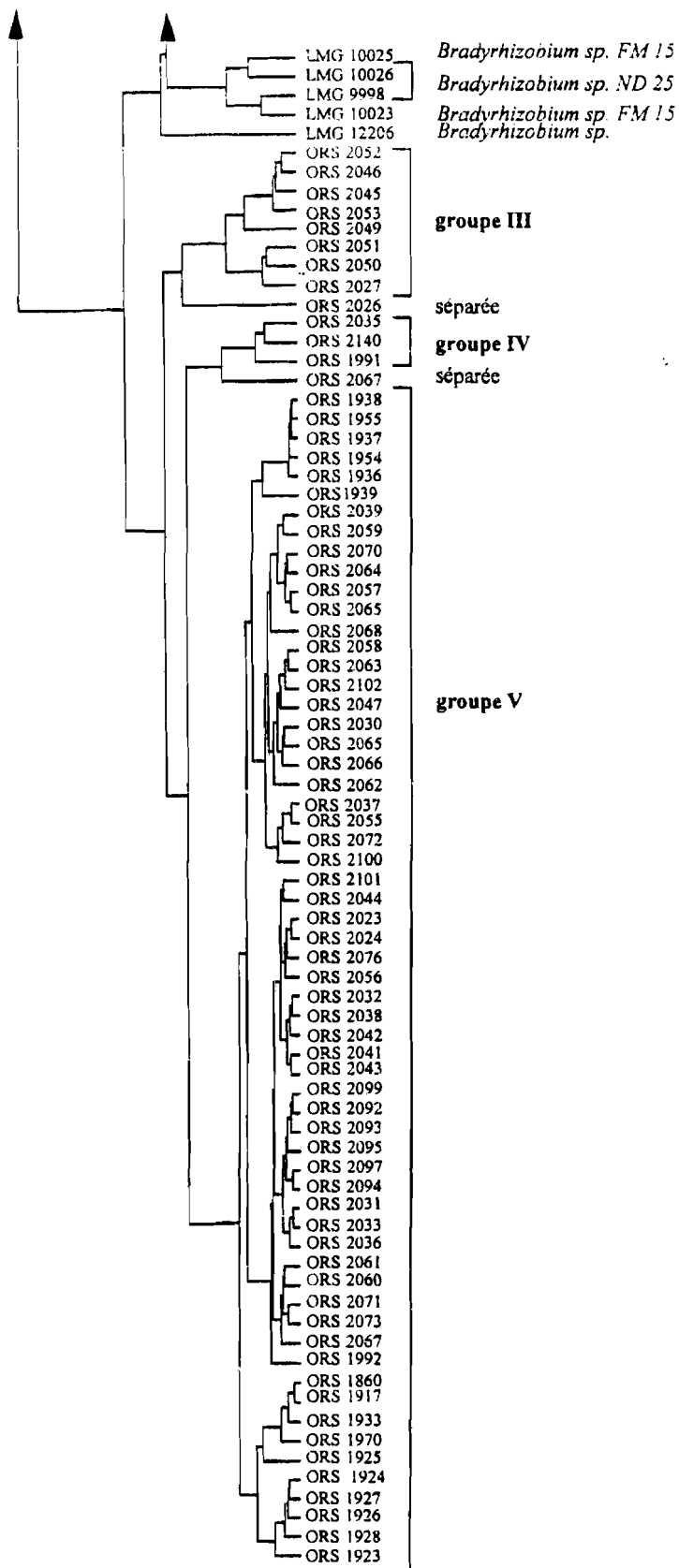
128 souches de rhizobium ont été isolés à partir de nodules récoltés sur 8 espèces de *Crotalaria* : *Crotalaria glaucoides* (25 isolats), *C. perrottetii* (30), *C. podocarpa* (28), *C. comosa* (12), *C. goreensis* (10), *C. hyssopifolia* (4), *C. lathyroides* (3), *C. retusa* (16), dans différentes zones de l'aire de répartition des espèces au Sénégal

Un premier criblage fait sur la base de la vitesse de croissance des souches (apparition de la première colonie) sur milieu Yeast Mannitol Agar (YMA) en boîtes de Pétri a montré que parmi les 128 souches, 83 étaient à croissance relativement rapide (apparition de colonies à 48 heures) et 45 à croissance "lente" (apparition de colonies après plus de 72 heures). L'estimation plus précise en milieu liquide du temps de génération de certaines de ces souches a confirmé l'existence de ces deux groupes.

Ce classement des souches de *Crotalaria* par analyse de leur vitesse de croissance a été renforcée par une approche faisant appel à différents niveaux d'étude (analyse dite "polyphasique") :

Les profils protéiques de 117 souches ont été analysés et comparés à ceux de 45 souches de référence, représentant les différentes espèces de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* et *Agrobacterium*, des *Bradyrhizobium* sp. du Brésil décrits par Moreira *et al.* (1993) et des *Bradyrhizobium* sp. isolés au Sénégal par Dupuy *et al.* (1994). Le regroupement des souches (figure 5.1-1) montre leur répartition en 5 groupes électrophorétiques à un coefficient de similarité de 0,9, valeur à laquelle les espèces de référence se différencient. Sept souches occupent des positions isolées. Les groupes I et II sont constitués uniquement de souches à croissance "lente" (*Bradyrhizobium* sp.). Le groupe I est constitué de 40 souches incluant la souche type de *Bradyrhizobium japonicum* (LMG 6138), 3 souches isolées au Brésil et une souche isolée au Sénégal par Dupuy *et al.* (1994). Le groupe II est constitué de 2 souches seulement. Les groupes III (8 souches), IV (3 souches) et V (61 souches) sont constitués uniquement de souches à croissance "rapide" et n'incluent aucune référence connue.





**Figure 5.1-1 : Dendrogramme montrant les relations mises en évidence par analyse des profils protéiques totaux entre les souches isolées de nodules de *Crotalaria* et des souches de référence de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* et *Agrobacterium*.**

L'étude de la résistance naturelle de 118 souches (80 à croissance rapide et 38 à croissance lente) à quatre antibiotiques (gentamycine, kanamycine, streptomycine et tétracycline) n'a montré qu'une faible différence de comportement entre les groupes de souches.

Par contre l'étude par chromatographie sur couche mince des facteurs de nodulation produits par 4 souches à croissance "lente" et 6 à croissance "rapide", après induction par la génistéine, montrent deux types de profils différents : les souches à croissance "rapide" présentent presque toutes le même profil avec plusieurs spots de faible amplitude, tandis que les souches à croissance "lente" présentent un profil avec un spot majeur, à un coefficient de migration de 0,5 semblable à celui de la souche ORS122 (isolée d'*Acacia albida*), prise comme référence.

L'analyse par PCR/RFLP de l'espace intergénique (IGS) séparant la sous unité 16S de la sous unité 23S de l'opéron ribosomal a été appliquée à 20 isolats sélectionnés, comparés à 37 souches connues de *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* et *Agrobacterium*. Toutes les souches étudiées ont montré un seul produit d'amplification, de taille variable selon que les souches étaient à croissance "lente" (environ 1000 pb) ou à croissance "rapide" (environ 800 pb). Les amplifiats ont été digérés avec 6 enzymes de restriction (*AluI*, *DdeI*, *HhaI*, *HinfI*, *MspI*, *RsaI*). Les profils de restriction ont montré une grande variabilité de l'IGS au sein des rhizobiums de *Crotalaria*. Ces profils ont été analysés selon la méthode de Nei et Li (1979). Une bonne corrélation est apparue entre les groupes obtenus par PCR-RFLP de l'IGS et ceux obtenus par SDS-PAGE. A un coefficient de 0,69, valeur à laquelle les souches de référence sont séparées par PCR-RFLP, les rhizobiums de *Crotalaria* se scindent en quatre groupes ; sept souches sont non-groupées. Trois groupes sont constitués uniquement de souches à croissance lente (l'un de ces groupes inclue *Bradyrhizobium japonicum*). Le quatrième groupe contient sept souches à croissance "rapide" (ORS1955, ORS1991, ORS1936, ORS1917, ORS1970, ORS1860, ORS1937). Ces souches de *Crotalaria* sont très éloignées des références, ne groupant avec elles qu'avec un coefficient de 0,23.

Par ailleurs vingt et une de ces souches ont été testées pour leur aptitude à noduler et à fixer l'azote en symbiose avec dix espèces du genre *Crotalaria* (*C. comosa*, *C. glaucoïdes*, *C. goreensis*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. ochroleuca*, *C. perrottetii*, *C. podocarpa*, *C. retusa*). Les résultats obtenus (tableau 5.1-2) montrent que les *Crotalaria* sont réparties en trois groupes de spécificité de nodulation.

- Le groupe I comporte les espèces *C. glaucoïdes*, *C. perrottetii*, *C. podocarpa* qui sont nodulées uniquement par des souches à croissance "rapide".
- Le groupe II comporte *C. goreensis* qui n'est nodulée que par certaines souches à croissance "lente".
- Le groupe III comportant les espèces *C. comosa*, *C. hyssopifolia*, *C. lathyroides*, *C. ochroleuca*, *C. retusa* nodulées par toutes les souches à croissance "lente" testées.

Les *Crotalaria spp.* du groupe I ne forment jamais de nodules effectifs (fixateurs d'azote) avec les souches de rhizobium nodulant les groupes II et III et vice-versa.

Les rhizobiums de *Crotalaria* présentent donc une grande diversité génotypique, phénotypique et symbiotique : certains sont proches de *Bradyrhizobium japonicum* ; d'autres par contre sont génétiquement très éloignés des différentes espèces de rhizobiums connues et forment des groupes génomiques nouveaux. Des études complémentaires sont en cours, notamment le séquençage de l'ADN 16S et des hybridations ADN/ADN, qui sont les techniques de base de la taxonomie bactérienne, afin de préciser l'identité de ces groupes microbiens nouveaux. Aucune corrélation entre la position taxonomique des souches et leur origine géographique n'a cependant été observée. Enfin une forte spécificité de nodulation existe, et sera à prendre en compte pour d'éventuelles inoculations au champ.

**Tableau 5.1-2 : Classification des espèces de *Crotalaria* selon le type de rhizobium associé**

Espèce	Type de rhizobium associé
<i>Crotalaria barkae</i>	Croissance "rapide"
<i>Crotalaria glaucoides</i>	
<i>Crotalaria perrotetii</i>	
<i>Crotalaria podocarpa</i>	
<i>Crotalaria sphaerocarpa</i>	Croissance "lente"
<i>Crotalaria goreensis</i>	
<i>Crotalaria arenaria</i>	
<i>Crotalaria comosa</i>	
<i>Crotalaria cylindrocarpa</i>	Croissance "lente"
<i>Crotalaria hyssopifolia</i>	
<i>Crotalaria lathyroides</i>	
<i>Crotalaria ochroleuca</i>	
<i>Crotalaria pallida</i>	
<i>Crotalaria retusa</i>	
<i>Crotalaria senegalensis</i>	

### Conclusion

L'ensemble des travaux menés sur les rhizobiums isolés de nodules des autres légumineuses de jachère étudiées confirme l'existence d'une grande diversité parmi les rhizobiums, telle qu'elle a été observée pour les souches isolées de crotalaires. Cette diversité se manifeste aussi bien au niveau de la spécificité de nodulation qu'au niveau génomique, reflet possible de différences de capacité d'adaptation aux conditions environnementales. Cette diversité est à prendre en compte lors de la sélection de souches pour une éventuelle inoculation de légumineuses. A ce niveau, une ou plusieurs souches très effectives ont pu être sélectionnées pour les principales espèces de légumineuses, et pourront servir d'inoculum pour des essais d'optimisation de la fixation d'azote.

Par contre il n'a pas été possible de mettre en évidence d'effet du raccourcissement du temps de jachère sur la diversité de ces rhizobiums. Du fait de l'ampleur de cette diversité, ainsi que du grand nombre d'espèces de légumineuses rencontrées, la seule approche qui était disponible lors de la réalisation de ces études (isolement de souches à partir des nodules, puis caractérisation génomique et symbiotique) s'est révélée inappropriée pour analyser un nombre suffisant de souches permettant de tester cette hypothèse. Par contre la caractérisation des différents groupes de rhizobium majoritairement présents permet d'envisager la recherche de zones génomiques spécifiques de chaque groupe, et, dans un proche avenir, l'utilisation de ces zones spécifiques pour le suivi des différentes populations (notamment par hybridation *in situ* avec des sondes moléculaires fluorescentes). Ces techniques moléculaires en cours de développement dans différents laboratoires, notamment le laboratoire de Microbiologie de Bel-Air au Sénégal, devraient permettre de préciser aussi bien le devenir de souches introduites par inoculation que l'impact des techniques de gestion des jachères sur le comportement des différentes populations de rhizobiums naturellement présentes dans les sols.

### 5.1.2 Fixation d'azote par des légumineuses des jachères (A. Sy, I. Ndoye, I. Yattara, B. Dreyfus)

Au Sénégal, 3 espèces locales de légumineuses (*Tephrosia purpurea*, *Alysicarpus ovalifolius* et *A. glumaceus*), particulièrement appréciées par les éleveurs pour leurs qualités fourragères et leur importante production de biomasse, ont été sélectionnées et utilisées en culture pure pendant 2 ans sur des parcelles en jachère depuis 5 ans (Sare Yorobana, Kolda). 2 traitements ont été appliqués : parcelles inoculées avec des souches présélectionnées pour leur efficacité à fixer l'azote et parcelles non inoculées.

Lors des 2 dernières années de culture, la culture pure de ces 3 légumineuses a permis de mettre en évidence l'effet important de l'inoculation sur la biomasse produite, et l'intensité de la nodulation. Après 3 mois au champ, *Tephrosia purpurea* présentait une biomasse produite inférieure à celle des témoins non inoculés, laissant supposer la présence de souches natives plus efficaces sur cette espèce que la souche inoculée. Par ailleurs, il n'y avait pas eu de différence visible dans la nodulation entre plants témoins et



plants inoculés, révélant ainsi la présence de populations natives de rhizobiums dans les sols. Les premiers résultats concernant l'évaluation de la teneur en azote du sol montrent que celle-ci peut passer du simple au triple après les 2 années successives de culture de *A. glumaceus*.

Dans des parcelles de jachère améliorée, l'inoculation d'*Acacia mangium* et d'*A. auriculiformis* avec une souche performante de *Bradyrhizobium*, et dans certains cas également une souche d'ectomycorrhize, a un effet significatif sur la croissance des arbres par rapport aux parcelles dont les arbres n'ont pas été inoculés (Lesueur & Sougoufara, 1997). En revanche, Gueye *et al* (1994) font mention de plants d'*Acacia holosericea* inoculés avec une souche de rhizobium et une souche d'ectomycorrhize, qui présentent, 5 mois après leur transplantation, une hauteur moyenne inférieure à celle de plants non inoculés (différence non significative). De même, Yattara (1996) au Mali n'observe pas, après 2-3 mois de transplantation, d'effet significatif de l'inoculation de souches efficaces de rhizobium sur la croissance, la production et le pourcentage de reprises des espèces de légumineuses plantées (*Acacia auriculiformis*, *A. senegal*, *A. albida*, *Stylosanthes hamata*, *Dolichos lablab*).

Il est important de noter que les résultats des deux dernières études mentionnées, obtenus après seulement quelques mois de plantation, ne peuvent, de fait, permettre de juger de l'effet de l'inoculation.

Au Mali, Yattara (1996) a comparé l'effet de l'inoculation à un apport d'engrais sur la croissance et la nutrition azotée du maïs en association avec le dolique. Il s'est avéré que l'inoculation a induit une biomasse légèrement supérieure à celle produite en culture pure et avec un apport d'engrais. L'association simple s'est caractérisée par une faible biomasse. Ainsi la production du maïs peut être améliorée par ce type d'association. La présence d'un système symbiotique favoriserait une activité rhizosphérique capable d'intervenir dans l'utilisation par le maïs des éléments minéraux du sol. L'apport de la symbiose pourrait consister à favoriser une minéralisation plus facile des éléments du sol d'où un enrichissement plus rapide de ce sol en azote fixé.

### Références citées

- ALLEN O. N. and ALLEN E. K., 1981. The leguminosae : A source book of characteristics, uses and nodulation. The university of Wisconsin press, Madison. Mulongoy, M. Gueye and DSC Spencer eds, John Wiley & sons, pp. 451-454.
- BERI, V., O. P. MEELU, C. S. KHIND. 1989. Biomass production, N accumulation, symbiotic effectiveness and mineralisation of green manure in relation to yield of wetland rice. Tropical Agriculture (Trinidad). 66 : 11-16.
- De LAJUDIE P., SY A., NDOYE I., SYLLA S., NDIAYE A., JEDER H., YATTARA I., NEYRA M., DREYFUS B., LINDSTOM K. & GILLIS M., 1995. Characterization by comparative SDS-PAGE profiles of 300 rhizobia isolated from nodules of 40 tropical Leguminosae species of arid region of Africa. In Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen fixation. May 28 June 3. St. Petersburg-Pushkin, Russia.
- DUPUY, N., A. WILLEMS, B. POT, D. DEWETTINCK, I. VANDENBRUAENE, G. MAESTROJUAN, B. DREYFUS, K. KERSTERS, M. D. COLLINS, M. GILLIS. 1994. Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. Int. J. Syst. Bacteriol. 44 : 461-473.
- GILLER, K. E., K. J. WILSON. 1991. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. ed. C.A.B. International, Wallingford, UK. 164-196.
- GUEYE M., DUCOUSSO M., & KAJRE M. 1994. Introduction d'*Acacia holosericea* dans une jachère. In « Raccourcissement du temps de jachère biodiversité et développement durable en Afrique Centrale (Cameroun) et en Afrique de l'Ouest (Sénégal, Mali) ». Rapport Scient. 1994, Comm. Des Communautés Europ. Contrat TSA-CT93 (DG 12), 119p.
- LESUEUR D., & SOUGOUFARA B., 1997. Influence du couvert végétal de la jachère améliorée à *Acacia* australiens sur la biodiversité des rhizobium locaux et introduits en relation avec la fixation symbiotique de l'azote. In : Rapport d'assistance technique 1997. Projet Amélioration et gestion de la jachère en Afrique de l'Ouest. Fiche n° 99.
- MAGINGO, F. S. S. 1992. *Crotalaria ochroleuca* a promising biofertiliser for the small-scale African farmer. ABN Symposium on Biotechnology for rapid Development in Africa. Nairobi 17-21 February.
- MANDIMBA, G. R. 1995. Contribution of nodulated legumes on the growth of *Zea mays* L. under various cropping systems. In Symbiosis. 19 : 213-222.
- MOREIRA, F. M. S., M. GILLIS, B. POT, K. KERSTERS, A. A. FRANCO. 1993. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical *Leguminosae* by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. Syst. Appl. Microbiol. 16 : 135-146.
- PANDZOU J., P. BEUNARD. 1992. Utilisation de *Sesbania rostrata* et *Crotalaria juncea* comme engrais vert sur le maïs. Biological Nitrogen Fixation and Sustainability of Tropical Agriculture. In Proceedings of the fourth International Conference of African Association for Biological Nitrogen Fixation. Ibadan, Nigeria, 24-28 septembre.
- SYLLA S. N., I. NDOYE, A. T. BA, B. DREYFUS. 1997. Spécificité de la symbiose chez *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens*. Bulletin de l'IFAN Ch. A. Diop, Dakar T. 49, sér. A, n°1 pp. 17-36.
- YATTARA I. I., P. DE LAJUDIE, M. NEYRA, C. DETREZ, Y. K. GASSAMA. 1996. Etude et caractérisation par SDS-PAGE et RAPD des *Rhizobium* (s. l.) de *Dolichos lablab* Linn., de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. et d'*Acacia albida* Del. provenant de trois zones agro-climatiques du Mali. 7ème Conférence de l'Association Africaine pour la Fixation Symbiotique de l'Azote. Yamoussoukro, Côte d'Ivoire, 2-7 septembre.