

# Sélection de souches de rhizobium d'*Acacia seyal* tolérantes au sel

**Fatou DIAW-GUENE,**  
Microbiologiste

**Claudine CAMPA,**  
Physiologiste/Biotechnologue

**Mamadou GUEYE,**  
Microbiologiste

## Introduction

La salinisation des terres constitue un facteur limitant dans certaines zones du Sénégal (Sine, sud du Bassin Arachidier, zone Centre-Ouest du Sénégal), affectant de grandes surfaces et limitant la production végétale. Ainsi, dans la région de Fatick, la salinité a entraîné la disparition quasi totale des espèces ligneuses et herbacées et la régression des forêts à *Acacia seyal*. L'effet du sel se traduit plus particulièrement par une réduction de la disponibilité en azote pour les plantes, due essentiellement à une faible nitrification (Mengel et Kirkby, 1982) et à une absorption racinaire préférentielle du chlore par rapport au nitrate (Osmond *et al.*, 1980). Aussi, les plantes fixatrices d'azote, par leur capacité à assimiler l'azote atmosphérique en association avec les rhizobiums, semblent les plus aptes à résister aux conditions salines. Cependant, il est nécessaire que les bactéries (et les plantes associées) présentent une tolérance au sel. Il s'agit alors de sélectionner les rhizobiums tolérants au sel capables de noduler *Acacia seyal* et de fixer l'azote, thème de l'étude que nous présentons dans cette communication.

## Matériel et méthodes

Les tests de tolérance au sel et d'effectivité ont été réalisés sur 31 souches de rhizobium isolées à partir des nodules développés sur des racines d'*A. seyal* (Weaver et Frederick, 1982) mis en culture dans du sol prélevé dans des zones du Sénégal différant par leur teneur en sel. Les rhizobiums isolés ont été maintenus dans un milieu YEM (Vincent, 1970) gélosé à 4 °C. L'évaluation de la tolérance au sel a été effectuée par culture des souches sur du milieu YEM gélosé ou liquide renfermant des teneurs croissantes en NaCl. Deux répétitions ont été réalisées pour chaque traitement. La croissance des rhizobiums est évaluée par l'apparition de colonies dans les boîtes de Petri. L'effectivité des souches les plus tolérantes au sel a été évaluée sur plante entière (5 plantes pour chaque souche et 3 répétitions par plante) par la mesure de la fixation d'azote selon la technique ARA de dosage de l'activité réductrice d'acétylène (Hardy *et al.*, 1973).

Pour la souche sélectionnée, les cinétiques de croissance sont établies par la mesure de l'évolution de la densité optique (spectrophotomètre à 550 nm) des cultures dans le milieu YEM liquide, pour des concentrations salines allant de 0 à 16 g. l<sup>-1</sup> de NaCl.

La compétitivité de la souche sélectionnée vis-à-vis des souches natives du sol a été étudiée en milieu salé sur du sol de la station de Bel-Air (Dakar). Cet essai a été réalisé en serre sur des sols non stérilisés enrichis en NaCl par l'apport, une semaine après repiquage et pendant 3 jours successifs (à raison de 100 ml par gaine et par jour) de diverses solutions salines permettant d'obtenir une concentration de 0, 8, 12 et 16 g NaCl.l<sup>-1</sup> dans les gaines. Les plantules ont été cultivées dans des pots contenant 2 kg de sol. L'inoculation a été réalisée au moment du repiquage des plantules dans les gaines. Pour son identification, la souche a été transformée par conjugaison bactérienne avec une souche d'*Escherichia coli* qui renferme un plasmide contenant le gène *gusA*. Ce gène code pour une enzyme, la  $\beta$ -glucuronidase, qui, en présence de X-gluc (acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronique), donne un précipité bleu qui colore ainsi les nodules induits par la souche transformée. La compétitivité est évaluée après 30 jours par la mesure du nombre de nodules colorés en

bleu, contenant la souche transformée, par rapport au nombre total de nodules par plante. La coloration est obtenue après trempage des racines nodulées, sous vide, dans une solution tamponnée de X-Gluc (2 %) et agitation toute une nuit dans un bain-marie (37 °C).

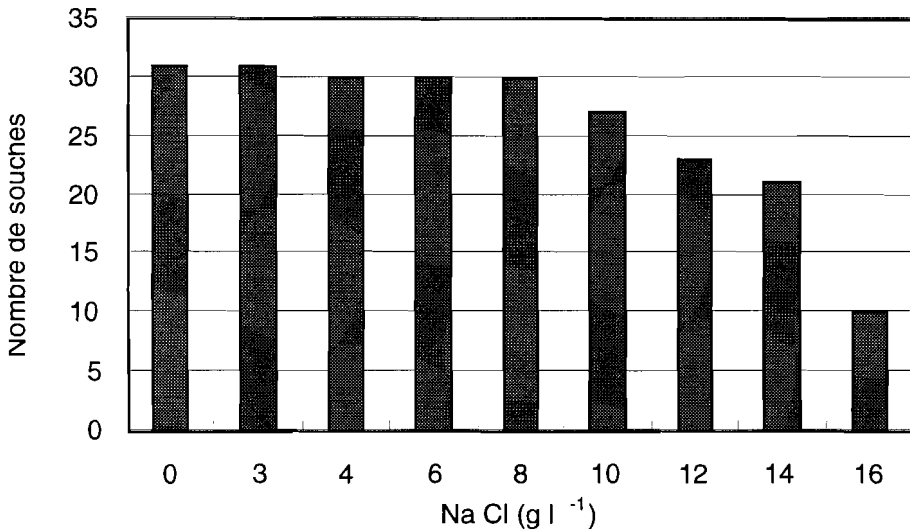
L'effectivité de cette souche en présence de sel a été testée par inoculation de jeunes germinations d'*A. seyal* avec la souche sélectionnée non transformée. L'expérience, basée sur le même principe que la précédente, a été réalisée dans des gaines contenant du sol stérilisé (120 °C, 2 fois 1 heure). Après 40 jours de culture, l'évaluation de la croissance est effectuée par mesure de la hauteur des plantes et de la matière sèche en comparaison à des témoins non inoculés. La teneur en azote des parties aériennes est dosée par la technique du micro Kjeldhal (Rinaudo, 1970).

## ■ Résultats et discussion

### *Sélection d'une souche tolérante au sel et efficiente pour A. seyal*

La mise en culture des différentes souches isolées de nodules d'*A. seyal* sur milieu gélosé enrichi en concentrations croissantes en NaCl montre que la quasi totalité des 31 souches peut croître sur des milieux contenant 8 g. l<sup>-1</sup> NaCl (fig. 1). Au-delà de cette concentration, les deux tiers des souches peuvent se développer dans un milieu contenant des teneurs en sel égales à 14 g l<sup>-1</sup> NaCl. et seulement dix souches sur un milieu contenant 16 g. l<sup>-1</sup> NaCl. Si quelques-unes des 21 souches tolérant 14 g. l<sup>-1</sup> NaCl proviennent de sols non salés, par contre, toutes les souches tolérant 16 g. l<sup>-1</sup> sont originaires de zones salées de Fatick (zone centre-ouest du Sénégal). La même expérimentation, réalisée en milieu liquide, isole les mêmes souches tolérantes.

L'évaluation de l'effectivité des 10 souches retenues pour leur tolérance au sel montre que toutes n'ont pas la même capacité à fixer l'azote (tabl.1). Ainsi, la souche 339, dont l'activité réductrice d'acé-



■ Figure 1

Evolution du nombre de souches pouvant croître dans un milieu YEM gélosé en fonction de la teneur en NaCl du milieu. Souches de *Rhizobium* isolées de nodules développés sur racines d'*A. seyal* semés dans des sols de différentes origines géographiques.

| Numéro ISRA | ARA (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> .plante <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) | Effectivité |
|-------------|--|-------------|
| 265         | 116  | e           |
| 266         | 487  | e           |
| 271         | 191  | e           |
| 326         | 103  | e           |
| 328         | 1148   | E           |
| 330         | 1263   | E           |
| 336         | 130  | e           |
| 339         | 47   | i           |
| 341         | 746  | E           |
| 342         | 335  | e           |

■ Tableau 1

Effectivité des souches de *Rhizobium* sélectionnées pour leur tolérance au sel. Mesure par ARA (activité réductrice d'acétylène) pour *A. seyal*, E : souche très effective, e : souche effective, i : souche inefficace.

tylène est très faible, semble ineffective pour *A. seyal*. Par contre, les souches ISRA 341, 328 et surtout 330 se montrent très effectives. La souche ISRA330, qui présente une bonne tolérance au sel et la meilleure effectivité pour *A. seyal*, a été sélectionnée pour réaliser les expérimentations d'inoculation en conditions salines.

Une étude plus fine de la croissance de cette souche en milieu liquide en présence de différentes concentrations en sel montre que seule la concentration à 16 g. l<sup>-1</sup> de NaCl a un effet inhibiteur sur la croissance de la souche (fig. 2). Comme cela a déjà été observé lors de cultures de souches bactériennes tolérantes au sel (Kassem *et al.*, 1985), la croissance est même plus importante lorsque le milieu est enrichi avec 8 g. l<sup>-1</sup> de NaCl, alors que des cinétiques de croissance identiques sont observées pour les souches se développant en absence de sel ou en présence de 12 g. l<sup>-1</sup> de NaCl.

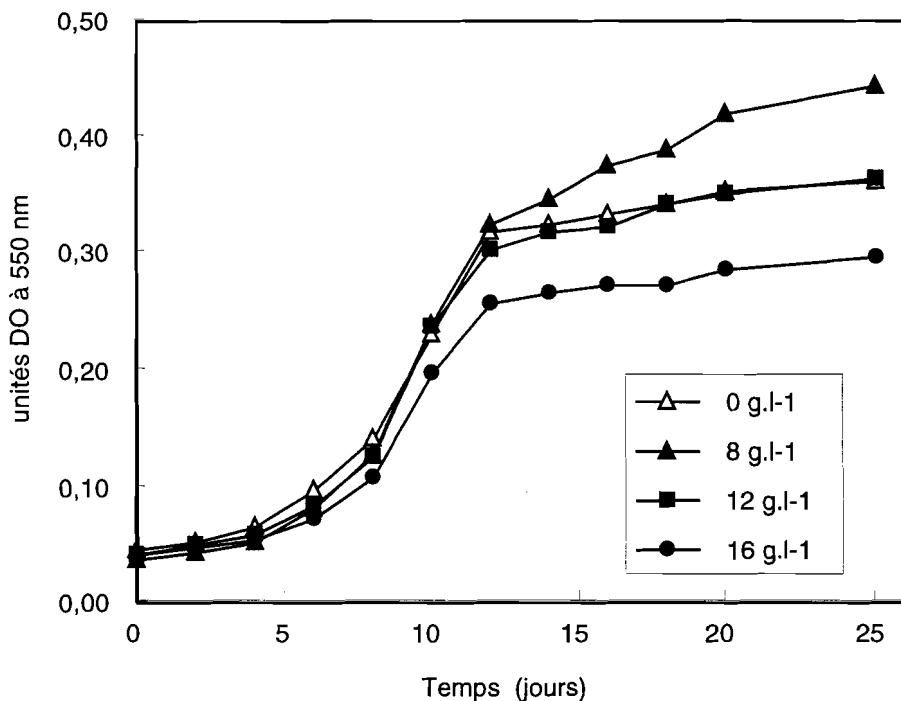


Figure 2  
Cinétique de croissance de la souche ISRA 330 pour différentes concentrations en sel. Cultures réalisées en milieu YEM liquide et croissance évaluée par mesure de la densité optique (DO) de la culture à 550 nm.

## Compétitivité de la souche ISRA 330

Afin de vérifier que, malgré la présence de souches de rhizobiums natives du sol, la souche ISRA 330 est une des plus compétitives pour coloniser les racines d'*A. seyal*, quelles que soient les conditions salines du sol, nous avons réalisé des cultures avec inoculation dans un sol non stérilisé. Pour différencier les nodules issus de cette souche de ceux formés par les souches natives, les bactéries de la souche ISRA 330 ont reçu, par transformation génétique, le gène *GusA* leur conférant une couleur bleue par révélation *in vitro* en présence de X-Gluc. Après 30 jours de culture dans diverses conditions salines, il apparaît que les racines d'*A. seyal* développent des nodules dont le nombre par plante décroît en fonction de la teneur en sel, à l'exception de la teneur à 8 g. l<sup>-1</sup> (tabl. 2). La majorité de ces nodules est occupée par des rhizobiums transformés d'ISRA 330 dont le nombre évolue dans le même sens en fonction de la concentration en sel. Cependant, ces nodules représentent toujours plus de 80 % des nodules totaux. Ce résultat montre que la souche ISRA 330 est très compétitive lorsqu'elle est inoculée aux plantes en présence des souches natives du sol.

| NaCl (g.l <sup>-1</sup> ) | Total | Nombre de nodules par plante      |                                | Pourcentage (%)                 |
|---------------------------|-------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
|                           |       | contenant<br>ISRA 330 <i>gusA</i> | contenant<br>souches indigènes | ISRA 330 <i>gusA</i><br>/ total |
| 0                         | 23    | 20 <sup>a</sup>                   | 3 <sup>b</sup>                 | 87                              |
| 8                         | 28    | 24 <sup>a</sup>                   | 4 <sup>b</sup>                 | 86                              |
| 12                        | 12    | 10 <sup>a</sup>                   | 2 <sup>b</sup>                 | 83                              |
| 16                        | 9     | 8 <sup>a</sup>                    | 1 <sup>b</sup>                 | 89                              |

Tableau 2

Nombre et pourcentage de nodules d'*Acacia seyal* contenant la souche de *Rhizobium* ISRA 330*gusA* en fonction de la teneur en NaCl du sol. Moyennes de 5 répétitions. Dans chaque ligne, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à  $p = 0,05$  d'après le test de Newmann et Keuls.

## Effet de l'inoculation d'*A. seyal* avec la souche ISRA 330

L'effet de la souche sur le développement des *A. seyal* associés a été étudié par inoculation dans des sols stérilisés contenant des concentrations croissantes en NaCl. Tout d'abord, on peut noter que la présence de sel inhibe la formation de nodules sur des plantes témoins mises au contact de la flore bactérienne contaminante (tabl. 3). Dans ce cas, l'apparition de nodules n'est observée qu'en absence de NaCl, et en faible quantité (2 mg par plante), ce qui tendrait à montrer que les bactéries présentes sur la station expérimentale de Bel-Air ne sont pas spécifiques à *A. seyal*. Par contre, une masse de nodules 5,5 fois plus importante se développe sur les racines des acacias inoculés avec la souche ISRA 330 en absence de sel. De plus, chez les plantes inoculées, la nodulation est possible à toutes

| NaCl<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | Nodules<br>MS (mg) | ARAP<br>(nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> .h <sup>-1</sup> .plante <sup>-1</sup> ) | ARAS<br>(nmolC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> .h <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> ) |
|------------------------------|--------------------|--|---|
| <b>Témoin</b>                |                    |  |   |
| 0                            | 2,0 <sup>c</sup>   | 11,5 <sup>d</sup>  | 4,4 <sup>c</sup>  |
| 8                            | 0,0                | 0  | 0   |
| 12                           | 0,0                | 0  | 0   |
| 16                           | 0,0                | 0  | 0   |
| <b>ISRA 330</b>              |                    |  |   |
| 0                            | 11,0 <sup>a</sup>  | 95,5 <sup>a</sup>  | 10,4 <sup>b</sup>   |
| 8                            | 4,0 <sup>bc</sup>  | 48,2 <sup>b</sup>  | 13,7 <sup>ab</sup>  |
| 12                           | 1,7 <sup>c</sup>   | 26,3 <sup>c</sup>  | 16,6 <sup>a</sup>   |
| 16                           | 1,1 <sup>c</sup>   | 10,5 <sup>d</sup>  | 10,5 <sup>b</sup>   |

■ Tableau 3

Effet de l'inoculation avec la souche ISRA 330 sur la fixation symbiotique d'*A. seyal*. L'activité fixatrice est évaluée par la mesure de l'activité réductrice d'acétylène par plante (ARAP) ou par mg de matière sèche de nodules (ARAS) sur 4 plantes âgées de 40 jours cultivées en serre dans des gaines contenant 2 kg de sol stérilisé et inoculées (ou non) avec la souche ISRA330. Pour chaque colonne, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % d'après le test de Newmann et Keuls.

les concentrations en sel, même si la masse sèche de nodules diminue en fonction de la teneur en NaCl (masse 10 fois moins importante à 16 g. l<sup>-1</sup> par rapport au témoin). La mesure de l'activité fixatrice par la technique ARA montre que les nodules développés par la souche ISRA 330 sont plus effectifs, en absence de sel, que ceux fournis par les souches contaminantes. En effet, cette activité, qu'elle soit exprimée par plante (pour l'ensemble des nodules) ou par mg de matière sèche de nodules, est supérieure dans les nodules formés par la souche ISRA 330. Si la concentration en sel a un effet négatif sur l'activité exprimée par plante, elle a par contre un effet positif aux faibles concentrations (8 et 12 g. l<sup>-1</sup>) sur l'activité exprimée en unité de matière sèche de nodules, ce qui semble indiquer que la souche est aussi effective, sinon plus, à ces concentrations en sel qu'en absence. Ce résultat va dans le sens des observations faites lors des études de cinétique de croissance de la souche ISRA 330 en présence de différentes concentrations en sel.

En ce qui concerne la croissance des plantes, on peut noter que l'inoculation limite l'effet négatif du sel observé chez les témoins (tab. 4).

| NaCl<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | Hauteur<br>(cm)    | MS<br>(mg)        | % N | N total<br>(mg.plante <sup>-1</sup> ) |
|------------------------------|--------------------|-------------------|-----|---------------------------------------|
| <b>Témoin</b>                |                    |                   |     |                                       |
| 0                            | 30,2 <sup>a</sup>  | 915 <sup>a</sup>  | 2,4 | 21,7 <sup>a</sup>                     |
| 8                            | 15,7 <sup>cd</sup> | 430 <sup>bc</sup> | 3,0 | 12,8 <sup>ab</sup>                    |
| 12                           | 15,7 <sup>cd</sup> | 255 <sup>cd</sup> | 3,6 | 9,1 <sup>b</sup>                      |
| 16                           | 8,2 <sup>e</sup>   | 210 <sup>d</sup>  | 1,6 | 4,6 <sup>b</sup>                      |
| <b>ISRA 330</b>              |                    |                   |     |                                       |
| 0                            | 29,0 <sup>a</sup>  | 742 <sup>a</sup>  | 2,6 | 19,1 <sup>a</sup>                     |
| 8                            | 22,8 <sup>b</sup>  | 527 <sup>b</sup>  | 3,2 | 17,8 <sup>a</sup>                     |
| 12                           | 19,4 <sup>bc</sup> | 595 <sup>b</sup>  | 3,3 | 20,0 <sup>a</sup>                     |
| 16                           | 13,4 <sup>d</sup>  | 290 <sup>cd</sup> | 2,4 | 7,0 <sup>b</sup>                      |

Tableau 4

Effet de l'inoculation avec la souche ISRA 330 sur la croissance des parties aériennes et la teneur en azote des plantes d'*A. seyal*. Moyenne des hauteurs et des matières sèches (MS) des parties aériennes de 4 plantes après 40 jours de culture en gaine. Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 % d'après le test de Newmann et Keuls.



Ainsi, un apport de NaCl à 8 g. l<sup>-1</sup> provoque une diminution des hauteurs de tiges et des masses sèches des parties aériennes d'environ 50 % chez les témoins et 30 % chez les plantes mises en présence de la souche ISRA330. L'effet le plus marqué est observé en présence de 12 g. l<sup>-1</sup> NaCl, où la matière sèche des parties aériennes des plantes inoculées représente 2,3 fois celle des plantes témoins. Compte tenu de cette différence de croissance entre témoins et inoculés, on observe un effet positif de l'inoculation sur la teneur en azote des plantes exprimée en mg d'azote par plante, alors qu'aucun effet significatif n'est noté sur cette teneur exprimée en pourcentage.

## Conclusion

Ces résultats montrent qu'il existe une diversité pour la tolérance au sel des rhizobiums isolés d'*Acacia seyal* et que les souches isolées des sols salés semblent plus aptes à tolérer des doses élevées en sel dans le milieu que celles d'origine non saline. De plus, il apparaît que toutes ses souches tolérantes ne présentent pas la même effectivité pour *A. seyal*. La sélection de rhizobiums pour une symbiose effective en milieu salin nécessite donc deux critères : tolérance du rhizobium au sel et effectivité du rhizobium en présence de la plante-hôte. De même, si l'on envisage de réintroduire dans un sol salé une espèce fixatrice d'azote en présence de rhizobia sélectionnés tolérants au sel et effectifs pour l'espèce, il semble indispensable de contrôler qu'ils soient également compétitifs vis-à-vis des souches natives du même sol. La souche ISRA 330 présente toutes ces caractéristiques pour *A. seyal*.

L'inoculation avec cette souche permet de contrebalancer l'effet inhibiteur du sel sur la croissance et la fixation d'azote chez *A. seyal*. La souche ISRA330 pourrait donc être utilisée pour l'inoculation d'*A. seyal* en pépinière dans le but de réhabiliter les zones salées à *Acacia seyal*.

## Bibliographie

- HARDY (R. W., R.), BURNS (R. C.),  
HOLSTEN (R. D.), 1973 -  
Application of the acetylene-ethylene  
assay for measurement of N<sub>2</sub>  
fixation, *Soil Biol. Biochem.*,  
5 : 47-81.
- KASSEM (M.), CAPPELLANO (A.),  
GOUNOT (A. M.), 1985 -  
Effet du chlorure de sodium  
sur la croissance *in vitro*, l'infectivité  
et l'effectivité des *Rhizobium meliloti*.  
MIRCEN J., *Applied Microbiol.*  
*Biotech.*, 1 : 63-75.
- MENGEL (K.), KIRKBY (E. A.), 1982 -  
"Nitrogen." *In* Principles of plant  
nutrition : International Potash  
Institute, (K.) Mengel, (E. A.) Kirkby  
éds. Worblaufen - Bern, 335-328.
- OSMOND (M.), MIQUEL (M.), ROBIN (P.),  
CONEJERO (G.), DOMENACH (A. M.),  
BARDIN (R.), 1980 -  
Influence du déficit hydrique  
sur l'activité nitrate réductase  
et nitrogénase chez le soja  
(*Glycine max* L Merr. cv Hodgson),  
*C R Acad Sci.*, 294 : 1007-1012.
- RINAUDO (G.), 1970 -  
*Fixation biologique de l'azote  
dans trois types de rizières  
de Côte d'Ivoire*. Thèse de Docteur  
Ingénieur, Université de Montpellier.
- VINCENT (J. M.), 1970 -  
A manual for the practical study  
of root nodule bacteria, International  
Biological Programme Handbook  
N° 15. Blackwell Scientific  
Publications, Oxford and Edinburgh.
- WEAVER (R. W.),  
FREDERICK (L. R.), 1982 -  
"Rhizobium." *In* Methods of Soil  
Analysis, Part 2, Chemical and  
Microbiological Properties -  
Agronomy Monograph n° 9,  
(R. D.) Segoe éds, Madison, USA.