

Etude de l'association du *Rhizobium* et de l'insecticide carbofuran dans le pralinage des semences de soja (*Glycine max* (L.) MERRIL)¹

B. SCHIFFERS², D. CORNET³, J. FRASELLE² et BALANDI MBOKA-UNDA²

Faculté des Sciences Agronomiques de l'Etat, Gembloux

Sommaire

Des semences de soja ont été préinoculées par la technique de pralinage à la boule.

On a incorporé en mélange une souche de *Rhizobium* et une forte dose de carbofuran. Un test *in vitro* prouve qu'il n'y a pas d'incompatibilité entre les bactéries et la matière active pure ou formulée. Des essais sur milieu sans azote et sur terreau démontrent la capacité des semences ainsi traitées à provoquer la nodulation, même après un temps de stockage de deux mois.

Introduction

Le soja occupe actuellement la première place parmi les plantes productrices d'huile avec une teneur en lipides de 18 à 25 %. Ses tourteaux utilisés dans l'alimentation animale, principalement porcine, contiennent de 35 à 40 % de protides. Enfin, il peut fixer d'importantes quantités d'azote atmosphérique (150 à 400 kg/ha) grâce à l'exploitation judicieuse de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuse. Celle-ci est obtenue par l'inoculation des semences avant le semis.

Par ailleurs, le soja se révèle particulièrement sensible à de nombreux ennemis parmi lesquels les insectes (lépidoptères, coléoptères et thrips) et les nématodes (*Heterodera glycines* ICHINOHE, *Meloidogine* spp., *Rotylen-*

1. Reçu le 8 septembre 1982. Accepté le 16 décembre 1982.

2. Chaire de Phytopharmacie. Passage des Déportés, 2. B-5800 Gembloux (Belgique).

3. Centre d'Etude des Légumineuses (I.R.S.I.A.). Chaire de Microbiologie. Avenue de la Faculté d'Agronomie, 11. B-5800 Gembloux (Belgique).

chus reniformis LINFORD & OLIVERIA) dont les attaques peuvent compromettre totalement la culture. Une protection insecticide et nématicide du soja s'impose donc naturellement.

Vu que, d'une part l'inoculation des graines de soja est une pratique culturale généralisée, et que d'autre part il est possible de protéger efficacement une culture par incorporation de matières actives dans le pralinage des semences (FRASELLE et SCHIFFERS, 1982), il est intéressant de voir dans quelle mesure la coexistence au sein de la même matrice d'une dose élevée de matière active et de bactéries de *Rhizobium* est possible sans leur enlever leurs pouvoirs protecteur et infectant. La durée d'efficacité de ce traitement mixte permettra l'utilisation différée des semences (notion de préinoculation) (CALDWELL, 1983).

Matériel et Méthodes

1. TEST DE MESURE DE L'EFFET ANTIBIOTIQUE DU CARBOFURAN SUR LE *Rhizobium*

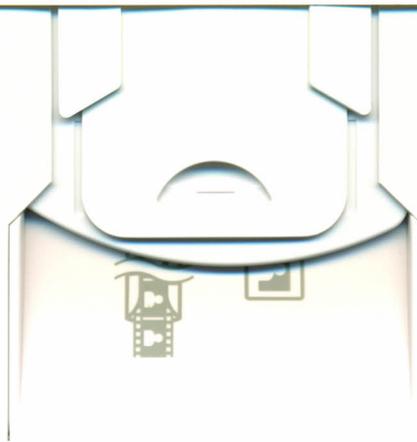
Pour déterminer la compatibilité de la matière active (carbofuran) et de sa formulation (CURATER SC 330), on procède à un test *in vitro* sur milieu de WRIGHT gélosé (WRIGHT, 1925). La souche de *Rhizobium* choisie est la souche 3.15 B3, spécifique et efficace sur soja (CORNET, 1978).

1.1. Matériel stérile

- Un erlenmeyer contenant une suspension de bactéries à raison de 1.10^9 bactéries/ml.
- Seize boîtes de Pétri contenant un milieu de WRIGHT gélosé.
- Des tubes à essai contenant chacun 9 ml d'eau distillée et des pipettes volumétriques pour effectuer les dilutions.
- Des disques de papier absorbant stérilisés à l'autoclave.
- Des cupules en acier inoxydable stérilisées de la même façon.

1.2. Ensemencement

Deux suspensions de bactéries de concentrations différentes sont utilisées comme suit : huit boîtes de Pétri sont ensemencées avec 0,2 ml de la suspension initiale (1.10^9 bactéries/ml) et huit autres avec la même quantité d'une suspension à 1.10^7 bactéries/ml.



1.3. Préparation du carbofuran et du CURATER SC 330

On incorpore, dans le pralinage des graines, le carbofuran sous forme d'une suspension concentrée à 33 % (CURATER SC 330); étant donné les nombreux éléments qui interviennent dans une formulation, et plus spécialement les tensio-actifs, il est important de faire le test aussi bien sur le produit commercial que sur la matière active pure.

On imprègne les disques de papier d'une solution saturée en carbofuran ou en CURATER SC 330; on dispose les disques sur six boîtes de Pétri (plus deux boîtes témoin avec des disques imprégnés d'eau distillée). Sur les six autres boîtes, on dépose les cupules en acier inoxydable dans lesquelles on verse 0,15 ml des solutions saturées de carbofuran ou de CURATER SC 330. Après une semaine d'incubation, aucune action antibiotique n'est observée ni pour la matière active pure, ni pour la formulation.

2. PREPARATION DES PRODUITS D'INOCULATION

La souche de *Rhizobium* (3.15 B3) peut être incorporée au pralinage des graines, soit sous forme liquide (la bactérie en suspension aqueuse), soit sous forme solide (sur un support de vermiculite).

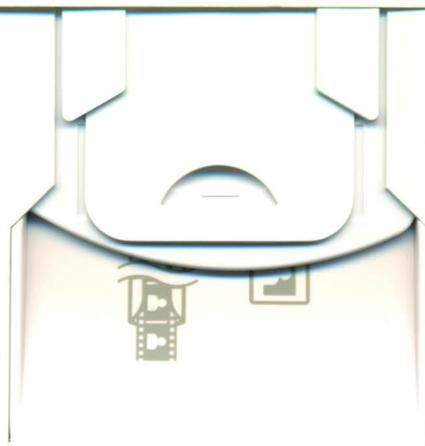
2.1. Préparation de l'inoculum liquide

Pour assurer la nodulation, il faut une quantité moyenne de 1.10^6 bactéries par graine de soja (BURTON, 1980); en tenant compte de la mortalité importante lors des manipulations (de l'ordre de 99 %), il faut inclure dans le pralinage une suspension de bactéries de concentration plus élevée, soit 1.10^8 bactéries par graine.

Connaissant le poids de mille graines et la quantité de bactéries nécessaire par graine, on peut calculer le volume de la suspension à 1.10^9 bactéries/ml qu'il faut pour un poids donné de graines de soja. Ce volume de suspension est alors centrifugé pendant 10 min à 10 000 t/min pour éliminer le milieu de WRIGHT. Les culots de bactéries sont récupérés dans 10 ml de solution de RINGER. L'inoculum est prêt à servir.

2.2. Préparation de l'inoculum solide

Les bactéries sont cultivées sur un substrat à base de vermiculite stérile. On détermine le titre en *Rhizobium* de la vermiculite de la manière suivante: 50 g de vermiculite sont mélangés à 450 ml d'eau distillée stérile. Après une agitation d'une demi-heure, on dilue la suspension jusqu'à 1.10^{-6} . On prélève 1 ml de cette dernière dilution et on le mélange dans une boîte de Pétri au milieu de WRIGHT gélosé maintenu liquide à 40°C. La



boîte reste 3 à 4 jours à l'étuve à 28°C. On compte alors le nombre de colonies qui sont apparues et on estime qu'une colonie provient d'une bactérie.

Connaissant le poids de mille graines et le titre de la vermiculite, il suffit de calculer le poids de vermiculite à incorporer au pralinage pour un poids donné de graines de soja. Cette quantité de vermiculite est alors broyée finement juste avant son incorporation dans le pralinage. Nous avons pu montrer que le broyage ne modifie pas le titre de la vermiculite (résultats non publiés).

3. REALISATION DU PRALINAGE DES GRAINES DE SOJA

Le pralinage des graines est réalisé selon la technique du «rolling» ou «pralinage à la boule»: une sphère tourne sur elle-même à vitesse variable, sa rotation entraînant celle des graines déposées à l'intérieur. Celles-ci se mettent à rouler les unes sur les autres et ce mouvement est mis à profit pour les charger d'un mélange de matière de charge et de collants (produits sous brevet, non spécifiés) qui assurent la cohésion de l'ensemble et l'adhésion du pralinage à la graine.

L'alternance d'addition d'eau et de séchage permet de solubiliser les collants et de les fondre dans la masse, pour obtenir en fin d'opération une matrice solide et sèche autour des graines.

L'incorporation du carbofuran et de l'inoculum de *Rhizobium* se fait en cours d'opération, entre deux couches de matières de charge.

Le pralinage représente une charge d'environ 30 % du poids des graines de soja et correspond à la formule suivante:

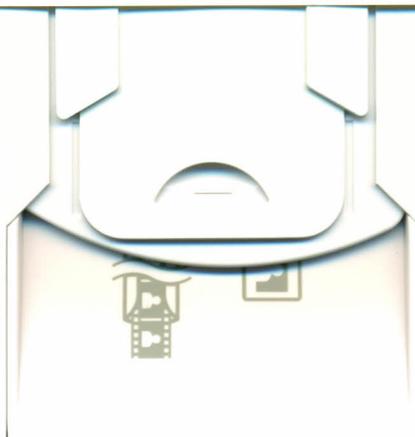
Bentonite du Wyoming (montmorillonite)	50 %
Dioxyde de silice amorphe	40 %
Collants	5 %
Sucre impalpable	5 %

On pulvérise en outre une solution aqueuse d'un collant au cours de la fabrication du pralinage.

Le choix des matériaux et leur proportion sont calculés pour que le pralinage se délite suffisamment vite et complètement dans le sol afin d'éviter que ces matériaux ne soient entraînés hors du sol lors de la germination (le soja a une germination épigée).

4. CALCUL DE LA DOSE DE CARBOFURAN

C'est la dose individuelle de matière active qui est calculée à partir du poids de mille graines; celui-ci est de 222 g pour la variété choisie (cv. «1346»), soit :



si 222 g représentent 1 000 graines de soja du cv. « 1346 » et si l'on sème 60 000 g de graines/ha, on a

$$\frac{1\,000 \times 60\,000}{222} = 270\,270 \text{ graines/ha.}$$

Sachant que la dose de carbofuran à appliquer à l'ha est de 600 g ou 600 000 mg, on peut calculer la dose de matière active à déposer sur chaque graine :

$$\frac{600\,000}{270\,270} = 2,2 \text{ mg de carbofuran.}$$

Résultats

Le pralinage des graines de soja terminé, celles-ci ont subi une série de contrôles, nécessaires à prouver leurs qualités quant à leur pouvoir germinatif, au délitement du pralinage, à leur capacité à provoquer la nodulation et surtout à démontrer la viabilité du mélange *Rhizobium*-carbofuran pour un laps de temps aussi long que possible (pour répondre ainsi au problème de la préinoculation). Les résultats de ces contrôles sont repris dans les tableaux 1 à 4.

Les tests de germination (Tableau 1) comparent les performances de l'incorporation d'un inoculum de *Rhizobium* liquide et solide (sur support de vermiculite).

On contrôle le délitement du pralinage à la germination en observant la sortie des cotylédons du sol, et en notant s'ils sont ou non porteurs de matériaux de pralinage (Tableau 2).

TABLEAU 1
Test de germination (après 7 jours, en % des graines semées)
Germination control (after 7 days, in % of sowed seeds)

Support <i>Support</i>	Sur papier filtre <i>On filter paper</i>	Sur gélose <i>On agar</i>	Sur terreau <i>On compost</i>
Témoin <i>Untreated</i>	95 %	non testé <i>not tested</i>	100 %
Pralinage + inoculum liquide <i>Seed coating + liquid inoculum</i>	98 %	100 %	92 %
Pralinage + inoculum solide <i>Seed coating + solid inoculum</i>	30 %	90 %	83 %

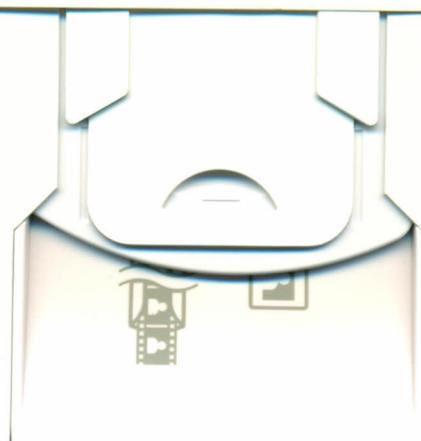


TABLEAU 2

Délitement du pralinage après germination (sur 100 graines)
Coating's disaggregation after germination (relative to 100 seeds)

Sortie des cotylédons : <i>Cotyledons emerged :</i>	Inoculum liquide (sans vermiculite) <i>Liquid inoculum (without vermiculite)</i>	Inoculum solide (avec vermiculite) <i>Solid inoculum (with vermiculite)</i>
Avec tout le pralinage <i>With the whole coating</i>	5	0
Avec une partie du pralinage <i>With a fraction of coating</i>	60	58
Sans trace de pralinage <i>Without coating</i>	35	42

Les tests d'aptitude à la nodulation sont réalisés sur milieu nutritif stérile, dépourvu d'azote (milieu de NICOL et THORNTON (1949)) dans une trentaine de godets en plastique, et sur terreau «vierge» (pots et terreau n'ayant jamais servi) (Tableau 3).

Après pralinage, les graines sont conservées en sachet de papier et à température ambiante. Elles sont semées après 15, 30 ou 60 jours de conservation pour tester leur aptitude à provoquer la nodulation (Tableau 4).

TABLEAU 3

Plantes pourvues de nodosités (en % des graines semées)
Nodulated plants (in % of sowed seeds)

Délai d'observation <i>Time for observation</i>	15 jours — 15 days		30 jours — 30 days	
	Sur milieu sans azote <i>On medium without nitrogen</i>	Sur terreau <i>On compost</i>	Sur milieu sans azote <i>On medium without nitrogen</i>	Sur terreau <i>On compost</i>
Témoin <i>Untreated</i>	0 %	0 %	0 %	0 %
Pralinage + inoculum liquide <i>Seed coating + liquid inoculum</i>	100 %	100 %	100 %	100 %
Pralinage + inoculum solide <i>Seed coating + solid inoculum</i>	35 %	0 %	100 %	100 %

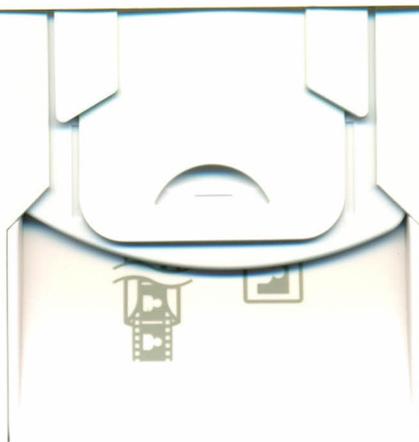


TABLEAU 4

Pourcentage de plantes pourvues de nodosités, issues de graines pralinées, semées après 15, 30 et 60 jours de conservation
Percentage of nodulated plants, issued from coated seeds, after 15, 30 and 60 days of storage

Support <i>Support</i>	15 jours après pralinage <i>15 days after coating</i>	30 jours après pralinage <i>30 days after coating</i>	60 jours après pralinage <i>60 days after coating</i>
Sur milieu sans azote <i>On medium without nitrogen</i>	100	non testé <i>not tested</i>	83,3
Sur terreau <i>On compost</i>	100	100	100

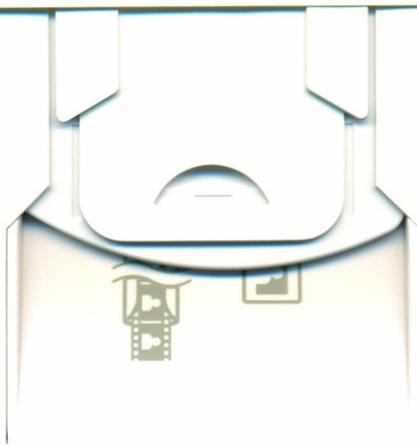
Discussion

Le test *in vitro* de compatibilité entre le carbofuran (ou sa formulation) et la souche de *Rhizobium* montre qu'a priori il n'y a pas d'incompatibilité et que le mélange des deux dans le pralinage ne devrait pas inhiber la nodulation.

Les essais de germination sur gélose et sur terreau montrent que le traitement par pralinage des graines ne diminue pas de manière significative le pouvoir germinatif de celles-ci, même après plus de deux mois de stockage (Tableau 1).

Lors de la germination, on constate que l'incorporation d'une fraction de vermiculite au pralinage facilite le délitement de celui-ci. Dans le cas de semis un peu plus profonds que ceux réalisés pour les tests, le délitement est d'ailleurs complet et les cotylédons sortent débarrassés du pralinage (Tableau 2).

Quant à l'aptitude à la nodulation, d'après les données du tableau 3, on pourrait penser que l'infection est plus rapide à partir d'un inoculum liquide qu'à partir d'un inoculum sur support de vermiculite. Il faut cependant insister sur le fait que les conditions de semis des graines pralinées avec ces deux types d'inoculum n'étaient pas les mêmes; or les conditions du milieu (température, humidité, lumière, etc...) influencent beaucoup la rapidité d'apparition des nodules. Il serait donc vain d'en tirer une conclusion pratique, d'autant qu'après 30 jours la nodulation est complète pour les deux types de préparations.



En outre, dans des conditions difficiles de germination (pH, température, humidité) — qui sont le plus souvent celles des régions tropicales — la vermiculite protège les bactéries entre ses feuillets des attaques extérieures.

L'incorporation au pralinage d'un inoculum de *Rhizobium* liquide ou solide permet de conserver son pouvoir infectieux et son aptitude à provoquer la nodulation pendant plus de 60 jours (Tableau 4); on réalise ainsi un traitement efficace de préinoculation des graines de soja.

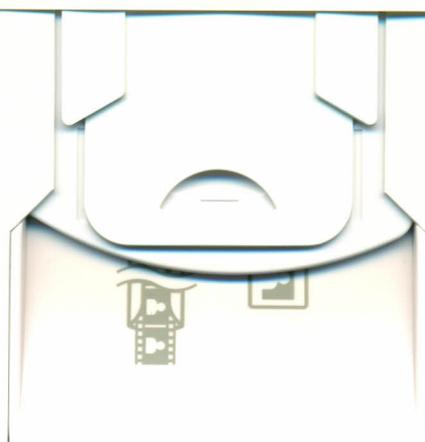
Le pouvoir insecticide et nématicide du traitement au carbofuran n'a pu être testé faute d'organisme-cible. Toutefois, l'expérience acquise avec des traitements similaires (FRASELLE et SCHIFFERS, 1982) sur des graines de féverole (*Vicia faba* L.), de niébé (*Vigna unguiculata* WALP.), de maïs et d'autres céréales (orge, froment), permet d'envisager une efficacité probable pour une période d'au moins deux mois.

Conclusions

Compte tenu des exigences à satisfaire pour l'inoculation des graines de soja avec une souche de *Rhizobium*, la formule de préinoculation par pralinage des graines est tout à fait satisfaisante.

On répond aux exigences suivantes :

- introduction du *Rhizobium* au meilleur endroit pour le démarrage rapide du processus infectieux (l'apport de l'inoculum est tout à fait ponctualisé au niveau de la graine);
- maintien de la viabilité de la bactérie à l'état libre dans le sol;
- nodulation rapide correspondant à une phase parasitaire minimale;
- mise en œuvre la plus simple possible puisque les graines pralinées sont prêtes à l'emploi, quel que soit le type de semis;
- conservation du titre en *Rhizobium* dans le pralinage pendant trois mois;
- conditions de stockage des graines pralinées ne nécessitant pas d'équipement particulier (température ambiante, abri de la lumière, faible humidité atmosphérique);
- résolution du problème de la préinoculation tout en apportant une protection insecticide au soja pour une durée très probable d'au moins deux mois.



Summary

STUDY OF THE ASSOCIATION OF *Rhizobium* AND THE SYSTEMIC INSECTICIDE CARBOFURAN ON COATED SEEDS OF SOYBEAN (*Glycine max* (L.) MERRILL)

The rolling technique has been used to carry out the pelleting of soybean seeds with a mixture of inert powders, cements, carbofuran (a systemic insecticide - nematicide) and a specific strain of *Rhizobium*.

In vitro tests showed the compatibility between *Rhizobium* and carbofuran by itself, or formulated as a flowable: CURATER SC 330.

Trials on medium without nitrogen, or on compost, showed the ability of such pelleting to maintain the nodulation capacity after two months of storage, without any harmful effect on seed germination.

Références bibliographiques

- BURTON, J.C., 1980. Recent advances in biological nitrogen fixation. Ed. N.S. Subba Rao, New Delhi, India, 486 p.
- CALDWELL, B.E., 1973. Soybeans: improvement and uses. American Society of Agronomy, Inc. Publisher, Madison, Wisconsin, U.S.A., 682 p.
- CORNET, D., 1978. Aspects microbiologiques de la culture du soja en Belgique. *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, **13**: 119-136.
- FRASELLE, J. & SCHIFFERS, B., 1982. L'enrobage des semences en tant que vecteur phytosanitaire pour une protection à long terme. Symposium international de Phytopharmacie et de Phytatrie. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*, **47**: 665-673.
- NICOL, H. & THORNTON, H.G., 1949. Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of legume host. *Proc. Roy. Soc., London*, ser. B., **CXXX**, 858: 32-59.
- WRIGHT, W.H., 1925. The nodule bacteria of soybeans: 1. Bacteriology of strains. *Soil Sci.*, **XX**: 95-120.

