

Spécificité de la symbiose *Rhizobium-Pterocarpus* au Sénégal

EL HADJI SAMBA NDAO SYLLA*, IBRAHIMA NDOYE*,
AMADOU TIDIANE BA* & BERNARD DREYFUS**

- * Département de Biologie végétale, Faculté des Sciences et Techniques,
Université Cheikh Anta Diop de Dakar, BP 5 005, Dakar, Sénégal.
** Laboratoire de Microbiologie des Sols, ORSTOM, BP 1 386, Dakar, Sénégal.

RÉSUMÉ. - Soixante-dix souches de *Rhizobium* ont été isolées à partir de nodules racinaires de *Pterocarpus erinaceus* Poir. et *Pterocarpus lucens* Lepr. Les souches ont été caractérisées par l'étude de leur croissance, de leur résistance aux antibiotiques, de leur cinétique de nodulation, de leur spectre d'hôte et de leur effectivité.

Deux groupes bien distincts de souches ont été identifiés : des *Rhizobium* à croissance rapide et des *Rhizobium* à croissance lente.

Les tests d'inoculation ont montré que la plupart des souches isolées induisent une nodulation à la fois chez *Pterocarpus erinaceus* Poir. et *Pterocarpus lucens* Lepr. et aussi chez *Acacia albida* Del. Il existe une grande variabilité de ces souches pour leur capacité à fixer effectivement l'azote en symbiose.

Mots-clés. - *Rhizobium*, *Pterocarpus*, symbiose, fixation d'azote, effectivité, nodulation.

Specificity of *Rhizobium-Pterocarpus* symbiosis in Senegal

ABSTRACT. - Seventy *Rhizobium* strains were isolated from root nodules of *Pterocarpus erinaceus* Poir. and *Pterocarpus lucens* Lepr. The strains were characterized using the following criteria : growth study, antibiotic resistance, kinetics of nodulation, host specificity and effectivity.

Two distinct groups of strains, fast and slow growing *Rhizobium* were identified. Inoculation showed that both *Pterocarpus erinaceus* Poir. and *P. lucens* Lepr. and also *Acacia albida* Del. were nodulated by most of isolated strains. There is a great variability for these strains to fix effectively N₂ in symbiosis.

Key words. - *Rhizobium*, *Pterocarpus*, symbiosis, nitrogen fixation, effectivity, nodulation.



INTRODUCTION

C'est par le processus de la fixation biologique de l'azote que des bactéries du sol associées à des plantes parviennent à transformer l'azote atmosphérique sous la forme ammoniacale assimilable par les végétaux. Il est clair que les potentialités des principaux systèmes fixateurs d'azote, qui sont des plantes dotées de nodules racinaires hébergeant des bactéries fixatrices d'azote (*Rhizobium* dans le cas des Légumineuses), sont considérables (DOMMERGUES *et al.*, 1985) ; mais elles sont encore loin d'être pleinement exploitées. L'utilisation de cette propriété devrait :

(1) faciliter l'établissement des systèmes performants en faisant appel à l'inoculation par des bactéries symbiotiques sélectionnées ;

(2) permettre l'emploi des systèmes connus, mais insuffisamment exploités, en les intégrant systématiquement dans les écosystèmes agricoles ou forestiers ; c'est en particulier le cas des arbres fixateurs d'azote dont on commence seulement à entrevoir l'intérêt (GANRY & DOMMERGUES, 1993).

Les arbres fixateurs d'azote ont le double avantage d'améliorer la fertilité des sols appauvris et de fixer les sols érodés. Parmi les espèces de Légumineuses capables de s'associer en symbiose avec les *Rhizobiums*, des milliers ont été répertoriées (CORBY, 1988 ; de FARIA *et al.*, 1989). Mais, seuls 15% ont fait l'objet d'une étude approfondie et les propriétés symbiotiques de la plupart des Légumineuses sont mal connues.

Les *Rhizobiums* associés aux arbres tropicaux sont jusqu'à présent peu étudiés. Parmi eux existent des souches à croissance rapide et des souches à croissance lente appelées respectivement *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, bien que leur position taxonomique ne soit pas toujours établie. Rappelons que les *Rhizobiums* sont subdivisés en quatre genres sur la base d'études systématiques : *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* et *Sinorhizobium* (de LAJUDIE *et al.*, 1994).

Pterocarpus erinaceus Poir. et *P. lucens* Lepr. sont deux Légumineuses arborescentes présentes dans les écosystèmes naturels sahéliens et soudano-sahéliens. Au Sénégal, elles sont réparties dans deux régions climatiques correspondant à deux faciès écologiques différents (fig. 1). Elles sont de haute valeur économique, prisées pour leur bois et leur fourrage aérien, raison pour laquelle elles sont menacées par les exploi-

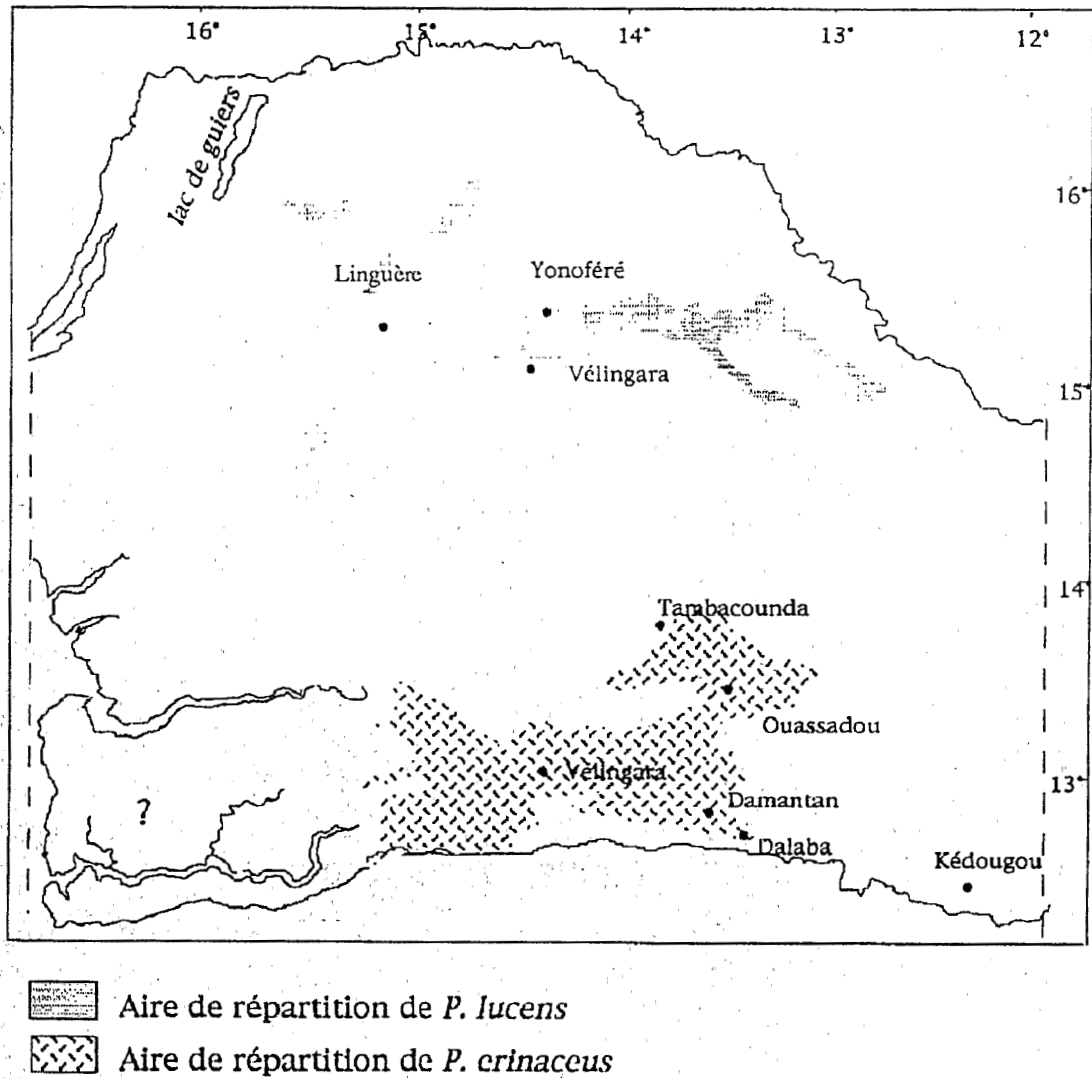


Fig. 1. Répartition géographique de *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens* au Sénégal (FREDERICKSEN & LAWESSON, 1992).

Fig. 1. Geographical repartition of *P. erinaceus* and *P. lucens* in Senegal (FREDERICKSEN & LAWESSON, 1992).

tants forestiers et tendent à disparaître dans des régions entières. Dans les zones où elles sont protégées (forêts classées et parcs nationaux), les conséquences de la sécheresse ont entraîné la disparition des populations qui existaient il y a quelques années.

Cependant, si le rôle et la place de ces deux espèces arborescentes dans les écosystèmes sont relativement bien connus, la symbiose *Rhizobium-Pterocarpus*, elle, reste mal connue. La présente étude envisage d'évaluer le niveau de spécificité de la symbiose chez *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens*, ainsi que le rôle des deux symbiontes, à la fois sur le plan fondamental et sur le plan des applications possibles pour le reboisement et la réhabilitation des terres dégradées en zone tropicale aride et semi-aride.

Le concept de groupe fonctionnel et de spécificité d'hôte est le premier fondement de la classification des *Rhizobium*s. En effet, il a été démontré que certaines plantes étaient moins spécifiques que d'autres et ne s'associaient qu'avec des *Rhizobium*s à croissance lente. C'est le cas des espèces telle *A. albida* (DREYFUS & DOMMARGUES, 1981). Pour pouvoir définir des groupes d'inoculation croisée, des souches de *Rhizobium* isolées de *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens* seront testées pour leur aptitude à noduler et à fixer l'azote avec *Acacia albida*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

RÉCOLTE ET CONSERVATION DES NODULES

Les nodules ont été récoltés à différents endroits de l'aire naturelle de répartition des deux espèces au Sénégal et conservés dans des piluliers contenant du silicagel en chambre froide à +4° C.

ISOLEMENT ET CONSERVATION DES SOUCHES DE RHIZOBIUM

Les souches ont été isolées de nodules racinaires d'individus appartenant aux deux espèces. Les isollements sont effectués après la récolte *in situ* des nodules, suivant le procédé ci-après :

- les nodules ont été lavés à l'eau courante pour enlever toute trace de terre ;
- chaque nodule, lavé superficiellement à l'eau, a été désinfecté par trempage dans du HgCl₂ à 0,1 % pendant 5 minutes ;
- la solution de HgCl₂ a été immédiatement éliminée par une série de rinçages à l'eau distillée stérile, en veillant à agiter de temps à autre les nodules mouillés ;
- les nodules ont été ensuite écrasés au moyen d'une tige de verre stérilisée au préalable ;
- l'isolement a été effectué par prélèvement d'une quantité du broyat qui a étéensemencé par épuisement sur milieu de culture YMA (VINCENT, 1970) à l'aide d'une öse de platine stérilisée ; l'incubation a été effectuée ensuite à l'étuve à 28-30°C ; dans le cas des souches à croissance rapide, 48 heures ont suffi pour voir apparaître les colonies bactériennes ; par contre, 4 à 6 jours ont été parfois nécessaires pour les souches à croissance lente ;
- après plusieurs cycles de purification, les souches ont été testées pour leur aptitude à former des nodules sur la plante hôte, puis conservées sur milieu YMA en boîte de Pétri à + 4°C ; pour de longues conservations, les souches ont été congelées à -80°C dans 50% de glycérol, dans des tubes Eppendorf stériles (1ml de glycérol + 1 ml de suspension bactérienne).

MILIEU DE CULTURE DES SOUCHES DE RHIZOBIUM

Milieu YM

Le milieu YM à base d'extrait de levure et de mannitol avec ou sans agar (YM ou YMA) a été le plus couramment utilisé pour la croissance et la bonne conservation des souches de *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium*. Il contient par litre : 10g mannitol ; 0,5g Na-glutamate ; 0,5g K₂HPO₄ ; 0,2g MgSO₄ ; 0,1g NaCl ; 1g d'extrait de levure ; 4mg FeCl₃ ; 20g d'agar. Le milieu ajusté à pH 6,7 a été stérilisé à 120°C pendant 20 minutes.

Milieu VSG

Le milieu VSG est le milieu VINCENT (1970) auquel ont été ajoutés 1g/l de succinate et 1g/l de glutamate. Le milieu Vincent contient par litre : 0,2g K_2HPO_4 ; 0,2g $MgSO_4 (7H_2O)$; 1g $CaHPO_4$; 0,14g $FeCl_3 (6H_2O)$; 2,86 mg H_3BO_3 ; 2,03 mg $MnSO_4 (4H_2O)$; 0,22mg $ZnSO_4 (7H_2O)$; 0,08mg $CuSO_4 (5H_2O)$; 0,09mg $Na_2MoO_4 (H_2O)$. Le milieu ajusté à pH 6,7 a été stérilisé à 120°C pendant 20 minutes.

Croissance bactérienne

Le nombre de bactéries N présentes dans un milieu de culture augmente en fonction du temps suivant la formule : $N = N_0 2^{\mu t}$, avec :

N = nombre de bactéries dans la population ;

N_0 = nombre de bactéries dans la population, au temps T_0 ;

μ = taux de croissance de la population propre à chaque espèce ;

t = temps.

Les techniques basées sur l'évaluation de la masse microbienne par la méthode spectrométrique utilisent la mesure de l'absorbance qui est proportionnelle à la concentration bactérienne. Un millilitre de solution bactérienne a été prélevé à partir d'une culture continue, toutes les 2 heures pendant 4 à 5 jours. L'absorbance a été mesurée à 600 nanomètres (nm) à l'aide d'un spectromètre UV/VIS Beckman DU 40. Les données ont permis d'établir une courbe classique de croissance en «S». Cette courbe présente une phase exponentielle avec un taux de croissance constant,

$N = N_0 2^{\mu t}$ ou $\text{Log} N = \text{Log} N_0 + \mu t \text{Log} 2$. La représentation de $\text{Log} N$ en fonction du temps est une droite dont la pente $a = \mu \text{Log} 2$. On en déduit le temps de génération $q = 1/\mu$. Ce temps varie selon les espèces bactériennes et en fonction des conditions de culture. N est proportionnel à la densité optique (DO) du milieu lorsque celle ci est comprise entre 0,1 et 0,8. $\text{Log} DO = \text{Log} DO_0 + \mu \text{Log} 2$ et $q = \text{Log} 2/a$.

RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Pour caractériser les souches et afin de pouvoir les conserver pures en culture continue, leur capacité à croître sur milieu YMA en présence

d'antibiotiques à diverses concentrations a été testée. Les antibiotiques suivants ont été utilisés : Kanamycine (Km) $30 \mu\text{gml}^{-1}$, Tétracycline (Tc) $10 \mu\text{gml}^{-1}$, Streptomycine (Sp) $100 \mu\text{gml}^{-1}$, Carbomycine (Cb) $200 \mu\text{gml}^{-1}$, Néomycine (Nm) $100 \mu\text{gml}^{-1}$, Chloramphénicol (Cm) $10 \mu\text{gml}^{-1}$, Erythromycine (Ery) $50 \mu\text{gml}^{-1}$, Naladyxine (Nal) $50 \mu\text{gml}^{-1}$, Gentamycine (Gm) $50 \mu\text{gml}^{-1}$ et Spectynomycine (Sm) $100 \mu\text{gml}^{-1}$. L'antibiotique a été additionné du milieu gélosé YM fondu à l'autoclave et refroidi à 50°C . Le milieu YMA additionné de l'antibiotique est réparti dans des boîtes de Pétri. Le repiquage a été fait par épuisement d'une colonie bactérienne sur la surface de la gélose.

La lecture du test a été effectuée du premier au sixième jour après repiquage, en prenant comme témoins les cultures sur YMA sans antibiotique. Les résultats obtenus ont été notés : +++, souche très résistante ; ++, souche moyennement résistante ; +, souche peu résistante et 0 souche sensible.

SPECTRE D'HÔTE ET EFFECTIVITÉ

Culture des plantes

Désinfection et germination des graines

Les graines de *Pterocarpus* ont un tégument qui est mécaniquement très peu résistant. Cependant, elles présentent une faible capacité germinative lorsqu'elles sont mises à germer sur milieu gélosé à 0,7 % en boîte de Pétri, dans les conditions du milieu ambiant. Un traitement chimique préalable à l' H_2O_2 (10 ‰) pendant 5 mn a été utilisé pour désinfecter la surface des graines et permis d'obtenir 80 % de germination au bout de 5 jours. Les graines d'*Acacia albida* ont été traitées à l'acide sulfurique (96 %) pendant 30 mn pour ramollir leur tégument.

Les graines ont été ensuite rincées à l'eau distillée stérile, puis mises à tremper pendant 12 heures, avant leur mise en germination à l'obscurité à $28-30^{\circ}\text{C}$. Au bout de 5 jours, les jeunes plantes de 1 à 2 cm de longueur ont été repiquées aseptiquement en tube de gélose inclinée.

Cultures en tubes

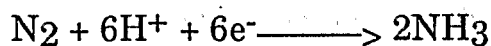
La technique de Gibson (1963) a été utilisée. Après germination, chaque plante a été mise en culture dans un tube de 22 x 220 mm contenant 30 ml de gélose nutritive Jensen inclinée (VINCENT, 1970) et rempli d'eau distillée stérile. Les tubes ont été recouverts de feuilles de papier imbibées d'eau stérile, puis placés en atmosphère confinée humide pendant 24 heures. Les jeunes plantes en tubes ont été mises en culture dans une chambre à 30°C, sous éclairage continu, avec un rayonnement photosynthétique actif (PAR) de 120 $\mu\text{mole m}^{-2}.\text{s}^{-2}$.

Inoculation des plantes en tubes

Deux jours après leur mise en tubes, les jeunes plantes ont été inoculées en injectant dans leur racine 1 ml de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance en milieu YM (environ 10^9 bactéries/ml).

Effectivité des souches

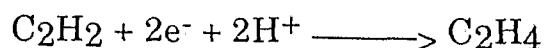
Toutes les souches ont d'abord été testées pour leur aptitude à fixer l'azote en symbiose. L'effectivité des souches a été estimée par la méthode de mesure de l'activité réductrice d'acétylène ou ARA (HARDY *et al.* 1968). Elle est basée sur le fait que la nitrogénase contenue dans les nodules des plantes fixatrices d'azote peut utiliser l'acétylène (C_2H_2) comme substrat et le réduire en éthylène (C_2H_4). La nitrogénase est l'enzyme qui catalyse la réduction biologique de l'azote atmosphérique en ammoniac selon la réaction *in vitro* :



Dans les nodules, la réduction de l'azote atmosphérique (N_2) se fait conformément à la réaction suivante :



La nitrogénase est capable d'accepter des substrats autres que N₂ qui renferment aussi des triples liaisons, par exemple l'acétylène qu'elle réduit en éthylène :



Cette réaction est à la base de la méthode de mesure indirecte de la fixation d'azote (ARA), qui consiste à évaluer la quantité d'éthylène formé par un système fixateur.

La quantité de C₂H₄ produit est mesurée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) par ionisation de flamme. Le chromatographe de type Varian Aerograph série 1400 était équipé d'une colonne de Sphérosil XOB 075 en acier inoxydable de 120 cm X 0,02 cm. Les températures respectives de la colonne, de l'injecteur et du détecteur était de 75°C, 60°C, et 120°C. Le gaz vecteur (azote) parcourant la colonne avait un débit de 40 ml/min. Les débits de l'air comprimé et de l'hydrogène gazeux sont respectivement 300ml/min. et 25 à 30 ml/min.

Les plantes inoculées et cultivées pendant 2 mois en tubes ont été testées pour leur capacité à fixer l'azote atmosphérique. Les parties aériennes des plantes ont été sectionnées, l'eau résiduelle des tubes complètement éliminée et les tubes contenant les parties racinaires fermés hermétiquement avec des bouchons à jupe en caoutchouc. L'acétylène a été injecté à l'aide d'une seringue dans les tubes à raison de 5ml/tube (10% du volume des tubes). Après 30 minutes d'incubation à la température ambiante, la quantité d'éthylène formée a été analysée en chromatographie en phase gazeuse sur une prise de 0,5 ml du mélange gazeux des tubes. En fonction de leur activité réductrice, les souches ont été classées : effectives, peu effectives, non effectives.

RÉSULTATS

CONSTITUTION D'UNE COLLECTION DE SOUCHES

Nous avons isolé 70 souches bactériennes à partir de nodules racinaires des deux espèces de *Pterocarpus* (tabl. I). Un premier criblage basé sur

Souches isolées de *P. erinaceus*

origine	croissance rapide			croissance lente				
	ORS		Test d'inoculation	ORS		Test d'inoculation		
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)		
Niokolokoba	202	E	E	E	201	E	E	E
"	207	E	E	E	208	E	E	E
"	210	E	E	E	198	E	E	E
"	211	E	E	E	199	e	e	e
"	217	E	E	e	200	e	e	e
"	227	E	E	i	203	e	e	e
"	212	e	e	e	204	e	e	e
"	213	e	e	e	205	e	e	e
"	214	e	e	i	206	e	e	e
"	215	e	e	i	209	e	e	e
"	216	e	e	i	218	e	e	e
"	220	i	i	0	219	e	e	e
"					221	e	e	e
"					222	e	e	e
"					223	e	e	e
"					224	e	e	e
"					225	e	e	e
"					226	e	e	e
"					258	i	e	i
Ferlo	255	E	E	e				
"	242	e	e	e				
"	253	e	e	e				
"	254	e	e	e				
"	230	i	i	i				
"	231	i	i	i				

Tableau I. Souches isolées de *P. erinaceus* et *P. lucens* au Sénégal : spectre d'hôte et effectivité.

Table I. Strains isolated from *P. erinaceus* and *P. lucens* in Senegal : host specificity and effectivity.

ORS : numéro de code de la collection de *Rhizobium* du laboratoire de Microbiologie de l'ORSTOM (Institut français de Recherche pour le Développement), Dakar.

(1) *P. erinaceus* ; (2) *P. lucens* ; (3) *Acacia albida*.

E : effective ; e : peu effective ; i : ineffective ; 0 : pas de nodulation.

Souches isolées de *P. lucens* au Sénégal

origine	croissance rapide			croissance lente				
	ORS	Test d'inoculation			ORS	Test d'inoculation		
		(1)	(2)	(3)		(1)	(2)	(3)
Ferlo	240	E	E	E	229	E	E	E
"	257	E	E	E	232	E	E	E
"	195	e	e	e	238	E	E	E
"	243	e	e	e	249	E	E	E
"	251	e	e	e	264	i	E	E
"	256	e	e	e	196	e	e	e
"	260	e	e	e	197	e	e	e
"	247	0	e	e	228	e	e	e
"	250	0	e	e	233	e	e	e
"	252	0	e	e	234	e	e	e
"	239	0	i	e	241	e	e	e
"	248	0	i	i	263	i	e	e
"	261	i	i	i	244	0	i	0
"	262	i	i	i	245	0	i	0
"	235	0	i	0				
"	236	0	i	0				
"	237	0	i	0				
"	246	0	i	0				
"	259	0	i	0				

Tableau I (suite)

ORS : numéro de code de la collection de Rhizobium du laboratoire de Microbiologie de l'ORSTOM (Institut français de Recherche pour le Développement), Dakar.

(1) *P. erinaceus* ; (2) *P. lucens* ; (3) *Acacia albida*.

E : effective ; e : peu effective ; i : ineffective ; 0 : pas de nodulation.

l'étude de la croissance sur YMA a permis de les classer en deux groupes : 37 souches à croissance rapide et 33 souches à croissance lente.

SPECTRE D'HÔTE ET EFFECTIVITÉ

Nous avons étudié le spectre d'hôte de l'ensemble des souches sur *Pterocarpus erinaceus*, *Pterocarpus lucens* et *Acacia albida*. Le tableau I montre que toutes les souches isolées de *P. erinaceus* forment des nodules avec *P. lucens* et inversement, sauf pour quelques souches isolées de *P. lucens* qui ne forment pas de nodules avec *P. erinaceus* ; 90 % des souches induisent une nodulation chez *A. albida*.

L'effectivité ou la capacité des souches bactériennes à fixer l'azote en symbiose est présentée dans le même tableau. Il montre que les mêmes souches forment des nodules efficaces avec *P. erinaceus*, *P. lucens* et *A. albida*. Néanmoins, on constate une grande diversité dans l'effectivité des souches. Cette diversité n'est corrélée ni à l'origine géographique des souches ni à leurs caractéristiques de croissance sur YMA. Cependant, il semble que les souches effectives sont celles de type croissance rapide isolées de *P. erinaceus* (Niokolo-Koba) et celles de type croissance lente isolées de *P. lucens* (Ferlo). La plupart des souches à croissance lente isolées de *P. erinaceus* (Niokolo-Koba) et celles à croissance rapide isolées de *P. lucens* (Ferlo) sont peu effectives.

CINÉTIQUE DE LA NODULATION

Le suivi de la nodulation a permis d'établir la courbe donnant l'évolution du nombre de nodules en fonction du temps (fig. 2). Les résultats montrent d'une part, que selon la souche, les premiers nodules apparaissent entre le 18^e et le 25^e jour après la date d'inoculation chez *P. erinaceus* et entre le 16^e et le 23^e jour chez *P. lucens*. Cependant, les souches ORS 238 et ORS 257, qui sont des souches isolées de *P. lucens*, ont une nodulation plus précoce par rapport aux autres souches testées. Dans tous les cas, le nombre de nodules formés atteint son maximum au 40^e jour après inoculation. On constate également qu'à l'exception des plants inoculés avec les souches ORS 202 et ORS 208, le nombre de

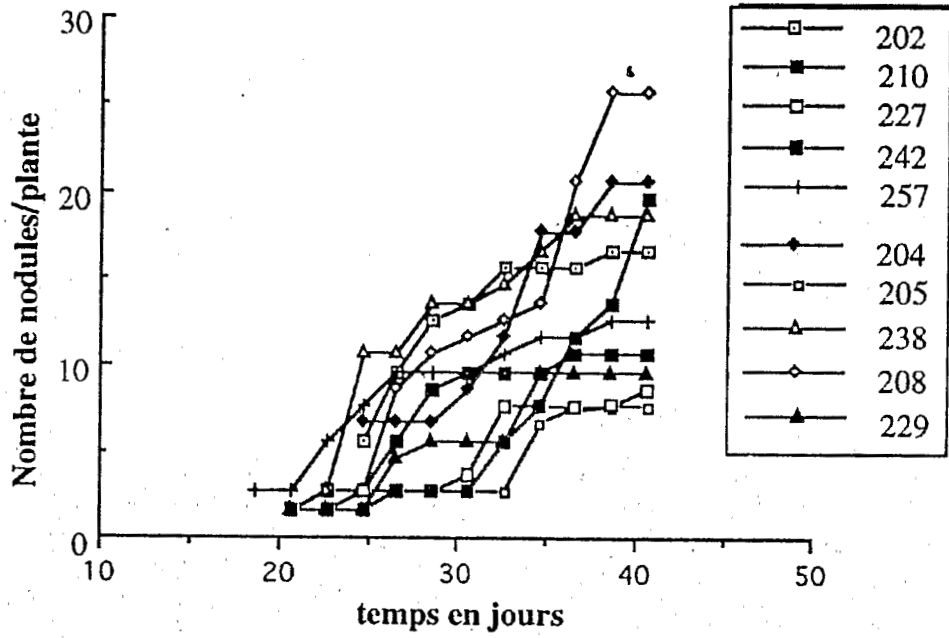
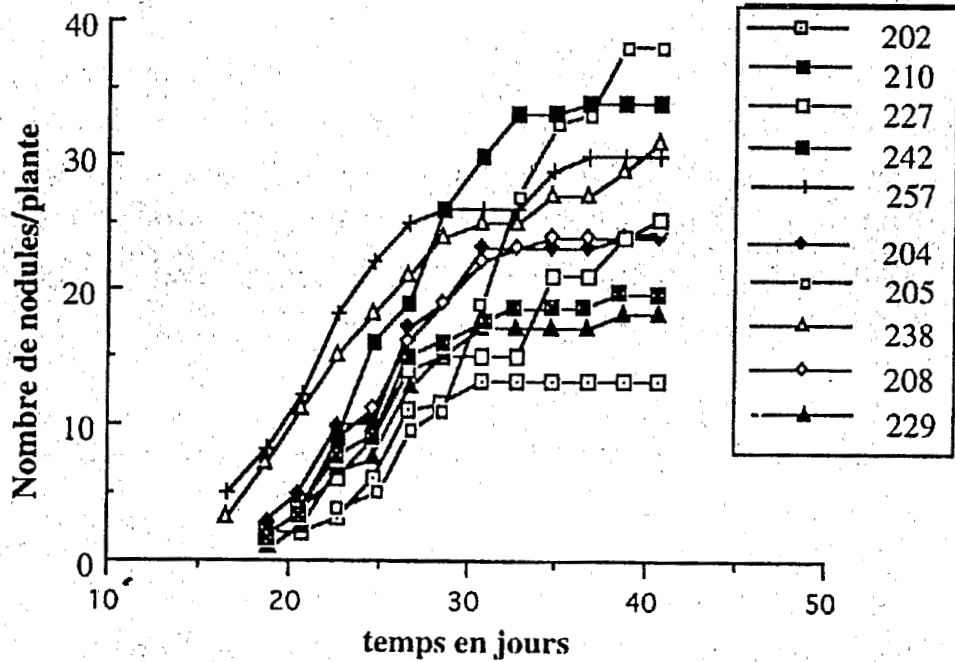
P. erinaceus*P. lucens*

Fig. 2. Cinétique de la nodulation des souches.
 Fig. 2. Nodulation kinetic of strains.

nodules formés au bout de 40 jours est toujours plus important chez *P. lucens* que chez *P. erinaceus*.

CINÉTIQUE DE LA CROISSANCE DES SOUCHES

Deux souches à croissance rapide (ORS 210 et ORS 255), ainsi qu'une souche lente (ORS 238), ont été testées sur YM, puis sur VSG (milieu minimum d'induction des facteurs de la nodulation). Les résultats (fig. 3) sont représentés sur courbe logarithmique de croissance. Sur YM, milieu optimum de croissance, le temps de génération (q) est supérieur à 6 heures pour la souche lente (type ORS 238), il est inférieur à 5 heures pour les souches rapides (type ORS 210 et ORS 255). Sur VSG, milieu dépourvu d'azote et seulement riche en éléments minéraux, le temps de génération est supérieur à 6 heures pour toutes les souches à l'exception de ORS 255.

SPECTRE DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Toutes les 70 souches de notre collection ont été testées pour la résistance aux antibiotiques. Les résultats mentionnés aux tableaux II et III montrent que la résistance aux antibiotiques n'est pas corrélée au type de croissance des souches. Elles sont pour la plupart sensibles à Km 30, Sm 100 et Gm 50 ; mais beaucoup sont résistantes à Tc 10, Spc 100, Cm 10, Cb 200 et Nal 50 et plus ou moins résistantes à la Nm 100 et Ery 50.

DISCUSSION

Nous avons constitué une collection de 70 souches de *Rhizobium* isolées de nodules racinaires de *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens*. L'étude présentée ci-dessus a permis de montrer que *P. erinaceus* et *P. lucens* étaient associées à deux types de *Rhizobium*, *Rhizobium* à croissance rapide et *Rhizobium* à croissance lente.

L'étude du spectre d'hôte a montré que *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens* appartiennent au même groupe de compatibilité. En outre, elle a confirmé les résultats de GUËYE (1992), à savoir que des souches à crois-

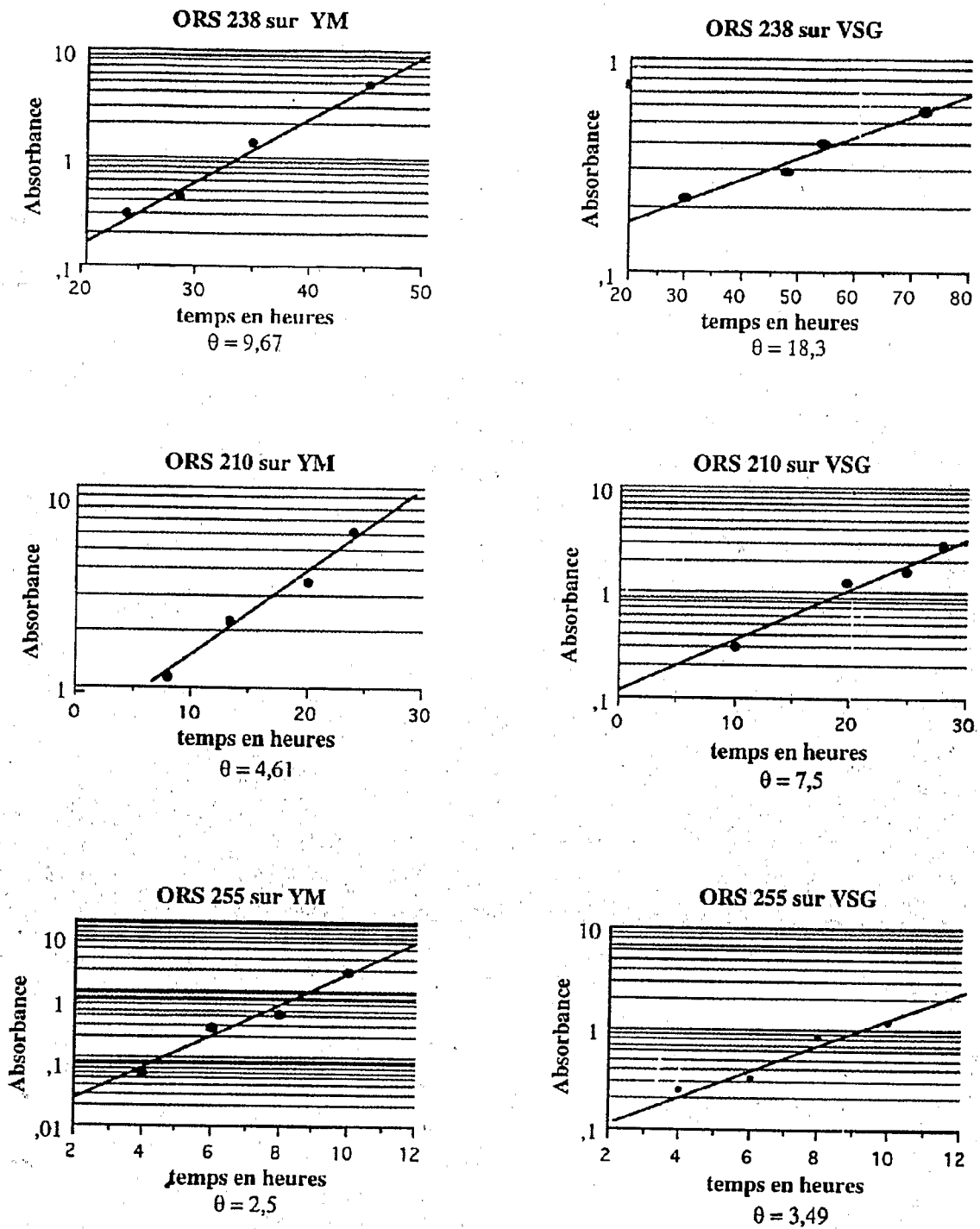


Fig. 3. Cinétique de la croissance des souches rapides et des souches lentes.
 Fig. 3. Kinetic of fast and slow growing strains.

ORS	Plante d'isolement	Origine	Test de résistance											
			Km30	Tc10	Cm10	Nm100	Sm100	Gm50	Spcl00	Nal50	Ery 50	Cb 200		
196	<i>P. lucens</i>	Ferlo	+	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+	+++	
197	"	"	0	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	
198	<i>P. erinaceus</i>	Niokolo	0	+++	+++	+	+	0	+++	++	+++	++	+++	
199	"	"	0	+++	+++	+	+	0	+++	++	+++	++	+++	
201	"	"	0	+++	+++	+	+	0	+++	++	+++	++	+++	
203	"	"	0	+++	+++	+	+	0	+++	++	+++	0	+++	
204	"	"	0	+++	+++	+	+	0	+++	++	+++	+	+++	
206	"	"	0	+++	+++	+	+	0	+++	++	+++	++	+++	
208	"	"	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
221	"	"	0	+++	+++	+	+	0	+++	++	+++	+	+++	
222	"	"	0	+++	+++	+	+	0	+++	++	+++	+	+++	
223	"	"	0	+++	+++	0	0	0	+++	++	+++	++	+++	
228	"	"	0	+++	+++	+	+	0	+++	++	+++	0	+++	
229	<i>P. lucens</i>	Ferlo	0	+++	+++	+	+	0	+++	++	+++	0	+++	
232	"	"	0	+++	+++	+	+	0	+++	++	+++	+	+++	
234	"	"	0	+++	+++	0	0	0	+++	++	+++	0	+++	
249	"	"	0	+++	+++	+	+	0	+++	++	+++	+	+++	
258	<i>P. erinaceus</i>	Niokolo	0	+++	+++	+	+	0	+++	++	+++	+	+++	
200	"	"	0	+++	+++	0	0	0	+++	++	+++	+	+++	
226	"	"	0	+++	+++	+	+	0	+++	++	+++	+	+++	
238	<i>P. lucens</i>	Ferlo	0	+++	+++	+	+	0	+++	++	+++	0	+++	
241	"	"	+++	+++	+++	+++	+++	0	+++	++	+++	+++	+++	
264	"	"	+	+++	+++	0	0	0	+++	++	+++	+	+++	
253	<i>P. erinaceus</i>	Niokolo	0	+++	+++	+	+	0	+++	++	+++	+	+++	
219	"	"	+++	+	0	0	0	0	+++	+++	0	0	0	
225	"	"	0	0	+	0	0	0	0	0	0	++	++	
205	"	"	0	0	++	+	+	0	+	0	0	+	+	
218	"	"	0	0	++	0	0	0	0	0	0	0	++	
224	"	"	++	0	0	++	++	0	++	++	++	++	0	
233	<i>P. lucens</i>	Ferlo	+++	0	0	+++	+++	0	+++	++	+++	++	+++	
244	"	"	++	0	0	0	0	0	+++	0	0	0	+	
245	"	"	++	0	0	+	+	0	+++	0	0	0	0	
263	"	"	0	0	+++	+++	+++	0	+	0	0	+	+	

Tableau II. Résistance aux antibiotiques des souches à croissance lente.
 Table II. Antibiotic resistance of slow growing strains.

ORS : numéro de code de la collection de Rhizobium du laboratoire de Microbiologie de l'ORSTOM, Dakar.

ORS	Plante d'isolement	Origine	Test de résistance											
			Km30	Tel10	Cm10	Nm100	Sm100	Gm50	Spc100	Nal50	Ery50	Cb200		
195	<i>P. lucens</i>	Ferlo	+	+++	+++	++	0	0	++	++	++	+	++	++
211	<i>P. erinaceus</i>	Niokolo	0	+++	+++	+++	0	0	+++	+++	+++	+	+++	+++
214	"	"	0	+++	+++	+++	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
212	"	"	0	+++	+++	+++	0	0	+++	+++	+++	0	+++	+++
215	"	"	+++	+++	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+++	+++
216	"	"	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
217	"	"	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
220	"	"	+++	+++	+++	+++	+++	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
231	"	Ferlo	0	+++	0	++	0	0	0	0	+	++	++	++
239	<i>P. lucens</i>	"	+	+++	++	+	+	0	+++	+++	0	0	+++	+++
240	"	"	0	+++	+++	+	+	+++	+++	0	+++	++	+++	+++
242	"	"	+++	+++	+++	+++	0	+++	+++	0	+++	+++	+++	+++
243	"	"	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	0	+++	+++	+++	+++
246	"	"	++	+++	+++	0	0	+++	+++	0	+++	+++	+++	+++
247	"	"	+++	+++	++	0	0	+++	+++	0	+++	+++	+++	+++
254	<i>P. erinaceus</i>	"	++	+++	0	+++	0	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
251	"	"	0	+++	++	+	+	+++	+++	0	+++	+++	+++	+++
252	"	"	0	+++	++	0	0	+++	+++	0	+++	+++	+++	+++
255	"	"	+++	+++	+++	+++	0	+++	+++	0	+++	+++	+++	+++
259	<i>P. lucens</i>	"	0	+++	0	+++	0	+++	+++	0	+++	+++	+++	+++
260	"	"	0	+++	++	+	+	+++	+++	0	+++	0	+++	+++
262	"	"	+++	+++	0	+	+	+++	+++	0	+++	+	+++	0
210	"	Niokolo	0	++	++	+++	0	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
213	"	"	0	++	+	+++	0	0	+++	+++	+++	0	+++	+++
227	"	"	++	++	+++	+++	++	+++	+++	0	+++	+++	+++	+++
257	<i>P. lucens</i>	"	0	++	++	+++	0	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
202	"	"	0	+	+	+++	0	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
230	<i>P. erinaceus</i>	Ferlo	0	+	+	0	0	0	+++	+++	0	0	+++	0
250	"	"	0	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	0	+++	0
207	"	"	+++	0	0	+++	0	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
235	"	"	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
237	<i>P. lucens</i>	"	0	0	0	+++	0	0	0	0	0	+	0	0
248	"	"	0	0	0	0	0	+	+++	0	0	0	0	0
256	"	"	0	0	0	+	+	+	0	0	0	0	0	+
261	"	"	0	0	0	0	0	0	+++	++	0	0	0	0

Tableau III. Résistance aux antibiotiques des souches à croissance rapide.
 Table III. Antibiotic resistance of fast growing strains.

ORS : numéro de code de la collection Rhizobium du laboratoire de Microbiologie de l'ORSTOM, Dakar.

sance rapide étaient aussi capables de former des nodules effectifs chez *Acacia albida*. DREYFUS & DOMMERGUES (1981) avaient montré que *A. albida* ne pouvait être nodulé que par des *Rhizobium* à croissance lente.

La cinétique de la nodulation a montré que les nodules se forment entre le seizième jour et le vingt cinquième jour après inoculation. Pour une même souche, les nodules apparaissent de manière plus précoce et en plus grand nombre chez *P. lucens*.

La cinétique de la croissance des souches a montré qu'il y avait réellement des souches à croissance rapide et des souches à croissance lente telles que l'avait défini JORDAN, en 1982.

Les tests antibiotiques ont permis d'établir le spectre de résistance de chacune des souches.

La résistance aux antibiotiques, la vitesse de croissance, ainsi que la cinétique de nodulation, sont des critères secondaires d'appréciation de la diversité des souches de *Rhizobium*. Cependant, selon BOTTOMLEY (1992) et DIEM (1993), ils sont prépondérants pour leur survie et leur compétitivité en milieu naturel.

La méthode d'estimation de l'activité réductrice d'acétylène, très ponctuelle, ne peut cependant constituer qu'une approche semi-quantitative de l'azote fixé. Elle n'est pas une méthode directe de mesure.

RÉFÉRENCES

- BOTTOMLEY, P. J. (1992). - Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. p. 293-348, in : Stacey G. S., Burris R. H. and Evan H. J. (Eds). *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman et al., New York.
- CORBY, H. D. L. (1988). - Type of rhizobial nodules and their distribution among the leguminosae. *Kirkia*, 13 : 53-124.
- De FARIA, M. S. M., LEWIS, G. P., SPRENT, J. I. & SUTHERLAND, J. M. (1989). - Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytologist*, 111 : 607-619.
- DIEM, H. G. (1993). - Réexamen des critères de sélection des souches de *Rhizobium* utilisées en agriculture. *Bulletin de la Société française de Microbiologie*, 8 : 83-87.
- DOMMERGUES, Y., DREYFUS, B. L. & DIEM, H. G. (1985). - Fixation de l'azote en agriculture tropicale. *La Recherche*, 162 : 22-31.
- DREYFUS, B. L. & DOMMERGUES, Y. R. (1981). - Nodulation of acacia species by fast and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. *Appl. And Environ. Microbiol.*, 41 : 97-99.
- FREDERICKSEN, P. & LAWESSON, J. E. (1992). - Vegetation types and patterns on Senegal based on multivariate analysis of field and NOAA-AVHRR Satellite Data. *Journal of Vegetation Science*, 3 : 535-544.
- GANRY, F. & DOMMERGUES, Y. (1993). - La fixation biologique de l'azote, fondement d'une production agricole soutenue. Les promesses de la recherche agronomique tropicale. *La Jaune et la Rouge* : 11-14.

- GIBSON, A. H. (1963). - Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. I. The effect of temperature on recently nodulated *Trifolium subterraneum* (L.) plants. *Aust. J. Biol. Sc.*, **16** : 28-42.
- GUÈYE, M. (1992). - *Acacia albida* : nodulation by fast and slow-growing Rhizobia, p. 145-147, in : Vandenbelt R. J. Eds. *Faidherbia albida* in the West African semi-arid tropics : Proceed of a workshop, 22-26 Apr. 1991. ICRISAT, Niamey, Niger.
- HARDY, R. F. W., HOLSTEN, R. D., JACKSON, E. K. & BURNS, R. C. (1968). - The acetylene-ethylene assay for nitrogen fixation : laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, **43** : 1185-1207.
- JORDAN, D. C. (1982). - Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov. a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **32** : 136-139.
- LAJUDIE, P. (de), WILLEMS, A., POT, B., DEWETTING, D., MAESTROJUAN, G., NEYRA, M., COLLINS, M. D., DREYFUS, B., KERSTERS, K. & GILLIS, M. (1994). - Polyphasique taxonomy of *Rhizobia* : Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44** : 715-733.
- VINCENT, J. (1970). - *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. International Biological Programme Handbook, 15. Oxford, Blackwell Scientific Publications ltd. 164 p.