

Isolement des souches de *Rhizobiaceae* colonisant le mikwati (*Erythrophleum africanum* Afzel.) plante à chenilles (*Cirina forda*), et croissance en longueur de plantules issues de boutures caulinaires et de graines

Pululu Basunga Herman¹, Umba di M'balu Joachim², Metena Mambote Marlène², Telamanu Edouard Bafwanga²

1. Faculté des Sciences Agronomiques et Vétérinaires, de l'Université Loyola du Congo, (ULC) B.P. 3724 Kinsbasa-Gombe

2 Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université Pédagogique Nationale, (UPN) B.P.8815 Kinsbasa-Ngaliema

Auteur Correspondance email : joachimumba@yahoo.fr

Mots clés : Biostimulant, *Caesalpinaceae*, *Cirina forda*, *Erythrophleum africanum*, moleibiol et *Rhizobium*.

Key words: Biostimulant, *Caesalpinaceae*, *Cirina forda*, *Erythrophleum africanum*, moleibiol and *Rhizobium*,

Publication date 31/03/2020, <http://m.elewa.org/Journals/about-japs/>

1 RESUME

Erythrophleum africanum est une *Caesalpinaceae* hébergeant la chenille *Cirina forda*, malheureusement cette espèce surexploitée pour ces multiples usages est en voie d'extinction. Sa disparition s'accompagne de réduction de la production de chenilles, source importante de protéines animales. La première préoccupation est d'isoler les souches bactériennes colonisant *Erythrophleum africanum* pour mener l'étude leur spécificité en les inoculant sur d'autres *Caesalpinaceae*, qui sont *Senna alata* et *Senna occidentalis*. L'action de moleibiol, biostimulant améliorant la croissance. La deuxième est de tenter l'amélioration de la croissance d'*Erythrophleum africanum* par la multiplication générative et végétative d'une part, et d'autre part par le traitement de biostimulant. Les résultats obtenus illustrent que la multiplication végétative par bouturage est médiocre, en effet aucun bourgeonnement n'a été observé. La pulvérisation de biostimulant moleibiol à faible dose accélère la croissance en longueur de plantules issues de la reproduction générative. Les souches hébergeant *Senna alata* et *Senna occidentalis* ne colonisent les racines d'*Erythrophleum africanum*, confirmant la spécificité des espèces de *Rhizobium* vis-à-vis des différentes légumineuses.

ABSTRACT

Erythrophleum africanum is a *Caesalpinaceae* harbouring the caterpillar *Cirina forda* ; unfortunately, this over-exploited species for these multiple uses is in the process of extinction. Its disappearance is accompanied by a reduction in the production of caterpillars, a major source of animal protein. The first concern is to isolate the bacterial strains colonizing *Erythrophleum africanum* to carry out the study their specificity by inoculating them on other *Caesalpinaceae*, which are *Senna alata* and *Senna occidentalis*. The action of moleibiol, biostimulant-improving growth.

The second is to try to improve the growth of *Erythrophleum africanum* by the generative and vegetative multiplication on the one hand and on the other hand by the biostimulant treatment. The results obtained illustrate that the vegetative propagation by cuttings is mediocre, indeed no budding has been observed. The low-dose biostimulant moleibiol

spray accelerates the growth of seedling length from generative reproduction. The strains harbouring and *Senna occidentalis* do not colonize the roots of *Erythrophleum africanum*, confirming the specificity of Rhizobium species with respect to different legumes.

2 INTRODUCTION

L'alimentation humaine dans le monde pose problème surtout dans les pays en développement. La solution réside dans l'augmentation des rendements de la production animale et végétale d'une part, et d'autre part la diversification de sources de protéines animales, une de causes de la malnutrition dans les pays subsahariens dont fait partie la République Démocratique du Congo. Comparé à l'immense diversité de la faune sauvage du pays, on peut se permettre de dire que l'élevage ne concerne que très peu d'espèces locales, en effet les animaux domestiques exploités viennent d'autres pays ou continents. La R.D.Congo n'a pas encore instauré dans ses divers axes de recherche en agro-alimentaire la domestication et l'élevage des insectes, pourtant une fraction importante de sa population est entomophage, pour laquelle les chenilles constituent la principale source des protéines animales. La consommation journalière des chenilles peut couvrir les besoins de l'homme en protéines en raison de sa teneur élevée (Mbemba, 2013). Les insectes dont font partie les chenilles comestibles sont pointées comme la source principale des protéines animales de l'alimentation humaine dans un prochain avenir. La production de la viande d'élevage de volailles et de mammifères est plus onéreuse en termes d'alimentation que celui de chenilles

dont l'unique aliment est la feuille. Les protéines animales d'origine entomologique constituent une alternative pour nourrir le monde à l'horizon 2050. Parmi les insectes comestibles vendus à Kinshasa les mikwati chenilles (*Cirina forda*) détiennent la grande part du marché. La pérennisation de ces chenilles sur le marché passe par la première marche qui est la domestication des plantes hôtes dont *Erythrophleum africanum*, et la deuxième est le lancement de l'entomoculture. Cette plante nourricière de prédilection est en voie d'extinction, car très exploitée pour ses usages multiples, ayant pour conséquence la réduction de la présence de *Cirina Ford* dans le commerce. En plus les ramasseurs des chenilles récoltent tout ce qui se présente à leur passage, sans le moindre souci de laisser quelques-unes pour la reproduction. Ce travail s'attèle à la multiplication générative et végétative d'*Erythrophleum africanum*, l'isolement et la bactérisation racinaire pour juger l'apport de l'association *Rhizobium* et légumineuse sur la croissance des plantules. En termes de diversification des stratégies d'amélioration de croissance, le biostimulant à base d'extraits végétaux qui ont déjà fait leurs preuves sur les plantes cultivées, a été intégré dans cette étude comme palliatif pour accélérer la croissance en longueur de la plante au stade juvénile.



Figure 1 : *Cirina forda* (Ngangu, 2014)



Figure 2 : *Erythrophleum africanum* (Pululu et al, sous presse)

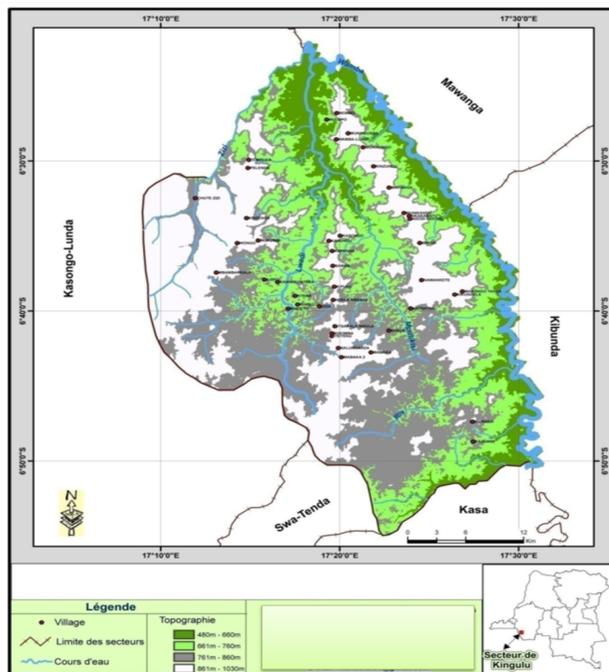
3 MATERIEL

3.1 Matériel végétal

3.1.1 Semences : Les semences d'*Erythrophleum africanum* ont été récoltées à Pelende, dans le territoire de Kasongo-Lunda, secteur de Kingulu, province du Kwango. Le

territoire de Kasongo-Lunda dont le chef-lieu est Kasongo-Lunda a une superficie de 26.648 km² avec une population estimée à 1.640.430 habitants (CAID, 2019).

Carte du secteur de Kingulu dans Kasongo-lunda



SOURCE MASINA, 2015

Erythrophleum africanum est une espèce présente dans la majeure partie de l'Afrique tropicale,

depuis le Sénégal jusqu'en Afrique du Sud en passant par la R.D.Congo. Ce genre est l'un des

rare parmi les *Caesalpinaceae* chez lesquels on ait trouvé des alcaloïdes (Arbonnier, 2009). L'extrait aqueux chaud de racines pilées est ingéré pour déclencher des vomissements après un empoisonnement (Von Koenig, 2001). Une pâte d'écorce de racines est appliquée sur la peau pour traiter la gale. L'écorce a été utilisée comme poison d'épreuve en Tanzanie, au Malawi et au Zimbabwe (Neuwinger, 1996). Le bois d'œuvre d'*Erythrophleum africanum* (Burkill, 1995) est commercialisé sous le nom commercial de "missanda". Il est utilisé dans les constructions lourdes et légères et pour confectionner des meubles, des poteaux, des piquets. (Missouri Botanical Garden. <<http://www.tropicos.org/Name>, Tropicos.org, consulté le 28 Juin 2015).

3.1.2. Plantules : Les plantules utilisées pour le test sont issues de semis, à raison de deux graines par sachets en polyéthylène contenant du terreau. Ces plantules ont servi à l'étude de la spécificité de bactéries fixatrices à *Erythrophleum africanum* et à l'action de molebiol le biostimulant.

3.1.3 Boutures : Les boutures récoltées à Mongata (plateau de Batéké, commune de Maluku) ont été exploitées en vue de diversifier les modes de reproduction. La capacité de régénération par voie végétative plusieurs avantages dont sa croissance rapide et sa bonne formation de cime.

3.2 Sol à *Erythrophleum africanum* : Le sol à *Erythrophleum africanum* a été ramassé comme les boutures à Mongata. Il a été conservé dans les conditions humides et aérées pour permettre la survie des bactéries.

3.3 Le sable du fleuve : Le sable rejeté par les eaux du fleuve Congo pauvre en nutriments et microorganismes, a servi comme support des races de *Rhizobium* provenant d'autres espèces de *Caesalpinaceae*.

3.4 Sol sablonneux : Le sablonneux a été ramassé dans l'exploitation agricole JUDICAEL, située au village BINSU dans le territoire de Kasangulu, province du Kongo Central. L'échantillon a été conservé dans des bonnes conditions d'aération et d'humidité

pour permettre la survie des bactéries fixatrices d'azote.

3.5 Récolte des nodules de différentes *Caesalpinaceae* : En vue d'amorcer une étude sur la compatibilité ou l'incompatibilité entre les différentes souches bactériennes fixatrices d'azote et les genres de *Caesalpinaceae*, les nodules portés par les systèmes racinaires ont été récoltés. En effet il existe souvent une spécificité des races de bactéries fixatrices d'azote même à l'intérieur d'une même famille. L'intérêt de cette collecte des nodules de systèmes racinaires d'autres genres que celui de *Caesalpinaceae*, est d'étudier le comportement de ces souches de *Rhizobium* vis-à-vis d'*Erythrophleum africanum*.

3.6 Milieux de culture : La bonne croissance et la survie de bactéries pour une culture pure de bactéries fixatrices d'azote libre sont obtenues dans un milieu stérilisé, dans lequel l'ensemencement se fait dans les conditions aseptiques. Pour l'isolement des bactéries fixatrices d'azote, trois milieux de culture ont été utilisés, il s'agit de l'agar agar pour la bactériologie, le milieu de Simmons et Sabaroud.

3.7 Souches de *Rhizobium* : Les souches indigènes de *Rhizobium* appartiennent au domaine Bactérie (*Eubacteria*), règne *Proteobacteria*, Section α *Proteobacteria*, famille de *Rhizobiaceae*. Ces sont des bactéries gram négatives aérobies vivant à l'état libre dans le sol ou en symbiose avec les racines ou les tiges avec lesquelles elles forment des nodules (Lepoivre, 2003). Dans régions tropicales, l'enrichissement en azote par les légumineuses est supérieure à celle observée dans les zones tempérées (Vilain, 1997 ; Wikipedia, the free encyclopedia, consulté le 15 juin 2015). Les souches de *Rhizobium* vivent dans le pH maximum oscillant entre 7,1 et 8, et minimum variant entre 4,8 et 6,4. Le genre *Rhizobium japonicum* peut supporter de pH bas entre 4,0 et 3,5 (Mangenot et al., 1970), Dans l'avenir la transformation de plantes en fixateur d'azote atmosphérique sera une des applications des biotechnologies végétales (Pululu, 2015)

3.8 Moleibiol : Le moleibiol est un biostimulant à base d'extrait végétal, mis au point par le laboratoire de biologie de l'Institut Supérieur Pédagogique (ISP) /Gombe. Ce produit améliore la croissance et le rendement

de plantes. Il est appliqué à faible dose de l'ordre de g par ha. Le traitement se fait par pulvérisation à la dose de 5 litres de produit commercial par hectare.

4 METHODES

4.1 Préparation des milieux de culture : Après être pesés, les milieux ont été mélangés à l'eau distillée, ensuite portés à l'ébullition pour leur homogénéisation. Enfin ils ont été stérilisés

à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes. Les quantités utilisées des différents milieux de culture et de l'eau distillée sont consignées dans le tableau 1.

Tableau 1 : milieux de culture utilisés et quantité d'eau distillée

Milieux	Quantité	
	de milieu de culture	de l'eau distillée
Agar pour la bactériologie	12 g	250 ml
Sabauroud	16 g	250 ml
Simmons	5 g	250 ml

4.2 Isolement de *Rhizobium* : Le sol prélevé (1 g) aux pieds d'*Erythrophleum africanum* est mélangé à 10 ml d'eau distillée, ensuite 1ml de cette solution est dilué dans 9 ml d'eau distillée. Au total 10prélèvementsde sol ont été effectués pour augmenter la chance de piégeage des bactéries fixatrices d'azote. Les différents milieux de cultures ont été ensemencés par ces différentes solutions diluées dans les conditions aseptiques sous la hotte à flux laminaire.

4.3 Bactérisation des semences : La bactérisation est faite un enrobage des semences par les bactéries. C'est la méthode indiquée pour le rapprochement des bactéries fixatrices plus près de l'organe végétal à coloniser. Les semences d'*Erythrophleum africanum* ont été enrobées avec les nodules écrasés de *Senna alata* et *Senna occidentalis*.

4.4 Traitement des plantules au moleibiol : L'application de moleibiol a été effectuée par pulvérisation à la dose de 5 l de produit commercial/ha, et à la fréquence d'un traitement tous les sept jours pendant 12 semaines. Les traitements ont débuté sur les plantules âgés 8 semaines.

4.5 Multiplication générative : Les graines en provenance de Pelende, ont été mises en terre (sable du fleuve) après avoir été enrobées par les nodules écrasés de *Senna alata* et *Senna occidentalis*

4.6 Multiplication végétative

Les boutures de 25 cm ont été plantées dans les sachets en polyéthylène contenant du terreau, et arrosées tous les jours arrosée matin soir pendant 4 semaines.

5 RESULTATS

5.1 Multiplication végétative : La multiplication végétative a été faite avec des morceaux du tronc aouté, mesurant 25 cm de long portant 2 à 3 bourgeons.

5.2 Recherche de bactéries fixatrices colonisant *Erythrophleum africanum* : Les plantules âgées de 9 mois évoluant dans les sachets remplis de terre prélevée à l'exploitation

agricole JUDICAEL, ont été utilisées à la recherche des nodules. Après l'examen minutieux des systèmes racinaires de 20 plants (tableau 2), aucun nodule n'a été observé sur les systèmes racinaires. Cette investigation a permis de constater qu'*Erythrophleum africanum* développe un système racinaire pivotant d'une part, et d'autre part le sol prélevé aux différents

endroits dans l'exploitation agricole compatibles ou incompatibles partiellement
JUDICAEL n'héberge pas des souches avec l'espèce *Erythrophleum africanum*.

Tableau 2 : Nodules portés par systèmes racinaires

Nombre	
de plantules observées	de systèmes racinaires porteurs de nodules
20	0

5.3 Etude de la spécificité de bactéries fixatrices : *Senna alata* et *Senna occidentalis* appartiennent à la même famille qu'*Erythrophleum africanum*, il nous a donc semblé intéressant de connaître si les souches bactériennes colonisant ces deux premières espèces étaient spécifiques à ce groupe, ou par contre compatibles et incompatibles partiellement à d'autres espèce de la même famille botanique telle qu'*Erythrophleum*

africanum. Pour ce faire les graines cette dernière espèce, enrobées par nodules écrasés de *Senna* spp ont été semées dans le sable ramassé au bord du fleuve, pauvre en bactéries fixatrices de l'azote atmosphérique. Les résultats obtenus montrent que la spécificité est stricte, en effet aucun nodule n'a été observé sur les différents systèmes racinaires de plantules d'*Erythrophleum africanum*, alors ceux de *Senna* spp en portaient (tableau 3)

Tableau 3 : Spécificité de souches de *Rhizobium* associées aux espèces *Senna* spp.

Espèces	Nodules sur les systèmes racinaires
<i>Erythrophleum africanum</i>	Absents
<i>Senna alata</i>	Présents
<i>Senna occidentalis</i>	Présents

5.4 Action de molebiol sur la croissance en longueur : Chez la plante, la croissance est obtenue à la fois par la mérése et l'auxèse. La croissance en longueur a été retenue pour juger l'action de molébiol sur les plantules. Les résultats consignés dans le tableau 4 illustrent bien que les plantules âgées de 5 mois, qui ont été traitées au molebiol par pulvérisation ont vu leur croissance en longueur atteint de 7,7cm

de moyenne, alors celle de témoin est 4,2 cm. Le traitement au molebiol s'avère comme un excellent palliatif applicable au stade de plantules pour accélérer la croissance en l'absence d'une association racine- bactérie efficiente. L'analyse de la variance montre que la plus petite différence est significative entre les plants témoins et les pulvérisés au molebiol (figures 3 et 4).

Tableau 4 : Action de molebiol sur la croissance en longueur des plantules (en cm)

Traitements	Répétitions							Total	Moyenne
T ₀	4,5	4,3	3,6	5	4,4	3,5	4,2	29,5	4,2 B
T ₁	8	7,5	6,8	7,8	7,9	8,1	7,9	54	7,7 A
CV									12.55
PPDS									0,8037



Figure 3 : témoin



Figure 4 : traité au molebiol

5.5. Isolement de bactéries : Trois milieux de culture ont été utilisés pour piéger les bactéries fixatrices, il s'agit de l'agar agar, Simmons et sabauroud. Tous les milieux

ensemencés par les solutions diluées de sol à *Erythrophleum africanum*, ont été colonisées par des bactéries et les champignons.

6 DISCUSSION

La recherche a été menée pour isoler les souches fixatrices d'azote, colonisant le système racinaire d'*Erythrophleum africanum*, ensuite faire sa multiplication. Pour ce faire le matériel végétal est constitué des sauvageons, les boutures caulinaires et les graines. Les essais ont été déjà menés sur la reproduction générative Ngangu (2014). N'ayant pas trouvé les sauvageons, l'expérimentation s'est penchée sur les boutures, Les résultats obtenus ne sont pas encourageants, en effet aucune bouture n'a bourgeonné, données qui sont en concordance avec celles de la Zambie (Prota, 2008). La recherche des bactéries fixatrices colonisant *Erythrophleum africanum* a été réalisée avec le sol sablonneux prélevé dans l'exploitation agricole JUDICAEL. Les systèmes racinaires d'*Erythrophleum africanum* n'ont pas été hébergés par des bactéries fixatrices de sol en provenance de la ferme. Cela confirme le fait que les souches de *Rhizobium* colonisant différentes légumineuses ne sont pas présentes partout

comme le confirme Baudoin et al. (2002). Les souches autochtones colonisant *Senna alata* et *Senna occidentalis* n'ont pas été hébergées par les systèmes racinaires d'*Erythrophleum africanum*. Ces faits ont déjà été observés par Heller et al. (1998). Souvent une espèce de *Rhizobium* s'associe qu'à une espèce ou quelques espèces de légumineuses. La spécificité des souches bactériennes colonisant différentes espèces de légumineuses est de règle. Les plantules d'*E. africanum* traitées par la pulvérisation avec le molebiol ont accusé une croissance longueur atteignant 7,7 cm, alors que les plants témoins n'ont qu'une taille de 4,2 cm. La plus petite différence est entre les deux traitements, ce qui prouve à suffisance que le molebiol a effet sur la croissance en longueur. Les essais menés sur les légumes fruits et feuilles ont montré qu'effectivement ce biostimulant améliore la croissance en longueur et en épaisseur d'une part, et d'autre part le rendement (Pululu et al, sous presse)

7 CONCLUSION ET SUGGESTIONS

Erythrophleum africanum est très exploitée cause de ses multiples usages, d'où il faut amorcer déjà des études préliminaires pour une future domestication ç cours terme de cette espèce en

voie d'extinction.' Les paramètres qui ont été étudiés sont la multiplication végétative et générative, la spécificité des souches bactériennes et la recherche de celles colonisant

Erythrophleum africanum, l'action d'un biostimulant sur la croissance en longueur des plantules et en l'isolement des souches bactériennes sur sol à *Erythrophleum africanum*. Les résultats de la multiplication végétative par bouturage ont été jugés médiocres, nous suggérons que les nouveaux essais soient menés en utilisant d'autres techniques telles que la mise de boutures dans un propagateur, où règne un microclimat pouvant favoriser le

bourgeonnement rapide. La pulvérisation de molebiol à faible dose s'est avérée intéressante en améliorant la croissance en longueur des plantules. Nous recommandons que ce biostimulant soit appliqué sur les jeunes plantes pour accélérer leur élévation. Nous suggérons que les investigations se poursuivent sur les souches isolées en vue d'étudier leur compatibilité vis-à-vis d'*Erythrophleum africanum*.

8 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arbonnier M. (2009), Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Ouest, Quae, Paris, 573 pages
- Baudoin J.P, Demol J., Lauant B.P., Marechlr. , Mergeac G. et Otoul E. (2003), Amélioration des plantes, Application aux principales espèces cultivées en régions tropicales, les presses agronomiques de Gembloux, Gembloux, 581 pages
- Burkill H.M. (1995), The useful plants of West Tropical Africa, Families E-I. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, 989 pages
- Heller R., Esnault R. et Lance C. (1998), physiologie végétale 1 Nutrition, Dunod, Paris, 323 pages
- Heller R., Esnault R. et Lance C (2000), physiologie végétale 2. Développement, Dunod, Paris, 366 pages.
- Lepoivre P. (2003), les procaryotes phytopatogènes in phytopathologie, de Boeck, Bruxelles, pages 79-103
- Mangenot F. et Domergues Y. (1970), Ecologie microbienne du sol, Masson, Paris, pages
- Mbemba Fundu di Luyindu T. (2013), Aliments et denrées alimentaires traditionnels du Bandundu en R. D. Congo, l'Harmattan, 317 pages
- Neuwinger H. D. (1996), African ethnobotany poisons and drugs, Chapman et Hall, London, 941 pages
- Ngangu N. (2014) Domestication des plantes à chenilles dans le Kongo-central. Mémoire de fin de cycle, inédit, ISAV, 50 pages
- Prota (2008), les plantes médicinales 1, ressources végétales de l'Afrique tropicale, Fondation PROTA/Backhuys Publishers/CTA, Wageningen, 869 pages
- Pululu Mfwidu Nitu G. (2015), cours de biotechnologies végétales L2, ISP/Gombe, inédit, 58 pages
- Pululu M. N. G et al. (sous presse) Contribution des chenilles comestibles dans le territoire de Madimba/Kongo central/RD Congo, éditions Pauliniennes, 75 pages
- Vilain M. (1997), La production végétale, les composantes de la production, Lavoisier, Paris, 478 pages
- Von Koenem E (2001), Medicinal poisonous and edible plants in Namibia, Klaus Hess Verlag, Göttingen, 336 pages
- Wikipedia, the free encyclopedia, consulté le 15 juin 2015
- Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Name, Tropicos.org., consulté le 28 Juin 2015
- CAID : Carte administrative du territoire de Kasongo-Lunda <https://caid.cd>. « Cartes » downloads et <http://www.caid.cd> » index.php, province-de-kwango » territoire –de-kas. Consulté le 10 novembre 2019