ANALYSE COMPARATIVE DE L'EFFICACITE ET DE LA COMPETITIVITE DES SOUCHES DE RHIZOBIA : « SEMIA 5079 », « SEMIA 5080 », INRA G49 ET 532c.

REFERENT LSTM : Dr DUPONNOIS Robin

10 AVRIL 2022

Table des matières

I MATÉRIEL ET MÉTHODE 3
1- ANALYSE DE L'EFFICACITE DES SOUCHES SUR LA CROISSANCE DES DIFFERENTES VARIETES DE SOJA 3
Préparation des cultures bactériennes 3
Préparation des plants de soja 3
Paramètres étudiés 4
Analyses statistiques 4
2- EVALUATION DE LA COMPETITIVITE DES SOUCHES DANS UN SOL STERILE 4
Expérience en serre 4
Analyse via Box PCR 5
3- EVALUATION DE LA COMPETITIVITE DES SOUCHES DANS UN SOL NATUREL 5
Expérience en serre 5
Analyse via PCR Digitale 6
II RESULTATS 7
1- ANALYSE DE L'EFFICACITE DES SOUCHES SUR LA CROISSANCE DES DIFFERENTES VARIETES DE SOJA 7
Souches et Variété : 9
Profil des nodules en fonction de la souche inoculée et de la variété de soja 9
Taux de Chlorophylle (SPAD) : 11
Biomasse des parties racinaires : 12
Biomasse des parties aériennes : 13
Nombre de nodules : 14
Biomasse nodulaire : 15
Activité Réductrice d'acétylène (ARA) : 15
Conclusion sur l'efficacité des souches : 15
2- EVALUATION DE LA COMPETITIVITE DES SOUCHES 16
BOX PCR 16
3- SIMILARITES DES SOUCHES 19
4- EVALUATION DE LA COMPETITIVITE DES SOUCHES DANS UN SOL NATUREL 20
PCR Digitale 20
Cycle 1 : 21
Cycle 2 : 24
CONCLUSION 27

I MATÉRIEL ET MÉTHODE

1- ANALYSE DE L'EFFICACITE DES SOUCHES SUR LA CROISSANCE DES DIFFERENTES VARIETES DE SOJA

Préparation des cultures bactériennes

Au cours de cette expérience, nous travaillons avec quatre souches bactériennes différentes : SEMIA 5079, SEMIA 5080, INRA G49 et 532c. Les souches ont été reçues sur boites de pétries.

Les souches bactériennes sont cultivées en milieu TY Broth (Pour 1 litre d'eau distillée : Tryptone 5g, Yeast extract 3g, $CaCl_2$ 0.7g). Les cultures bactériennes sont mises à incubation dans l'obscurité à 27°C sous agitation pendant 4 à 6 jours pour atteindre 108 UFC.ml-1. (Les droites de régression linéaire ont été établies pour chaque souches)

Les cultures seront ensuite centrifugées (2400g, 10 minutes) et les culots seront mis en suspension dans une solution stérile de sulfate de magnésium 0,01M. Les solutions, prêtes pour l'inoculation, sont conservées à 4°C avant utilisation.

Préparation des plants de soja

Au cours de cette expérimentation, nous travaillons sur trois variétés de soja différentes : Es Mentor (Euralis™), RGT Sphinxa et RGT Stumpa.

Les graines sont mises à tremper dans l'eau pendant 24h puis à germer dans un substrat stérile à 25°C pendant 2 ou 3 jours. Les graines pré-germées sont transférées dans des pots de 1 litre (1 graine pré-germée par pot) remplis d'un substrat stérile constitué d'un mélange 50% d'attapulgite et 50% terre. Après 48 heures, les plants sont inoculés avec chaque suspension bactérienne. Le témoin (traitement non inoculé) recevra 1 ml de la solution de sulfate de magnésium. Six répétitions seront effectuées pour chaque traitement. Les pots sont placés en serre avec les conditions suivantes : 14 heures de jour avec une température de 22°C et 10 heures de nuit à 15°C.

Paramètres étudiés

Après deux mois de culture (au stade de remplissage des gousses), la concentration en chlorophylle foliaire de chaque plante est mesurée avec un chlorophylle mètre (SPAD).
Ensuite, les plantes sont soigneusement retirées de leurs pots puis mis en bouteille pour la mesure de l'activité réductrice de l'acétylène (ARA) selon les techniques décrites par Jia et al. (2008).

Les nodules sont par la suite comptés et récoltés. Les parties racinaires, parties foliaires et les nodules sont séparément mis à sécher à l'étuve à 45°C pendant 48 à 72h pour obtenir après pesé, les biomasses racinaire, foliaire et nodulaire sèches.

Analyses statistiques

Les données obtenues seront analysées statistiquement par une analyse de variance unidirectionnelle contrôlée et les moyennes seront comparées par le test de Tukey au seuil de 5%.

2- EVALUATION DE LA COMPETITIVITE DES SOUCHES DANS UN SOL STERILE

Expérience en serre

La préparation des cultures bactériennes ainsi que les conditions d'inoculation et de culture en serre seront réalisées selon les protocoles décrits dans le paragraphe précédent. Pour les expériences, nous utiliserons ici la variété Es Mentor (Euralis ™).

Pour étudier la compétitivité des souches nous réalisons différentes co-inoculations pour ensuite estimer le pourcentage de nodules formés par chaque souche inoculée.

Les différentes conditions d'inoculation sont les suivantes :

-TEMOIN
-G49
-SEMI 5079
-G49 + SEMI 5079

Chaque traitement comprend 12 répétitions, les pots sont répartis aléatoirement dans la serre avec les mêmes conditions environnementales que précédemment (14 heures de jour à 22°C et 10 heures de nuit à 15°C). Après 1 mois de culture, les plantes sont dépotées et les systèmes racinaires soigneusement lavés à l'eau courante.

Analyse via Box PCR

25 nodules seront prélevés dans chaque condition (25 nodules parmi les 12 répétitions). Un à un les nodules sont désinfectés en surface à l'aide d'hypochlorite de calcium (3%). Chaque nodule est broyé en conditions stériles puis étalé sur boîte de pétri pour isoler les souches de rhizobium par nodule. L'ADN de chaque isolat est amplifié par BOX PCR, nous obtenons les profils bactériens. Le pourcentage de nodules formés par chaque souche inoculée est déterminé.

3- EVALUATION DE LA COMPETITIVITE DES SOUCHES DANS UN SOL NATUREL

Expérience en serre

La préparation des inoculats bactériens ainsi que les conditions d'inoculation sont réalisées selon les protocoles décrits ci-dessus en utilisant la variété Es Mentor (Euralis™). Ici, les inoculations se font avec 3 ml de solution bactérienne par pot.

Le substrat de culture est constitué d'un mélange 50% atapulgite et 50% terre. La terre a été prélevée dans un champ proche du campus de Baillarguet et tamisée à 2 mm avant utilisation. La configuration de l'expérience est identique au protocole décrit au paragraphe 2.

Les différentes conditions sont les suivantes :

-TEMOIN
-G49
-532C
-SEMI 5079
-SEMI 5080
-G49 + SEMI 5079
-G49 + SEMI 5080
-G49 + 532C
-SEMI 5079 + SEMI 5080
-532 + SEMI 5079
-532C + SEMI 5080
-G49 + SEMI 5079 + SEMI 5080
-532C + SEMI 5079 + SEMI 5080
-G49 + 532C + SEMI 5079
-G49 + 532C + SEMI 5080
-G49 + 532C + SEMI 5079 + SEMI 5080

Après un mois de culture (stade de première gousses), les plantes seront retirées, 20 nodules par condition sont récoltés et le pourcentage d'occupation des nodules sera évalué.

Analyse via PCR Digitale

Les 20 nodules de chaque condition sont désinfectés à l'hypochlorite de sodium (3%) puis broyés ensemble. Une extraction d'ADN est réalisée sur les broyats de chaque condition. Le pourcentage d'occupation des nodules est évalué par dPCR (digital pcr). Une méthode plus précise qui nous permettra de connaitre la quantité et la proportion de chaque bactérie dans les nodules prélevés pour chaque condition. La dPCR est réalisée sur les différents extraits d'ADN.

Pour chaque plante, le système racinaire comportant les nodules non récoltés est coupé en fragments de 1 cm. Ces fragments sont mélangés avec le substrat de culture du même pot. De nouvelles plantes germées sont plantées dans ces mêmes pots. Deux cycles de culture sont ainsi suivis dans les mêmes conditions environnementales afin de mettre en évidence l'évolution du pourcentage d'occupation des nodules par les souches testées à chaque condition. L'inoculation des pots se fait donc par l'ajout des nodules du cycle précédent, aucun inoculât liquide n'est ajouté.

II RESULTATS

1- ANALYSE DE L'EFFICACITE DES SOUCHES SUR LA CROISSANCE DES DIFFERENTES VARIETES DE SOJA

Droites de régression linéaires :

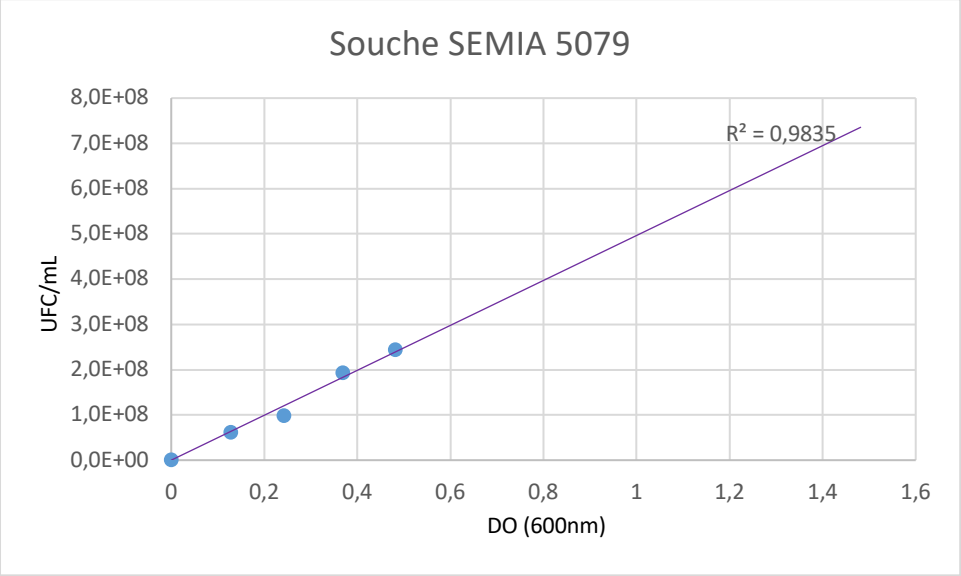


Figure 1: Droite de régression linéaire de la souche SEMIA 5079

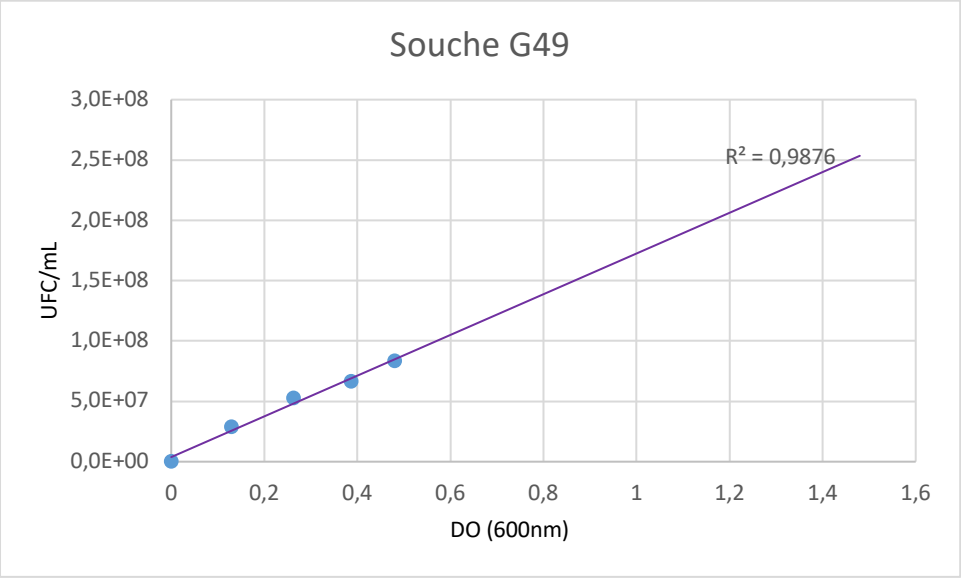


Figure 2: Droite de régression linéaire de la souche G49

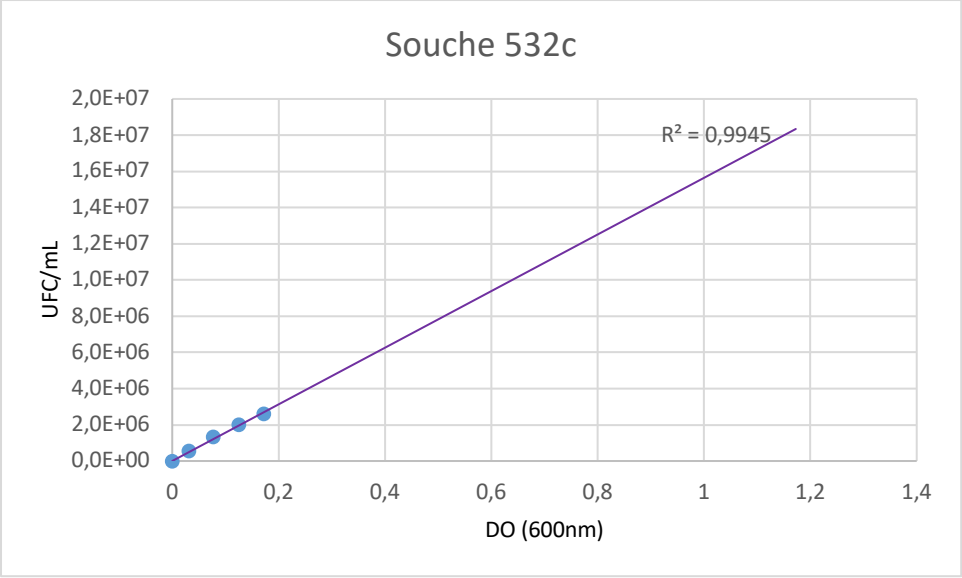


Figure 3: Droite de régression linéaire de la souche 532c

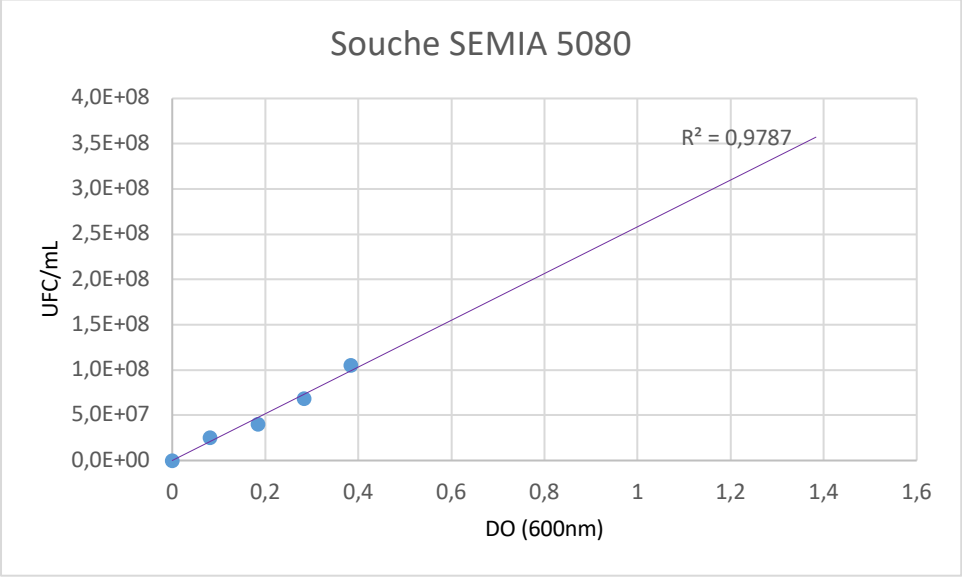


Figure 4: Droite de régression linéaire de la souche SEMIA 5080

Pour atteindre une concentration de 10^8 UFC.ml-1 on laisse les bactéries à 27°C sous agitation jusqu'à obtenir la densité optique (DO) suivante :

Souche 5079 DO = 0,4

Souche G49 DO = 0.6

Souche 532c DO = 1,5

Souche 5080 DO = 0,6

Souches et Variété :

Nous avons deux variables dans ces expériences: La souche et la variété. L'analyse de variance à un facteur nous montre que nous trouvons beaucoup plus de différences significatives entre les souches bactériennes qu'entre les variétés de soja :

	Variété	**Souche**
Biomasse racinaire	0.00111 **	0.00648 **
Biomasse foliaire	0.259	3.47e-08 ***
Biomasse nodulaire	0.259	3.87e-07 ***
Nombre de nodules	0.0536	2.76e-10 ***
SPAD	0.192	2e-16 ***
ARA	0.0609	0.189

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Comme nous pouvons le voir, en ce qui concerne les souches bactériennes, nous avons des différences significatives dans tous les paramètres sauf l'activité réductrice de l'acétylène. Concernant les variétés de soja, la seule différence que nous pouvons observer concerne la biomasse racinaire.

La biomasse racinaire de la variété Mentor est significativement plus élevée que celle de la variété Sphinxa.

Profil des nodules en fonction de la souche inoculée et de la variété de soja

	MENTOR	SPHINXA	STUMPA
532c			

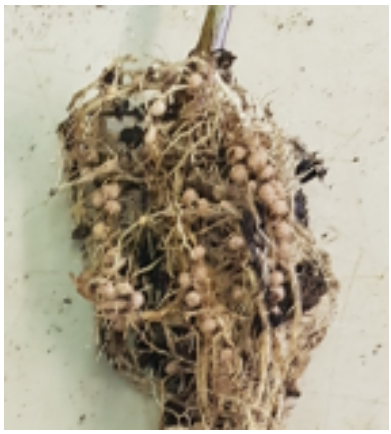
SEMIA 5079			
SEMIA 5080			
G49			
Témoin			

Figure 5: Photos des systèmes racinaires

Nous retrouvons quelques nodules sur les systèmes racinaires de la condition Témoin non inoculée malgré un substrat stérile. Ceci laisse penser qu'il y a eu des contaminations croisées dans la serre, lors des arrosages par exemple ou simplement via les courants d'air.

Taux de Chlorophylle (SPAD) :

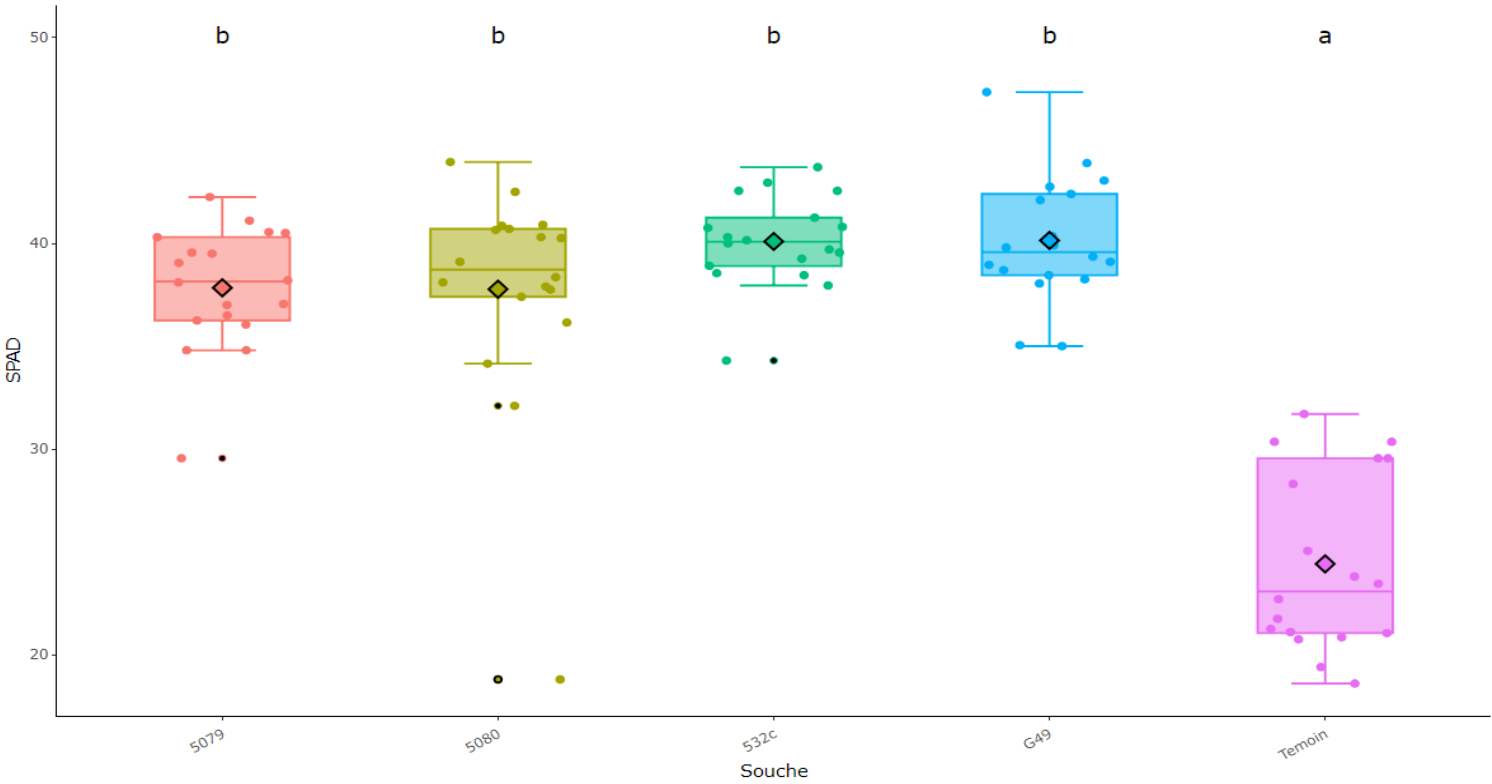


Figure 6:Taux de chlorophylle en fonction des souches

Les plants de le condition témoin montrent un taux de chlorophylle significativement inférieur aux autres conditions. Toutefois, nous n'avons pas d'autres différences significatives entre les souches bactériennes.

Biomasse des parties racinaires :

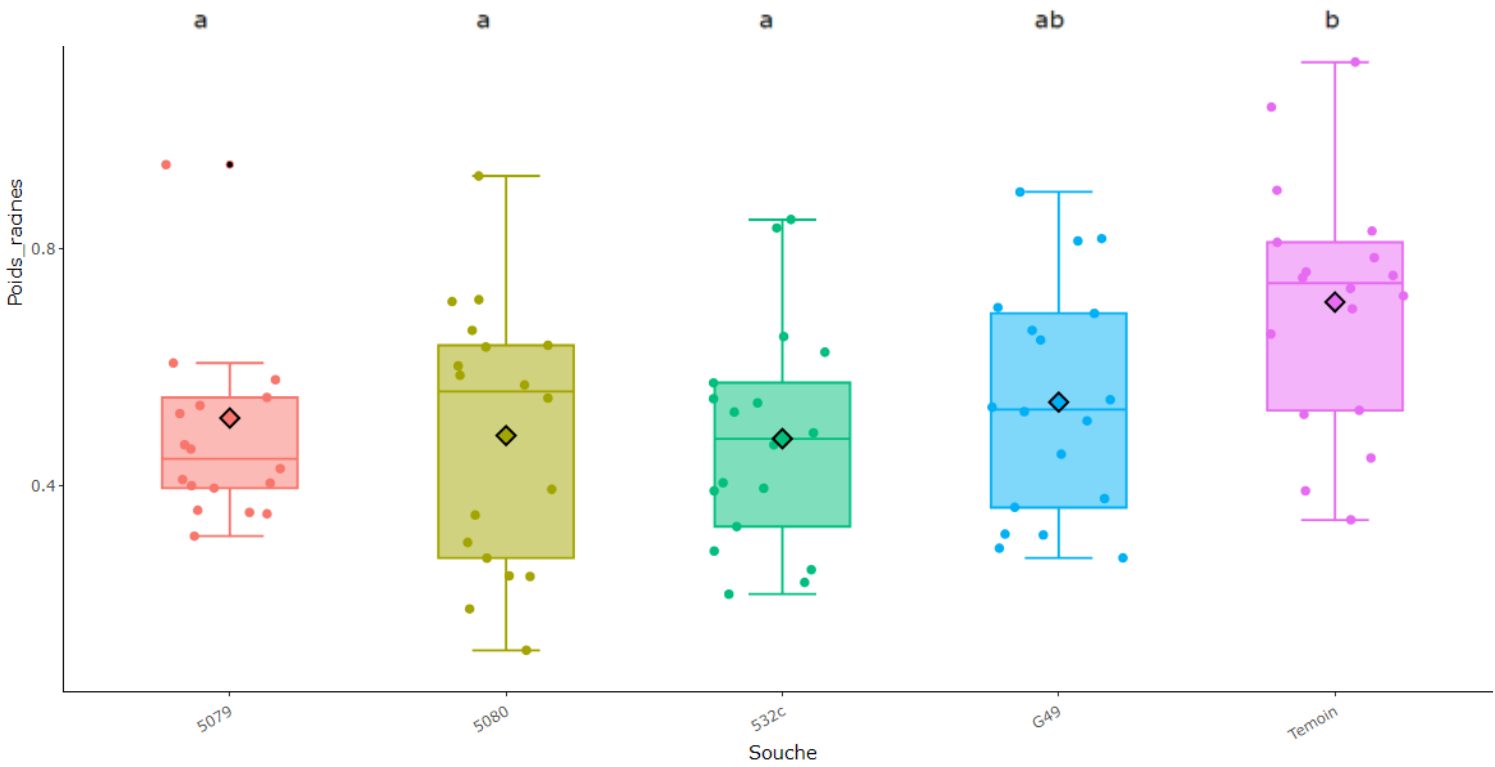


Figure 7:Biomasse racinaire en fonction des souches

La biomasse racinaire de la condition témoin est significativement supérieure à celle des plantes inoculées par SEMIA 5079, 5080 et 532c. Cela s'explique par le fait que la plante témoin a utilisé son énergie pour développer un système racinaire plus important tandis que les autres ont utilisé l'énergie pour développer des nodules.

Biomasse des parties aériennes :

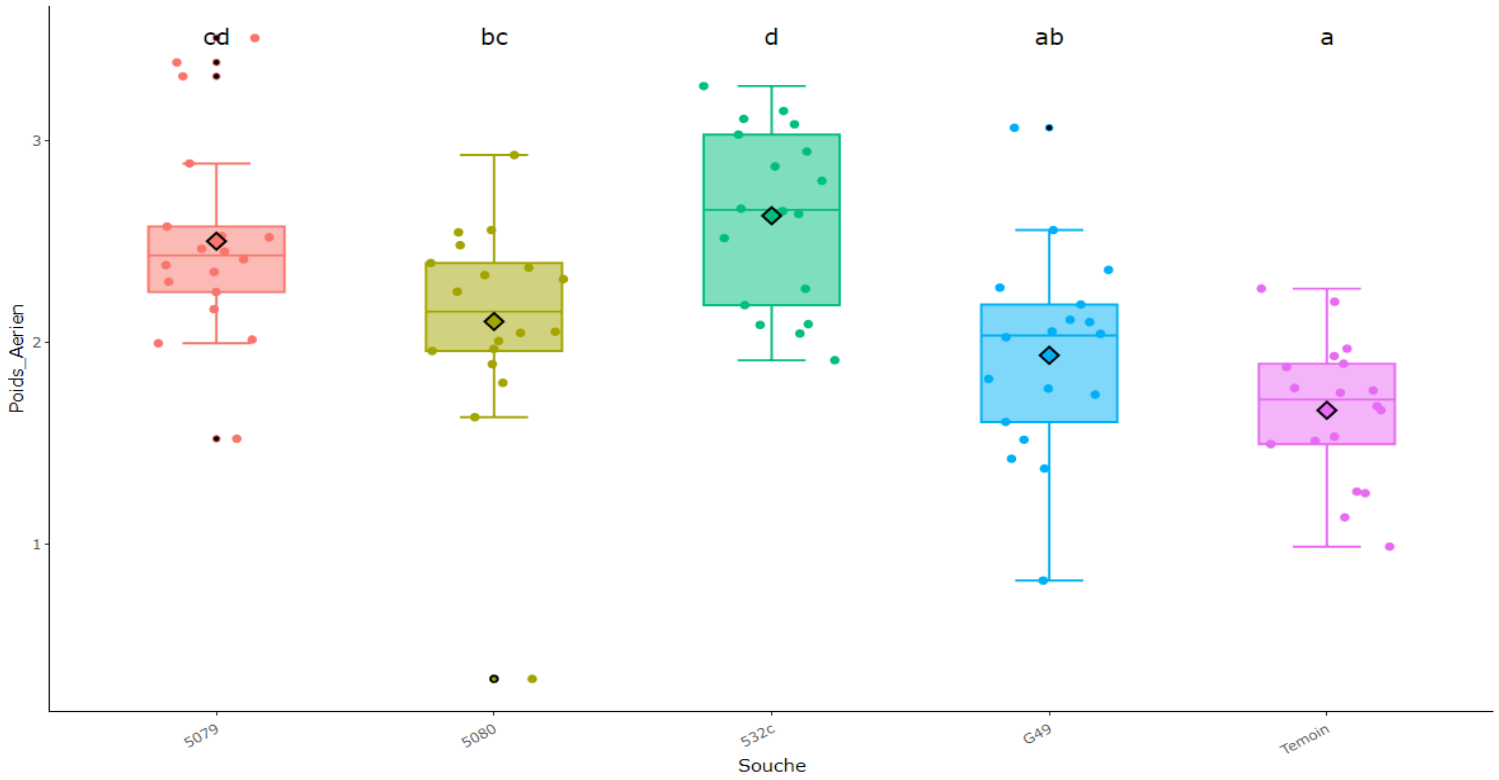


Figure 8: Biomasse aérienne en fonction des souches

Ici, le témoin montre une biomasse aérienne inférieure aux autres conditions. Les souches bactériennes SEMIA 5079, 5080 et 532c améliorent significativement la croissance des parties aériennes de la plante de soja. Les parties aériennes des plantes inoculées par 532c sont significativement supérieure à celles inoculées par G49 et SEMIA 5080. Les plantes inoculées par SEMIA 5079 montrent également un poids des parties aériennes significativement supérieur à celles inoculées par G49.

Nombre de nodules :

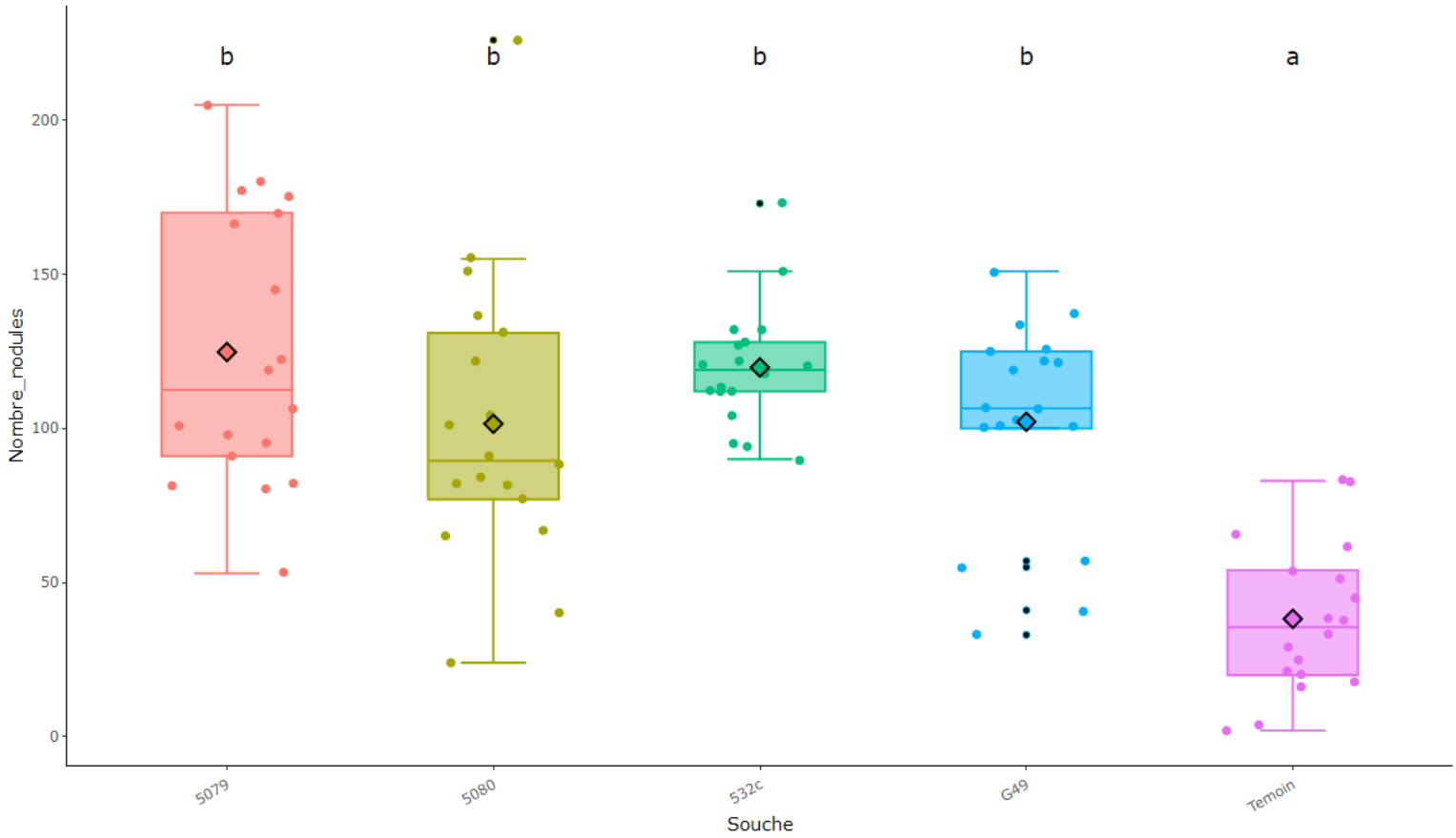


Figure 9: Nombre de nodules en fonction des souches

Le témoin montre un nombre de nodule significativement plus faible que les autres conditions. Les nodules retrouvés sur les Témoins sont principalement localisés sur la partie basse des racines et sont différents (plus gros et plus foncés) des nodules retrouvés sur les autres conditions. Cela nous laisse penser qu'il y a eu des contaminations extérieures dans la serre. Nous n'observons pas d'autres différences significatives entre les souches bactériennes. Néanmoins, comparée aux autres souches, la souche SEMIA 5080 semble impliquer un nombre de nodule inférieur.

Biomasse nodulaire :

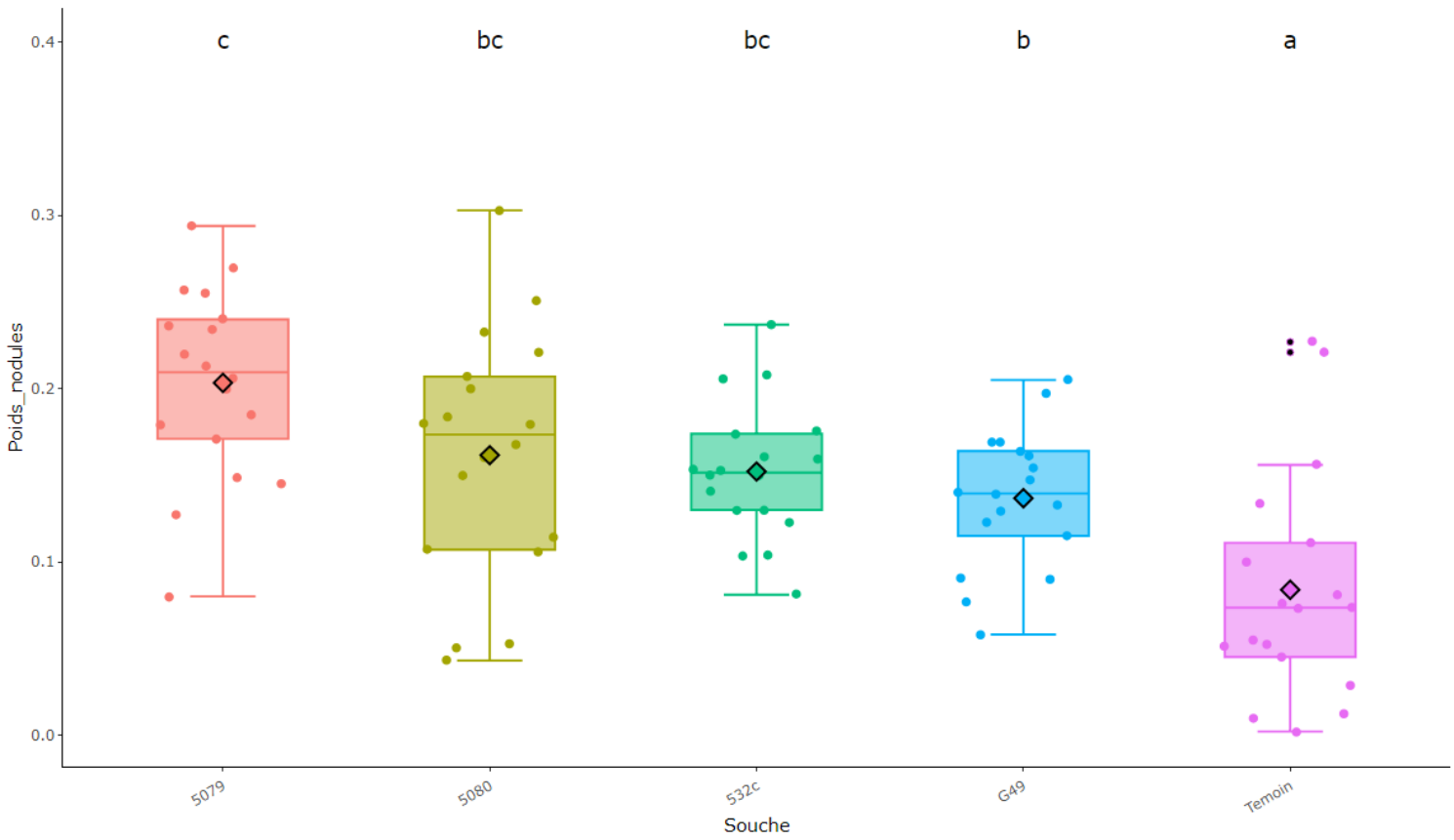


Figure 10: Biomasse nodulaire en fonction des souches

La biomasse nodulaire du témoin est significativement plus faible que toutes les autres conditions. De plus, les plantes inoculées par la souche SEMIA 5079 montre une biomasse nodulaire significativement plus élevée que la biomasse nodulaire des plantes inoculées par la souche G49.

Activité Réductrice d'acétylène (ARA) :

La CPG utilisée lors de l'expérience n'a donné aucun résultat reproductible et interprétable, elle a dû être changée. Ces analyses ne sont donc malheureusement pas exploitables

Conclusion sur l'efficacité des souches :

Après l'analyse des résultats de la première partie du projet, il a été mis en évidence que la souche bactérienne SEMIA 5079 semble être la plus efficace dans la croissance du soja. Celle –ci a montré des résultats significativement meilleurs concernant la biomasse aérienne et la biomasse nodulaire.

La souche bactérienne G49, semble au contraire induire le moins d'effet positif sur la croissance des plants de soja.

2- EVALUATION DE LA COMPETITIVITE DES SOUCHES

BOX PCR

Les profils des bactéries 532c, G49, SEMIA 5079 et 5080 réalisés en BOX PCR sont présentés ci-dessous :

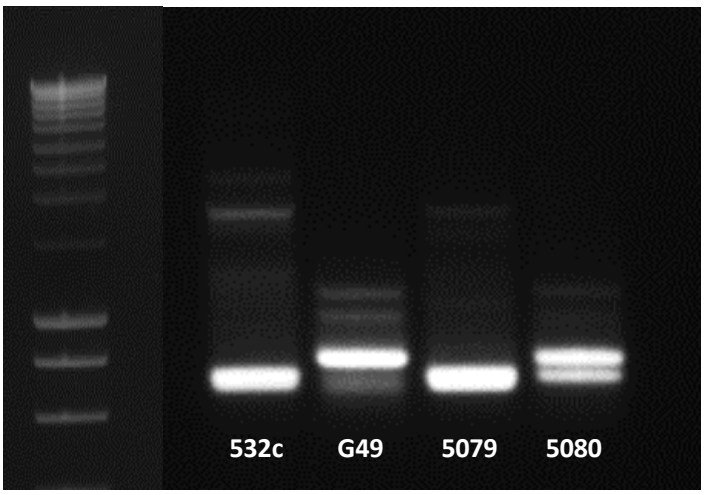


Figure 11: Profil des souches bactériennes en BOX PCR

Condition 1 : Plants Témoin non inoculés :

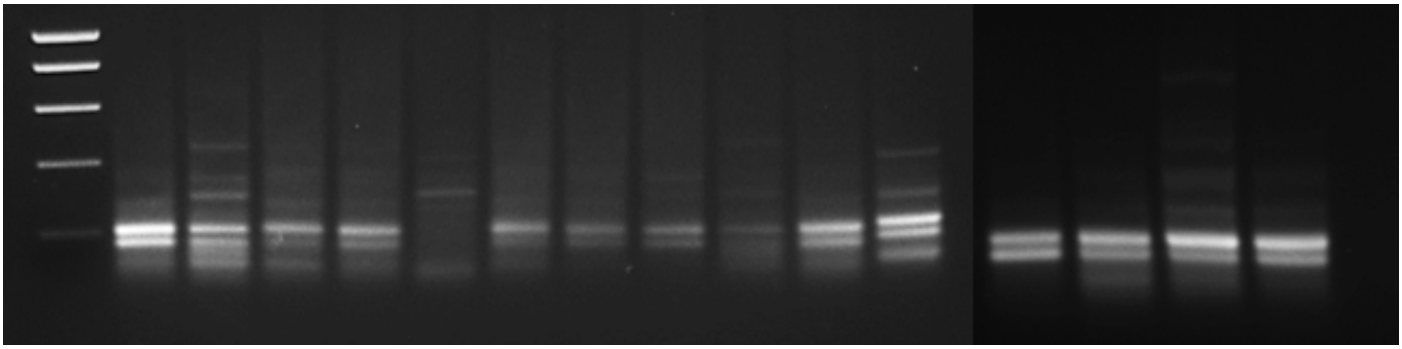


Figure 12: Profils des souches bactériennes issues des nodules des conditions Témoin

Les nodules récoltés sur les plants Témoins sont issus de contaminations. On retrouve notamment le profil de la souche bactérienne SEMIA 5080.

Condition 2 : plants inoculés avec la souche G49 :

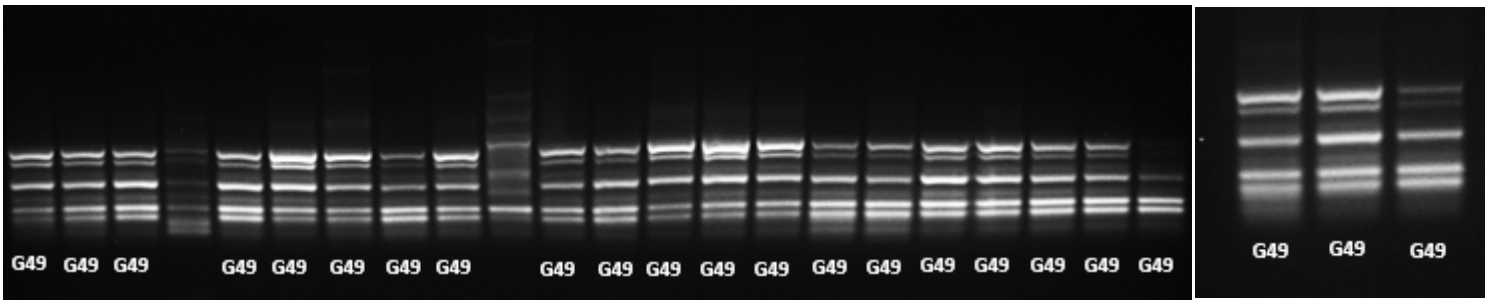


Figure 13: Profils des souches bactériennes issues des nodules des conditions inoculées avec la souche G49

On voit que 24 nodules sur 25 récoltés, soit 96% sont infectés par la souche G49.

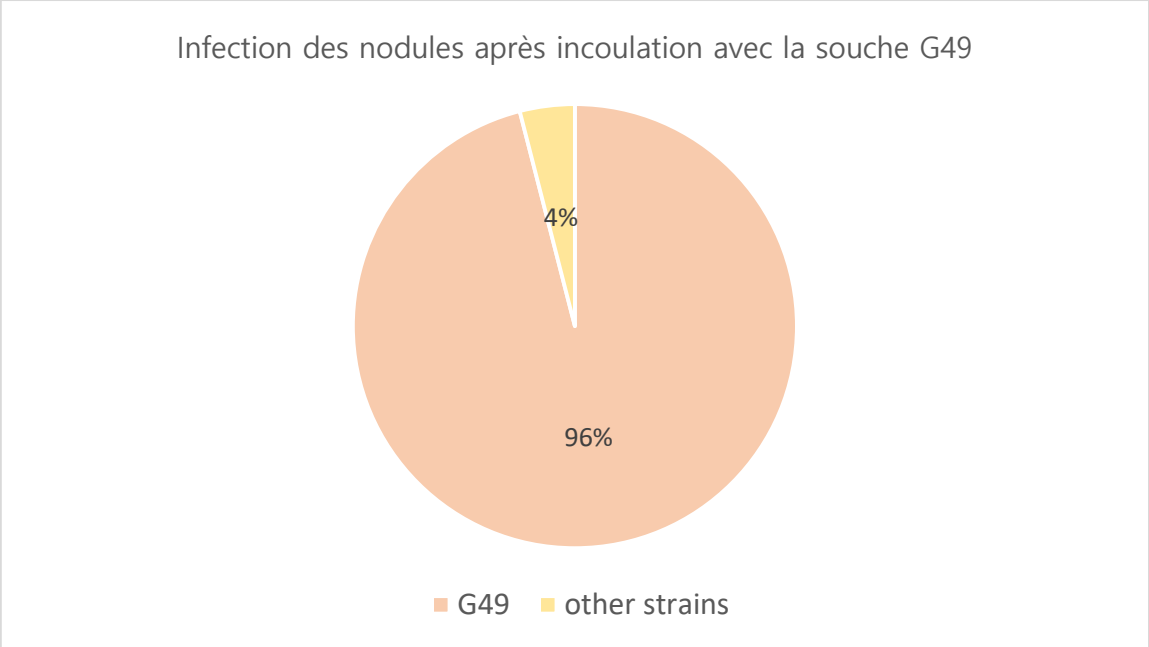


Figure 14: Pourcentage d'infection des nodules après inoculation avec la souche G49

Condition 3 : Plants inoculés avec la souche SEMIA 5079

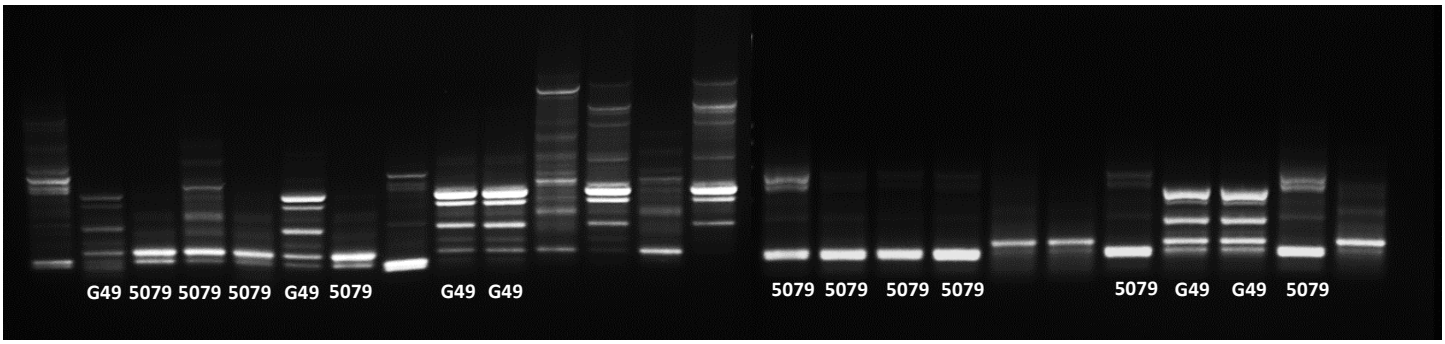


Figure 15: Profils des souches bactériennes issues des nodules des conditions inoculées avec la souche SEMIA 5079

Ici, 10 nodules sur 25 récoltés, soit 42% ont été infectés par la souche SEMIA 5079 initialement inoculée. On retrouve 24% de souche bactérienne G49 et 36% de souches que nous ne reconnaissons pas due à de potentielles contaminations en serre via les arrosages ou courants d'air.

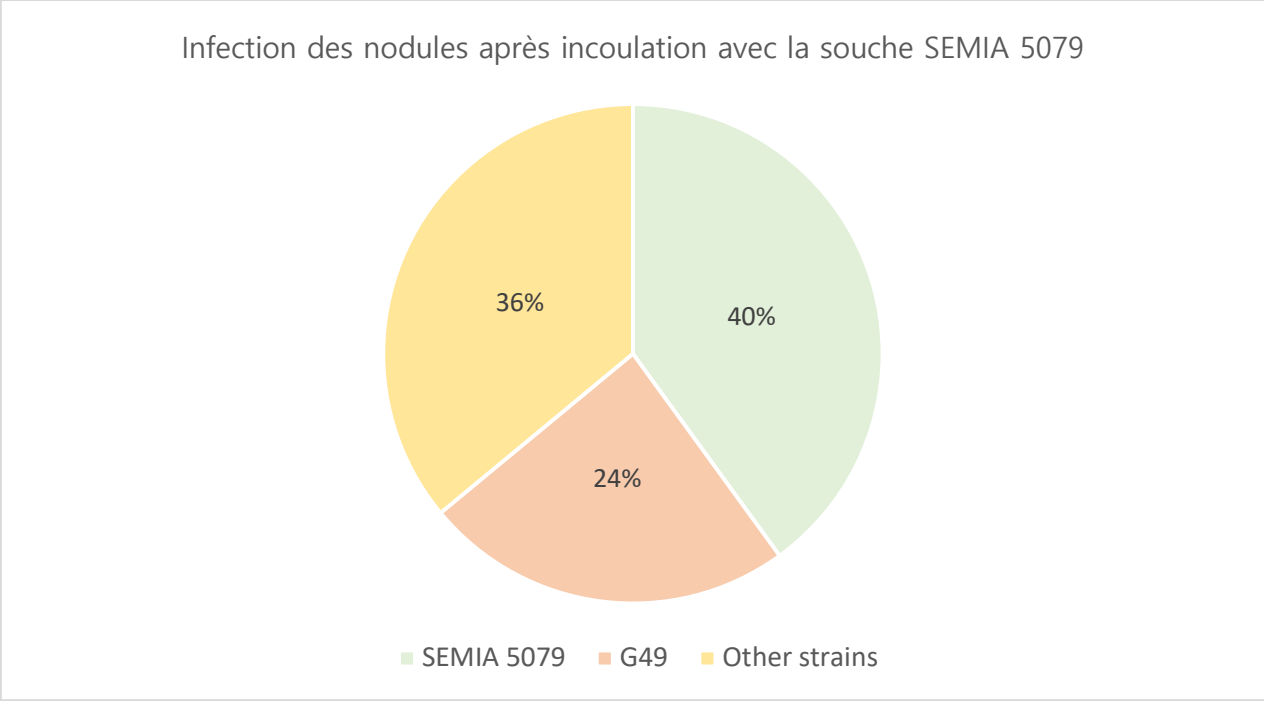


Figure 16: Pourcentage d'infection des nodules après inoculation avec la souche SEMIA 5079

Condition 4 : Plants co-inoculé avec les souches G49+5079

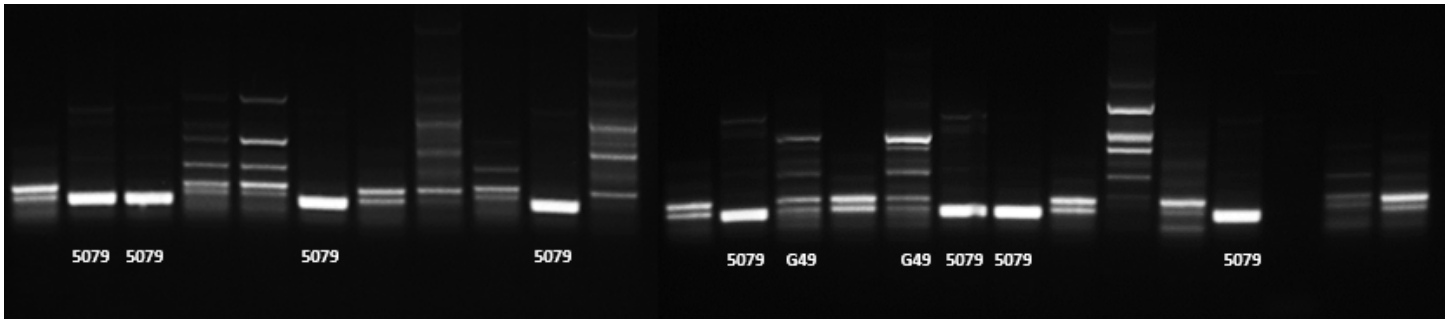


Figure 17:Profils des souches bactériennes issues des nodules des conditions inoculées avec les souches G49 et SEMIA 5079

33% des nodules sont infectés par la souche SEMIA 5079 et 8% par la souche G49. On retrouve 59% de souches bactériennes inconnues issues de potentielles contaminations.

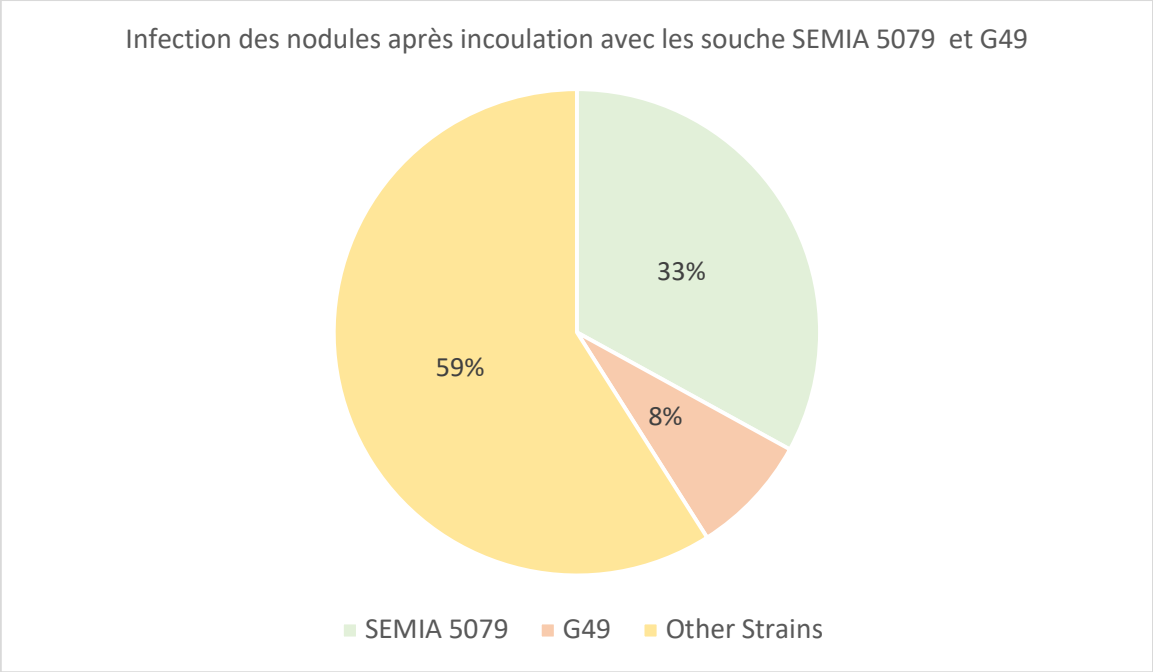


Figure 18: Pourcentage d'infection des nodules après inoculation avec les souches G49 et SEMIA 5079

En co-inoculation la souche bactérienne SEMIA 5079 semble plus compétitive que la souche G49. Toutefois, après plusieurs essais de Box PCR, il reste assez difficile de différencier les profils des différentes bactéries sur gel.

3- SIMILARITES DES SOUCHES

Les 4 souches utilisées dans ce projet sont 4 bradyrhizobiums très similaires. Pour le développement de la PCR digitale, nous avons dû séquencer l'ITS de ces bactéries dans le but de trouver des différences nucléotidiques (variations de la séquence du marqueur afin de définir des sondes spécifiques). Les résultats de ce séquençage nous indiquent que les séquences ITS des bactéries G49 et SEMIA 5080 sont identiques. Il nous est donc impossible de trouver des différences nucléotidiques entre les séquences ITS de ces deux bactéries. Il arrive en effet que certains bradyrhizobiums présentent une séquence ITS identique suggérant qu'il s'agit de souches très proches. Il est donc impossible via la PCR digitale de différencier les bactérie G49 et SEMIA 5080. Il faut donc prendre en compte que la sonde G49 reconnait ces deux bactéries, il ne sera donc pas possible d'interpréter les résultats de la co-inoculation G49+SEMIA 5080 par exemple.

4- EVALUATION DE LA COMPETITIVITE DES SOUCHES DANS UN SOL NATUREL

PCR Digitale

Pour identifier l'ADN cible amplifié (l'ADN de nos bactéries) nous avons utilisé des sondes fluorescentes. 4 sondes ont été fabriquées : Une sonde S5079 propre à la souche SEMIA 5079, une sonde S532c propre à la souche 532c, une sonde SG49 propre à la souche G49 et une sonde généraliste ciblant tous les bradyrhizobiums (quel que soit la souche) pour pouvoir évaluer la compétitivité de nos bactéries par rapport à la population bactérienne native du sol utilisé.

Pour s'assurer de la spécificité de ces dernières, chaque sonde est testée avec un témoin positif (ADN des bactéries étudiées extrait à partir de cultures) et 2 témoins négatifs (un T- correspondant a de la solution de réhydratation ADN et de l'eau) :

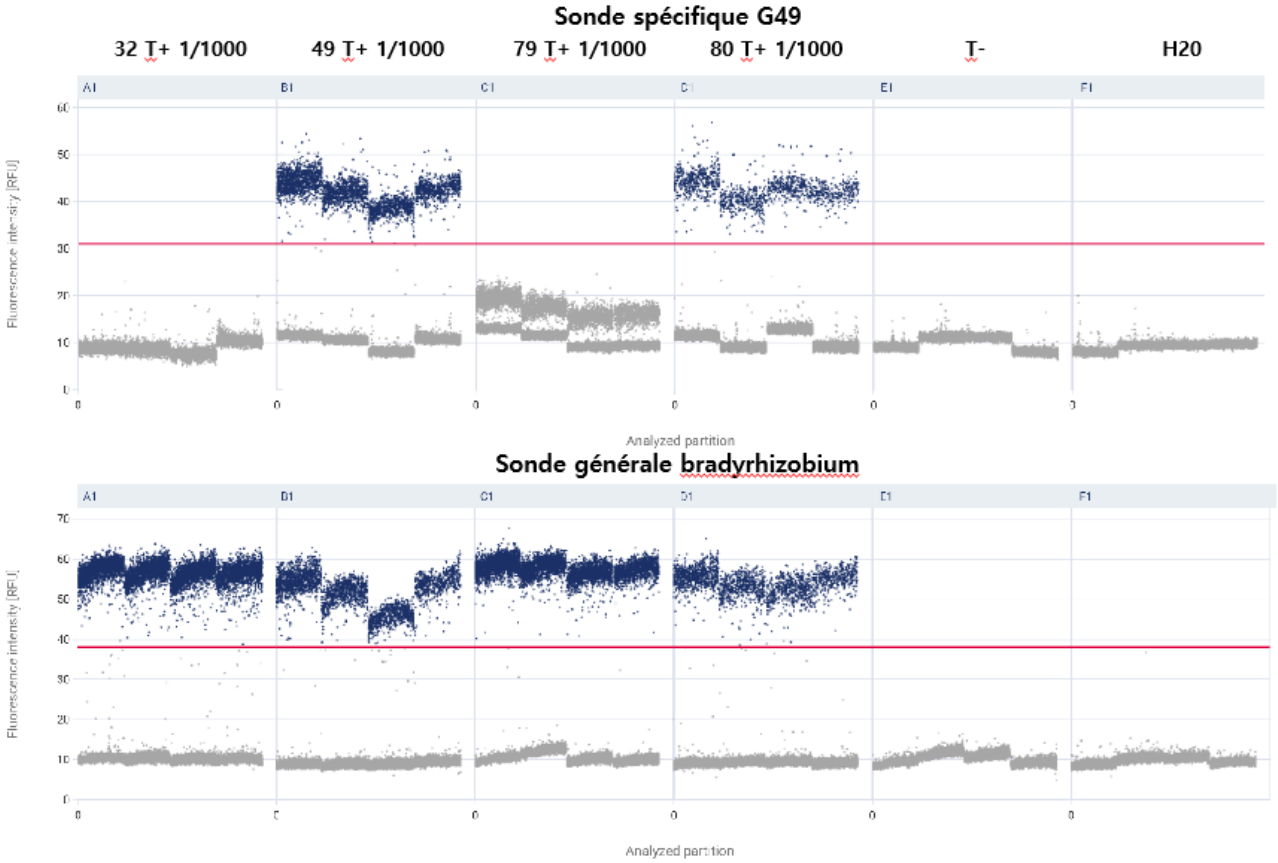


Figure 19: Résultats des DPCR sur la spécificité des sondes utilisées. les points bleus correspondent à des amplifications positives (supérieures au seuil de détection indiqué par une ligne rouge).

Les sondes S5079 et S532c sont bien spécifiques. La sonde SG49 n'est pas spécifique à la souche G49 car elle reconnait également la souche SEMIA 5080. La sonde ciblant tous les Bradyrhizobium reconnait bien nos 4 souches. Ces données montrent que pour la suite des expériences, il nous sera donc impossible de différencier les souches G49 et SEMIA 5080.

Cycle 1 :

La dPCR permet de quantifier le nombre de copies d'une cible donnée dans un échantillon complexe. Pour évaluer la compétitivité des souches, nous avons donc, à partir des échantillons de 20 nodules issus des différents traitements, calculé le nombre de copies pour:

- La souche SEMIA 5079
- Les souches G49 + SEMIA 5080 (même cible)
- La souche 532c
- Tous les bradyrhizobiums

De plus, afin d'estimer le nombre de copies issus de bradyrhizobiums indigènes (souches natives du sol utilisé) nous avons soustrait le nombre de copies obtenus pour tous les bradyrhizobiums (cible généraliste) à la somme des copies des souches inoculées.

Les deux histogrammes ci-dessous montrent le nombre de copies obtenues (Figure 20) et les proportions relatives (Figure 21) de SEMIA5079 (bleu), G49 + SEMIA5080 (gris), 532c (orange) et des souches natives calculées comme indiqué ci-dessus (jaune) dans les différents traitements.

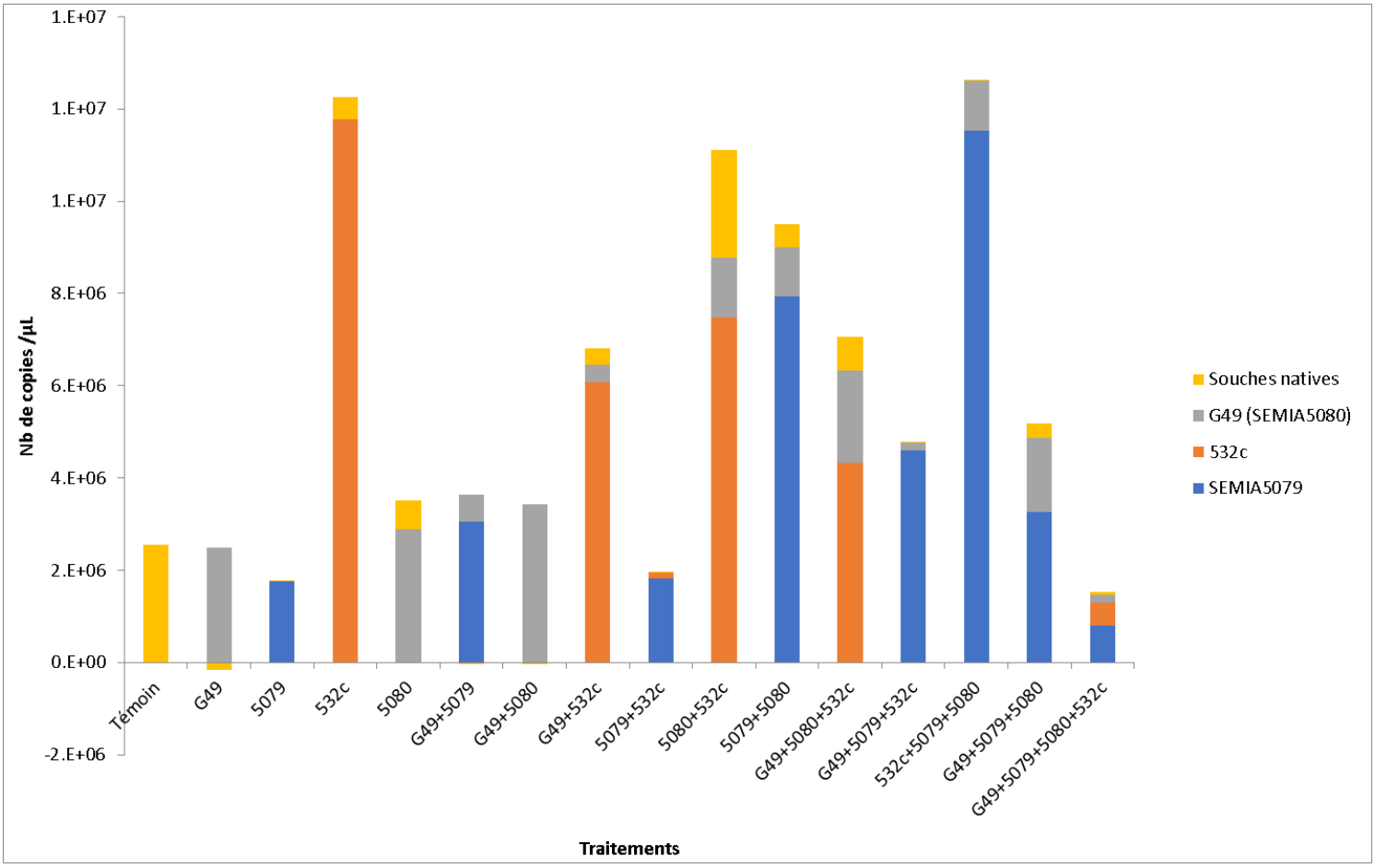


Figure 20:Histogramme empilé de l'occupation des nodules en fonction des différentes conditions d'inoculation du cycle 1

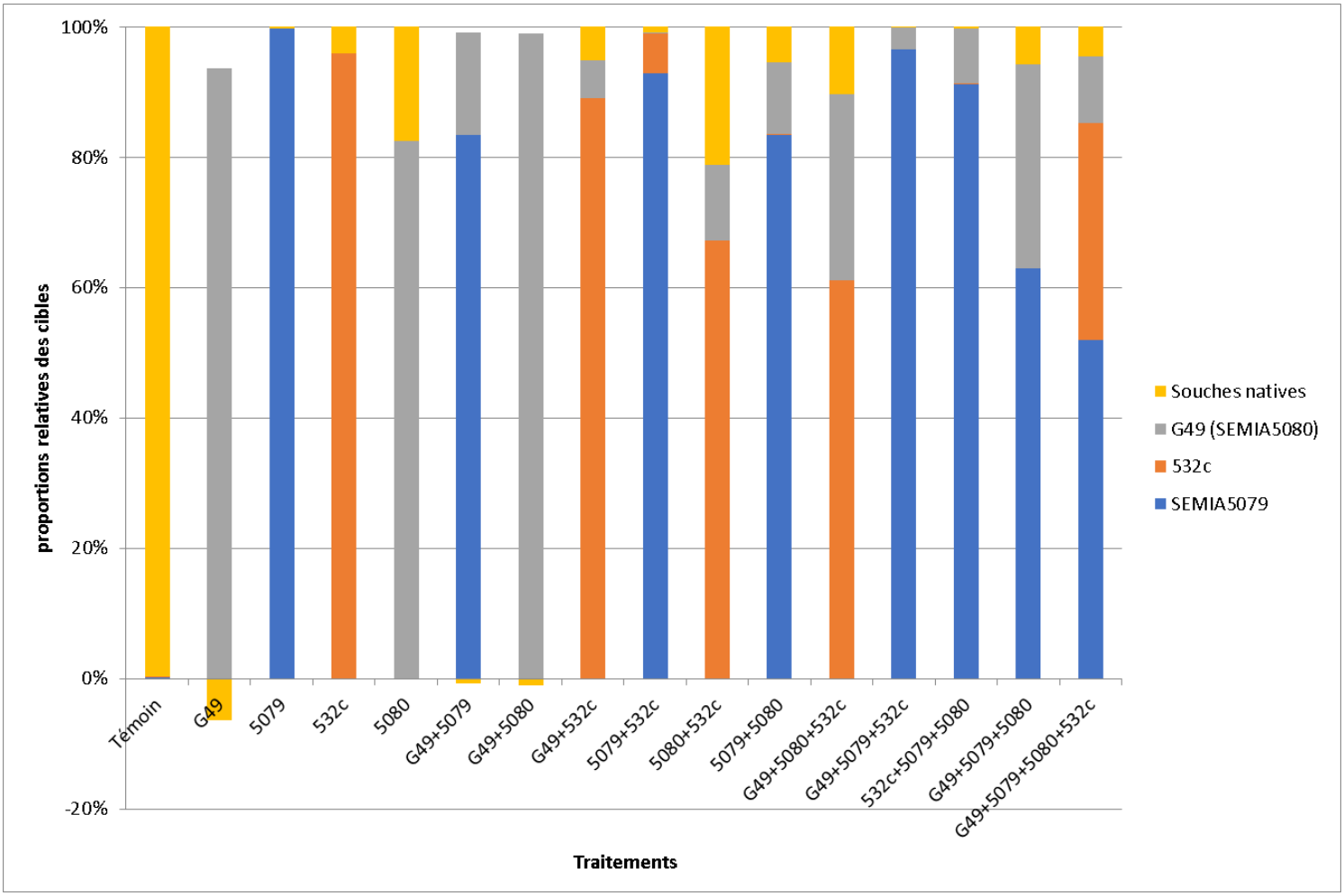


Figure 21: Histogramme empilé de l'occupation relative des nodules en fonction des différentes conditions d'inoculation du cycle 1

Les nodules du premier cycle de la condition Témoin présentent uniquement des copies d'ADN d'autres bradyrhizobiums que ceux inoculés, soit des souches natives initialement présentes dans le sol utilisé.

Dans les conditions de mono-inoculation de G49, 5079, 5080, 532c nous retrouvons bien les copies d'ADN des souches respectivement inoculées démontrant que le soja répond bien à l'inoculation de ces souches.

Les co-inoculations nous montrent que les souches SEMIA 5079 et 532c sont les souches les plus compétitives. En effet, lors des co-inoculations avec les souches G49 et/ou SEMIA5080, le nombre de copies d'ADN des souches 5079 ou 532c est largement majoritaire.

Par exemple, sur la co-inoculation G49+5080+532c, on retrouve 4.31×10^6 copies d'ADN de la souche 532c contre 2.01×10^6 copies des souches G49 et 5080 et 2.08×10^3 copies d'autres souches de Bradyrhizobium. La souche 532c est dans cette co-inoculation la plus compétitive.

En co-inoculation avec les souches SEMIA 5079+SEMIA 5080+G49 on retrouve en grande majorité des copies d'ADN de la souche SEMIA 5079 ($3.25x10^6$ copie de SEMIA 5079 contre $1.62x10^6$ pour le total des autres souches inoculées).

Lors des co-inoculations impliquant les souches SEMIA 5079 et 532c, soit les souches les plus compétitives, on note que la souche SEMIA 5079 prend largement le dessus, avec un nombre de copies bien plus important.

Lors de la co-inoculation SEMIA 5079+532c on retrouve $1.83x10^6$ copies d'ADN de la souche SEMIA 5079 contre $1.23x10^5$ copies d'ADN de la souche 532c.

Pour résumer, dans cette première expérience en sol, on peut donc en conclure que la souche la plus compétitive est la souche SEMIA5079. Cependant, si cette souche n'est pas inoculée alors c'est la souche 532c la plus compétitive, les deux souches G49 et SEMIA5080 étant les moins compétitives.

Afin d'évaluer la persistance des souches dans les sols ayant reçu les bradyrhizobiums et d'estimer leur capacité à renoduler, un deuxième cycle de culture a été effectué sur les mêmes sols contenant les systèmes racinaires.

Cycle 2 :

Les deux histogrammes ci-dessous montrent le nombre de copies obtenues (Figure 22) et les proportions relatives (Figure23) de SEMIA5079 (bleu), G49 + SEMIA5080 (gris), 532c (orange) et des souches natives calculées comme indiqué ci-dessus (jaune) dans les différents traitements.

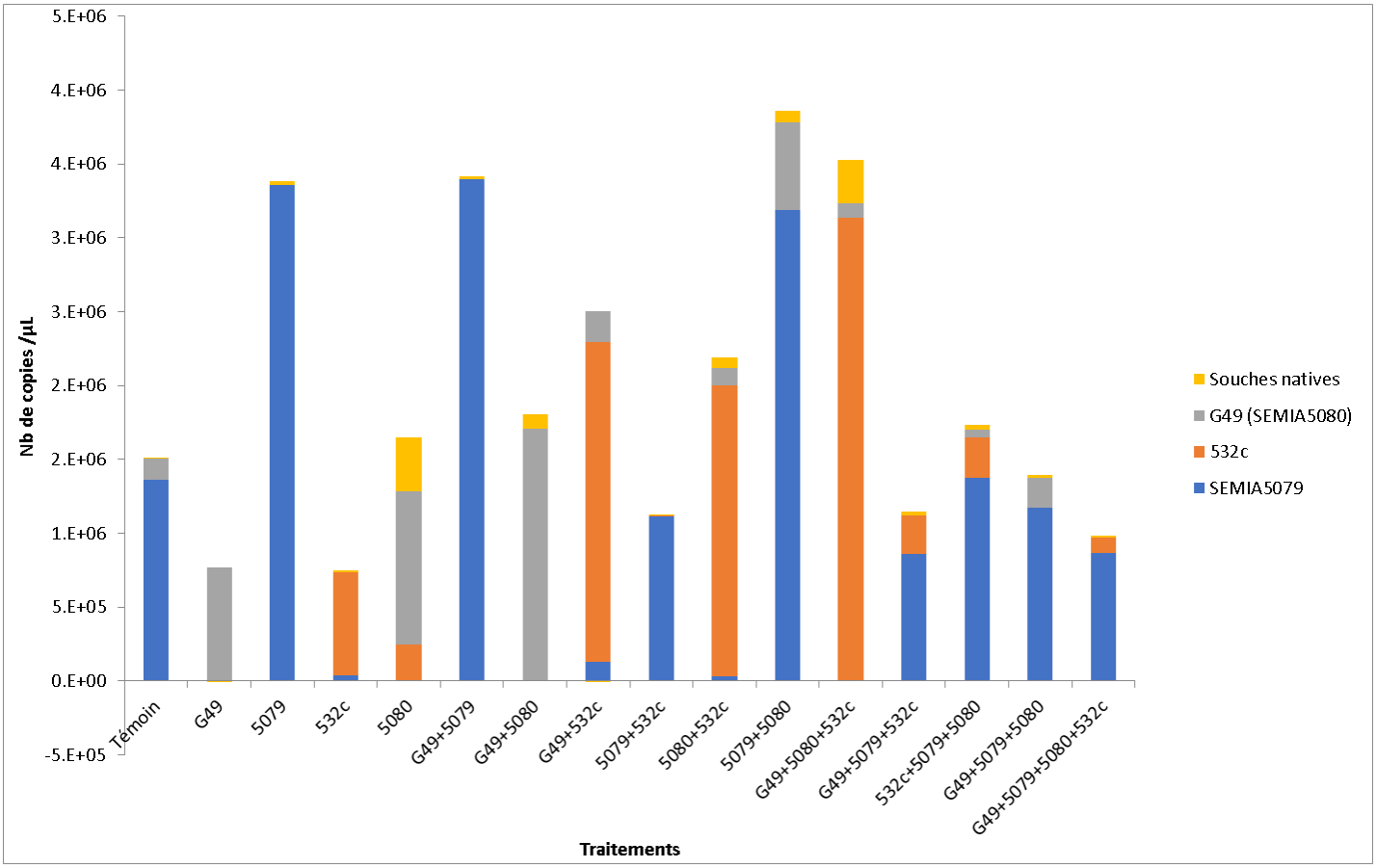


Figure 22: Histogramme empilé de l'occupation des nodules en fonction des différentes conditions d'inoculation du cycle 2

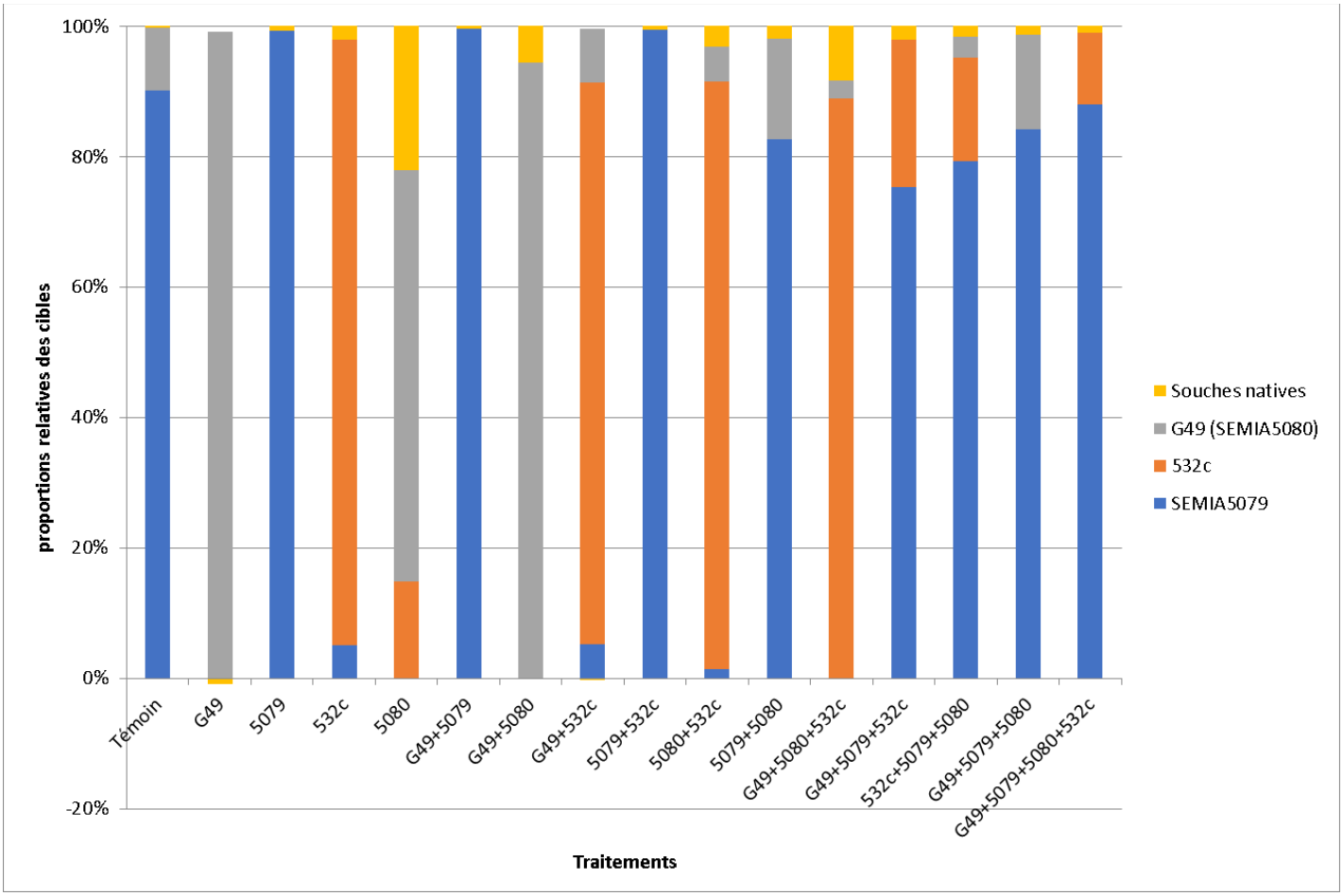


Figure 23:Histogramme empilé de l'occupation relative des nodules en fonction des différentes conditions d'inoculation du cycle 2

Ici, les nodules de la condition Témoin ont été infectés par la souche SEMIA 5079. Nous avons sans doute fait face à des contaminations lors de la mise en place du second cycle. La souche SEMIA 5079 étant la plus compétitive et invasive, elle est retrouvée en majorité dans le témoin.

Quantitativement on retrouve en moyenne entre 2 et 4 fois moins de copies d'ADN par rapport au cycle 1 : 2.06 fois moins de copies pour la souche SEMIA 5079, 3.4 fois moins pour la souche 532c, et 3.5 fois mois pour les souches G49/SEMIA5080. La souche SEMIA 5079 semble également être la plus persistante au cours des cycles. Cependant, la quantification par PCR digitale étant directement corrélée à la quantité de matériel initial, il faudrait extraire la totalité des nodules pour avoir une estimation du nombre total de chaque cible par plante et utiliser pour les PCR des quantités identiques. Ici, l'objectif étant de caractériser la compétitivité des souches, nous avons travaillé sur une vingtaine de nodules et pouvons utiliser les histogrammes montrant les proportions relatives des souches pour chaque traitement.

Il est intéressant de noter que le reste des résultats suit la même tendance que lors du cycle 1. Les souches SEMIA 5079 et 532c sont les plus compétitives en co-inculation face aux souches G49 ou SEMIA 5080. Ces résultats mettent en en avant le caractère compétitif de la souche SEMIA 5079, la souche 532c étant quant à elle plus compétitive que les souches SEMIA 5080 et G49.

Les résultats du cycle 2 montrent que l'utilisation des sols contenant les racines et les nodules d'une culture précédente entraine la nodulation de plants de soja planté a postériori. Les souches du premier cycle sont majoritairement retrouvées dans les nodules des plantes du deuxième cycle et ce dans des proportions similaires. L'histogramme ci-dessous montre les résultats combinés des proportions relatives obtenues en cycle 1 (C1) et cycle 2 (C2) pour tous les traitements. On voit que mis à part le témoin qui a été contaminé par la souche la plus compétitive (SEMIA 5079), les proportions relatives des autres souches sont plutôt bien conservées entre les cycles 1 et 2.

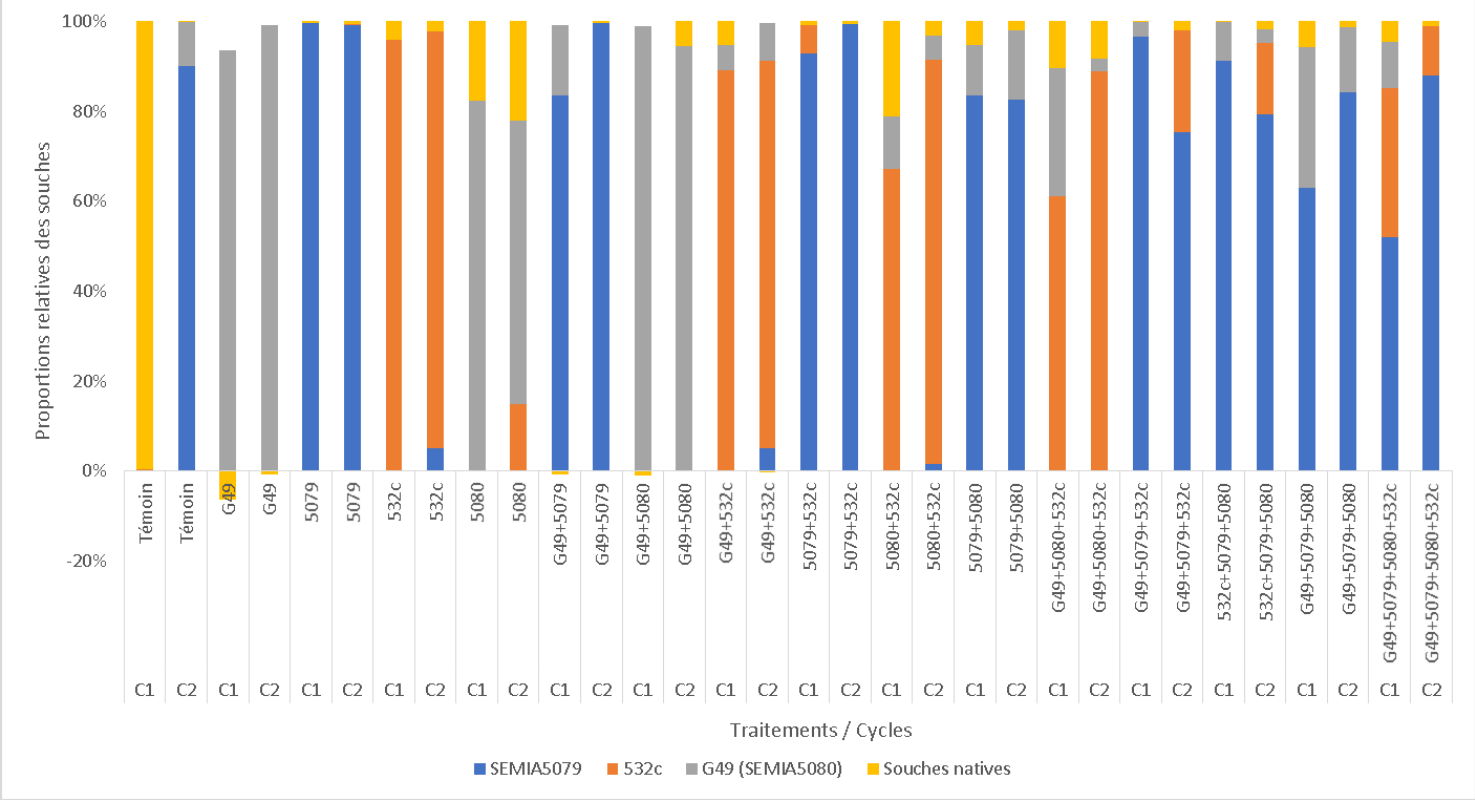


Figure 24: Comparaison des proportions relatives des souches des cycles 1 (C1) et 2 (C2)

CONCLUSION

Nous avons vu en première partie d'expérience, que la souche SEMIA 5079 était la plus efficace sur la croissance des différentes variétés de soja et qu'a l'inverse la souche G49 induisait des résultats moindres en termes d'efficacité. En plus d'être la souche la plus efficace, les expériences sur la compétitivité mènent à conclure que la souche SEMIA 5079 est la souche la plus compétitive sur un sol désinfecté et sur un sol naturel. Il est également important de noter qu'en absence de SEMIA 5079, la souche 532c se montre à son tour très compétitive lors la nodulation de plants de soja.

En conclusion, la souche SEMIA 5079 présente les propriétés recherchées pour concevoir un inoculant performant à savoir un effet significatif sur le développement de la plante hôte et une compétitivité avérée par rapport aux autres souches testées et aux rhizobia contaminants ou natifs du sol de culture utilisé. Il n'y a pas, dans le cadre de cette expérience, d'éléments permettant de craindre une éventuelle invasibilité de la souche SEMIA 5079 sachant que lors du 2ème cycle de culture, cette souche a tendance à être moins représentée sur les systèmes racinaires du soja témoignant d'un comportement habituel dans ce type d'inoculant microbien.

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Droite de régression linéaire de la souche SEMIA 5079 7
Figure 2: Droite de régression linéaire de la souche G49..... 7
Figure 3: Droite de régression linéaire de la souche 532c 8
Figure 4: Droite de régression linéaire de la souche SEMIA 5080 8
Figure 5: Photos des systèmes racinaires.....10
Figure 6:Taux de chlorophylle en fonction des souches 11
Figure 7:Biomasse racinaire en fonction des souches 12
Figure 8: Biomasse aérienne en fonction des souches 13
Figure 9: Nombre de nodules en fonction des souches.....14
Figure 10: Biomasse nodulaire en fonction des souches 15
Figure 11: Profil des souches bactériennes en BOX PCR.....16
Figure 12: Profils des souches bactériennes issues des nodules des conditions Témoin 16
Figure 13: Profils des souches bactériennes issues des nodules des conditions inoculées avec la souche G49.....16
Figure 14: Pourcentage d'infection des nodules après inoculation avec la souche G49 17
Figure 15: Profils des souches bactériennes issues des nodules des conditions inoculées avec la souche SEMIA 5079 17
Figure 16: Pourcentage d'infection des nodules après inoculation avec la souche SEMIA 5079.....18
Figure 17:Profils des souches bactériennes issues des nodules des conditions inoculées avec les souches G49 et SEMIA 5079.....18
Figure 18: Pourcentage d'infection des nodules après inoculation avec les souches G49 et SEMIA 5079.....19
Figure 19: Résultats des DPCR sur la spécificité des sondes utilisées. les points bleus correspondent à des amplifications positives (supérieures au seuil de détection indiqué par une ligne rouge).....21
Figure 20:Histogramme empilé de l'occupation des nodules en fonction des différentes conditions d'inoculation du cycle 1.....22
Figure 21: Histogramme empilé de l'occupation relative des nodules en fonction des différentes conditions d'inoculation du cycle 1.....23
Figure 22: Histogramme empilé de l'occupation des nodules en fonction des différentes conditions d'inoculation du cycle 2.....25
Figure 23:Histogramme empilé de l'occupation relative des nodules en fonction des différentes conditions d'inoculation du cycle 2.....25
Figure 24: Comparaison des proportions relatives des souches des cycles 1 (C1) et 2 (C2).....27