

Contribution à l'étude des *Rhizobium* de quelques espèces de Légumineuses spontanées de la région de Bamako (Mali)

S. SANOGHO *

MOTS CLÉS : *Rhizobium* - Légumineuses - Mali.

KEY WORDS : *Rhizobium* - Legumes - Mali.

INTRODUCTION

Le Mali est un pays à vocation agricole et pastorale, et il nous a paru essentiel d'entreprendre des investigations sur la flore des Légumineuses locales afin de pouvoir déceler, dans la mesure du possible, certaines espèces particulièrement intéressantes. Actuellement les seules Légumineuses utilisées en agriculture sont en premier lieu le niébé (ou cow-pea), c'est-à-dire *Vigna sinensis*; l'arachide, *Arachis hypogaea* et le voandzou ou *Voandzeia subterranea*. Dans les stations de recherche comme le Centre National de Recherches Zootechnique (C.N.R.Z.), on a essayé d'adapter certaines Légumineuses étrangères comme *Indigofera hirsuta*, *Stylosanthes gracilis*, *Phaseolus lathyroides*, *Cajanus cajan*, etc. Des Légumineuses spontanées comme *Stylosanthes gracilis*, *Pueraria phaseoloides* et *Phaseolus lathyroides* sont utilisées comme engrais vert ou comme plantes de couverture en zone tropicale humide. Dans les zones tropicales sèches, notamment au Mali, les Légumineuses sauvages sont abondantes, mais une grande partie demeure inutilisée; pourtant certaines espèces de *Vigna*, *Phaseolus*, *Indigofera* et *Crotalaria*

présentent de l'intérêt. Très peu d'attention a jusqu'à présent été accordée à l'aménagement des pâturages naturels où l'association légumineuse-graminée est peut-être la meilleure solution. En Afrique occidentale, certains pays ont progressé dans ce sens: c'est le cas du Nigéria où les pâturages sont améliorés par des grandes cultures de Légumineuses comme *Stylosanthes*, *Pueraria*, *Centrosema*. En entamant ces recherches sur les Légumineuses spontanées de la région de Bamako, nous nous proposons de répondre aux questions suivantes:

- quelles sont les espèces de Légumineuses disponibles?
- comment peuvent-elles se développer sous ces conditions mésologiques, notamment l'association Légumineuse-*Rhizobium*?
- quelle est leur contribution à la fertilité des sols?

On sait que toutes les nodosités des racines ne sont pas efficaces, c'est-à-dire ne sont pas fixatrices d'azote atmosphérique, et que l'intensité de la fixation dépend non seulement des conditions mésologiques mais aussi des deux partenaires, Légumineuse et *Rhizobium*. Il se trouve cependant des souches efficaces avec lesquelles une inoculation des graines de Légumineuses pourrait être utile; nos investigations sur les Légumineuses et les *Rhizobium* indigènes avaient pour objet d'isoler de telles souches et de connaître le comportement de la (ou des) souche(s) locale(s) de *Rhizobium* aux différentes saisons (comportement dans le temps et dans l'espace).

Nous avons choisi une vingtaine d'espèces de Légumineuses croissant dans deux biotopes de la région de Bamako à partir desquelles nous avons isolé et identifié les *Rhizobium*. Nous avons cherché à mesurer la quantité d'azote fixée par ces plantes *in situ* et à comparer l'efficacité des souches de *Rhizobium* isolées de ces plantes.

* Ces recherches ont été effectuées au Centre pédagogique supérieur de l'École Normale Supérieure de Bamako et ont fait l'objet d'un mémoire de doctorat de 3^e cycle, soutenu le 4 décembre 1975, devant un jury présidé par M. le Professeur Adjanooun (République populaire du Bénin) et avec comme examinateurs: M. le Professeur Saxon (Faculté des Sciences de Rabat; Unesco) et le Dr. Mouraret (ORSTOM, Dakar).

1. CONDITIONS MÉSOLOGIQUES

1.1. CHOIX ET LOCALISATION DES BIOTOPES

Les biotopes qui ont retenu notre attention sont au nombre de deux : ils sont situés aux alentours de la ville de Bamako ($12^{\circ} 39' N$; $8^{\circ} W$), chacun à environ 6 km du centre ville. Ce sont :

— les formations végétales de la vallée du Lido, ($12^{\circ} 41' N$; $8^{\circ} 2' W$), située à 7 km en direction nord-ouest sur l'ancienne piste de Kati, à 415 m d'altitude;

— les pâturages naturels du C.N.R.Z. ($12^{\circ} 39' N$; $7^{\circ} 55' W$), situés à 6 km à l'est de Bamako, sur la rive gauche du Niger (altitude 340 m). Cette dernière station est de loin la plus importante car elle est aménagée et constitue l'une des formations présentant l'aspect de milieu naturel et ayant subi le moins de dégradation.

1.2. CONDITIONS GÉOLOGIQUES ET ÉDAPHIQUES

1.2.1. Nature géologique des terrains

Les données géologiques sont celles de Dars (1961). Les formations en rapport avec notre travail sont :

— la série schisto-gréseuse de Koulouba qui limite la plaine alluviale qu'elle surplombe à plus de 150 m au nord; cette série est un dépôt marin en eau peu profonde dans la région de Bamako, son faciès est littoral; l'ensemble serait attribué à l'Ordovicien-Gothlandien et se trouve recouvert par une puissante cuirasse ferrugineuse;

— la série gréseuse de Sotuba, située plus bas est enfouie sous les alluvions de la plaine. Elle est visible dans le lit du fleuve au niveau de la « Chaussée Coursin ». C'est une formation marine littorale des environs de Bamako qui daterait du Cambrien.

1.2.2. Profils édaphiques

— *Le Lido : sol ferrallitique*

0-15 cm

— pH 7,40; couleur brun rougeâtre; structure polyédrique; matériaux sableux; existence de nombreuses racines; présence de concrétions ferrugineuses; très humide.

Cet horizon repose sur la cuirasse d'aspect conglomératique. A certains endroits, il repose sur du grès qui d'ailleurs affleure souvent. L'épaisseur de cet horizon est très variable.

— *Sotuba : sol ferrugineux lessivé*

0-20 cm

— pH 6,63; couleur grise avec teinte beige; texture fine non plastique (limons); structure motteuse; les mottes grossières de forme polyédrique sont facilement décomposées entre les doigts; les matériaux sont sableux, poreux (friables); très humide.

30-80 cm et plus

— pH 6,08; couleur jaune ocre; structure motteuse, mottes grossières de forme polyédrique, plus difficilement décomposables entre les doigts; structure particulière matériaux sablo-argileux; très rares débris végétaux, avec très peu de racines (si elles existent, elles sont grosses et horizontales); plus sec que le précédent; présence sur la paroi de la tranchée de concrétions ferrugineuses rouges isolées.

1.2.3. Analyse physique des sols

Les fractions suivantes ont été déterminées :

- sables grossiers et moyens : 1 - 0,25 mm
- sables fins : 0,25 - 0,05 mm
- poussière grossière : 0,05 - 0,01 mm
- poussière moyenne : 0,01 - 0,005 mm
- poussière fine : 0,005 - 0,001 mm
- limon : < 0,001 mm.

On regroupe sous l'expression de sable physique les fractions de diamètre 1,0 - 0,01 mm et sous celle d'argile physique les fractions de diamètre inférieur à 0,01 mm.

Pour caractériser les sols d'après leur composition granulométrique nous avons utilisé la classification de Katchinski.

Le tableau I récapitule les résultats de ces analyses granulométriques (les proportions des différentes fractions de particules sont exprimées en pourcentage du total).

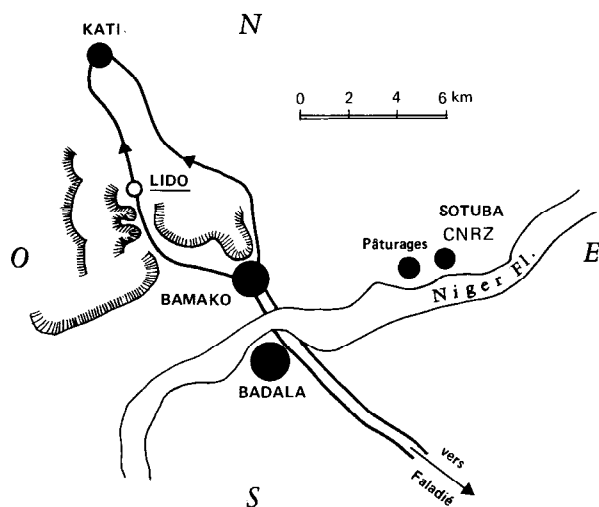


Fig. 1. — Carte à 1/200 000 (localisation des biotopes).

TABLEAU I
ANALYSE GRANULOMETRIQUE DES SOLS

SOLS	Sables grossiers et moyens (1 - 0,25 mm) 1	Sables fins (0,25 - 0,05 mm) 2	Poussière grossière (0,05 - 0,01 mm) 3	Poussière moyenne (0,01 - 0,005 mm) 4	Poussière fine (0,005 - 0,001 mm) 5	Limons < 0,001 mm 6	Argile physique (4 + 5 + 6)
LIDO	10,80	38,29	19,71	7,14	8,52	11,61	27,27
SOTUBA	23,00	49,50	10,83	4,44	2,43	9,80	16,67

Le sol de Sotuba est caractérisé par sa faible teneur en limon (9,8 %) alors que celui du Lido a une teneur légèrement plus forte (11,61 %). Dans ces deux sols, les fractions dominantes sont des sables fins et des poussières grossières. Pour la teneur en argile physique, elle est de 16,67 % dans le sol de Sotuba alors qu'elle est bien plus élevée (27,27 %) dans le sol du Lido. La fraction de poussière fine est de 2,43 % pour le sol de Sotuba alors que celui du Lido en renferme plus (8,52 %). Le sol de Sotuba est limono-sableux; le sol du Lido est limoneux-léger.

La teneur élevée en sable physique et la faible teneur en argile physique pourraient s'expliquer par le lessivage des particules limoneuses vers le bas du profil sans leur destruction et par une accumulation biogénique de silice.

Les taux de carbone et d'azote des échantillons de

sol du Lido atteignent respectivement 2,15 et 0,13 % avec un rapport C/N satisfaisant de 16,93. La teneur en P_2O_5 est insignifiante, 0,7 mg/100 g de sol. Le pH est alcalin (7,40), l'acidité potentielle se caractérise par des valeurs qui se situent dans la gamme des pH faiblement acides (6,40). Le pH, supérieur à la neutralité, semble bien s'accorder avec les cations du complexe absorbant (19,61). La capacité totale d'échange T, qui dépend de la quantité d'argile et d'humus, est égale à 20,74 méq./100 g de sol. Le taux de saturation quant à lui est très élevé, 94,63 %.

Dans le sol de Sotuba, les taux de carbone et d'azote sont respectivement égaux à 0,42 et 0,043 %, ce qui donne un C/N faible de 10. La faible teneur en humus et en azote semble bien s'accorder avec la composition granulométrique (sol sableux). On peut cependant noter (Charreau et Dommergues, 1959) que ... « la faible

TABLEAU II
ANALYSES CHIMIQUES DES SOLS

SOLS	Niveau du prélèvement (cm) ϕ	% C	% N	C/N	P_2O_5 (assimilable) mg/100 g	pH		Anions et Cations			V %
						à l'eau	au KCl 1 N	S méq./100 g	H	T	
LIDO	0-15	2,15	0,127	16,93	0,7	7,40	6,40	19,61	1,11	20,74	94,63
SOTUBA	0-20	0,42	0,043	9,77	0,9	6,63	5,13	2,10	0,86	2,96	70,85

S, somme des cations échangeables; H, valeur de l'acidité hydrolytique; T, capacité d'échange; V, taux de saturation.

SOLS	Ca^{++} méq/100	Mg^{++} méq/100	$Ca^{++} + Mg^{++}$
LIDO	9,48	5,26	14,74
SOTUBA	0,70	1,14	1,84

teneur de ces sols (Sotuba) en matière organique n'atteint jamais 1 %; c'est une matière organique relativement bien décomposée, les rapports C/N se situent entre 12-15 pour l'horizon de surface ».

La teneur de ce sol en P_2O_5 (0,9 mg/100 g) est légèrement plus élevée que dans le sol du Lido, mais reste très faible. Cela confirme que « ... la faiblesse en P est une des caractéristiques les plus constantes des sols des régions tropicales » (Charreau et Dommergues, 1959). Le sol de Sotuba a un pH faiblement acide (6,63); quant au pH potentiel (détermination dans le KCl) il est aussi acide. La somme des cations échangeables est très faible (2,10), mais parmi les cations échangés, Ca^{++} et Mg^{++} sont dominants par rapport aux cations alcalins Na^+ et K^+ . La capacité d'échange (T) est faible et le complexe absorbant est loin d'être saturé. En plus de cette faiblesse, on peut aussi noter la proportion réduite des argiles physiques et aussi le faible taux de matière organique.

1.3. DONNÉES CLIMATIQUES

En l'absence de stations climatologiques dans les deux biotopes, nous avons considéré que les données relatives à Bamako permettaient de bien définir les milieux étudiés. Ces données climatiques ont été fournies par le Service climatologique de la Météorologie nationale et sont consignées dans les tableaux III, IV, V. Les moyennes du tableau III ont été calculées sur la base d'observations s'étendant sur 25 ans; elles sont en outre traduites sous forme figurée dans la figure 2.

Le climat de la région de Bamako est un climat tropical du type soudano-sahélien caractérisé par deux saisons bien marquées.

Une saison sèche, de novembre à avril, durant laquelle la totalité des précipitations est inférieure à 30 mm, avec une humidité relative de l'air inférieure à 50 % et pouvant descendre à 12 %; on distingue une

TABLEAU III
DONNEES CLIMATIQUES A BAMAKO (moyennes sur 25 ans)

MOIS	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Moyennes annuelles
Température moyenne (°C)	25°33	27°37	31°05	31°98	31°63	28°75	26°63	25°98	26°22	27°37	26°58	21°81	27°81
Précipitations (mm)	3,19	1,65	11,06	18,13	58,72	121,02	249,36	304,78	164,58	66,08	15,71	9,58	1051,73
Nombre de jours de pluie	1	1	2,09	3,52	6,84	11,52	17,20	20,08	12,52	6,36	1,60	1,67	87
Humidité M relative de l'air (%)	50,68	43,48	45,24	58	76,92	89,64	95,92	97,16	97,24	92,92	76,84	60,68	
	14,76	13,20	12,88	18,84	30,24	41,42	57,52	64,32	58,52	44,44	24,68	18,96	
Evaporation (mm)	258,37	252,20	297,83	267,92	209,94	128,58	75,63	55,93	58,42	96,50	168,26	209,15	2078,73
Indice xérothermique (*)	0,13	0,06	0,36	0,57	1,86	4,21	9,36	11,73	6,28	2,41	0,59	0,39	

* Gaussen considère que la sécheresse s'établit lorsque la pluviosité mensuelle P (mm) est $< 2 T$ (moyenne mensuelle des températures, °C). C'est ce rapport P/T qui exprime l'indice xérothermique de Gaussen.

TABLEAU IV
DONNEES CLIMATIQUES A BAMAKO (année 1974)

MOIS	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Moyennes annuelles
Température moyenne (°C)	23°9	27°2	30°2	32°	31°7	28°6	25°8	24°8	25°9	25°9	24°9	23°6	27°04
Précipitations (mm)	0	0	0	1,2	44,5	125,4	281,8	484,4	249,1	29,5	0	0	1269,9
Nombre de jours de pluie	0	0	0	1	7	19	18	20	14	5	0	0	84
Humidité M relative de l'air (%)	42	36	38	57	64	90	97	99	99	91	75	60	
	18	10	13	18	25	30	57	67	57	35	19	18	
Evaporation (mm)	244,8	258,6	285,1	245,6	226,7	127,6	73,5	37,3	52,3	114,8	171,8	193,5	2030,80
Indice xérothermique	—	—	—	0,04	1,40	4,38	10,92	19,53	11,36	1,14	—	—	

TABLEAU V
DONNEES CLIMATIQUES A BAMAKO (année 1975)

MOIS	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Moyennes annuelles
Température moyenne (°C)	23°2	25°9	29°2	31°24	30°8	28°4	25°2	25°5	25°1	—	24°5	23°9	26°63
Précipitations (mm)	0	0	4,8	20,0	27,5	123,0	200,5	326,1	208,5	60,8	4	0	975,2
Nombre de jours de pluie	0	0	3	4	5	12	16	17	17	4	2	0	80
Humidité M	47	47,5	72,4	61,7	78,7	90,9	—	97,2	97,7	—	73,5	61,5	
relative de l'air (%) m	17,5	17,3	15,4	18,8	31,0	42,8	—	60,0	60,2	—	20,0	16,6	
Evaporation (mm)	229,7	228,3	259,5	238,7	188,7	117,4	200,5	58,2	41,2	55,0	161,0	181,7	2059,9
Indice xéothermique	—	—	0,16	0,64	0,89	4,88	7,96	12,78	8,30	—	0,16	—	

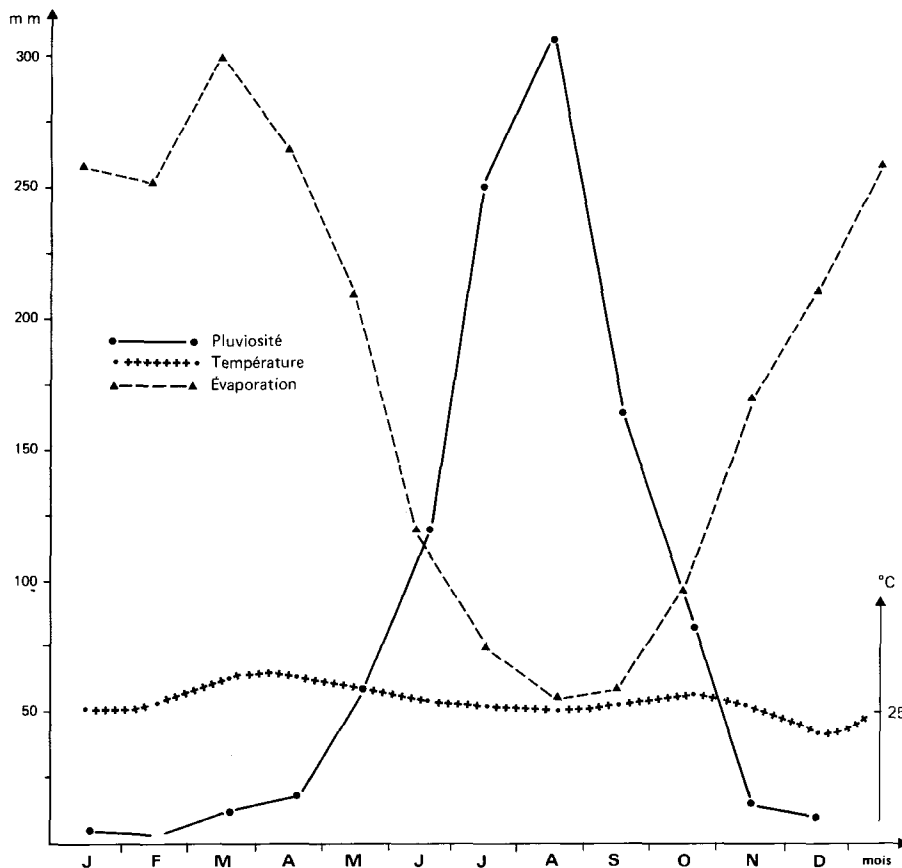


Fig. 2. — Données climatiques de Bamako (moyennes annuelles sur 25 ans).

période chaude, de février à avril, avec des températures moyennes maximales en avril (31,9°C) et une période fraîche de novembre à février avec un minimum de 24,8 °C en décembre (valeur moyenne). Durant

cette saison, le sol est soumis à une évaporation intense (jusqu'à 297 mm en moyenne en mars) et le déficit de saturation peut atteindre des valeurs extrêmes; l'indice xéothermique de Gausson est toujours inférieur à 2.

Une saison humide de mai à octobre, durant laquelle les pluies sont abondantes (1 052 mm au total), surtout en août (305 mm), avec une humidité relative de l'air toujours supérieure à 50 % et pouvant atteindre 97 %. Les températures sont plus basses que pendant la saison sèche avec un minimum en août (25,9°C). L'évaporation pendant cette période est faible (55,9 mm en août) et l'indice xéothermique de Gaussen est toujours supérieur à 2 et peut atteindre 11,7 en août.

1.4. LA VÉGÉTATION

1.4.1. La végétation des pâturages du Centre National de Recherches Zootechniques (C.N.R.Z.) de Sotuba

Les pâturages naturels de Sotuba, domaine de près de 1 100 ha, constituent la zone de pacage du bétail du C.N.R.Z. L'étude des formations végétales de la station a déjà été faite par Adam (1959) puis par Sow et Ba (1974). Ces derniers auteurs ont utilisé les méthodes phytosociologiques de l'École zuricho-montpelliéraine. Adam distingue dans ces pâturages deux types de végétation :

— Celui sur sols alluviaux sablo-limono-argileux, inondés à la période des crues du Niger. Il est riche en Graminées et Cypéracées, mais pauvre en Légumineuses.

Composition floristique sommaire

Pour les arbres : *Daniellia oliveri* (Papilionacée), *Ficus gnaphalocarpa* (Moracée), *Parkia biglobosa* (Mimosacée).

Parmi les plantes herbacées : de nombreux *Cyperus* et *Fimbristylis* (Cypéracées) et des Graminées comme *Vetiveria nigritana*, *Sorghum trichopus*, *Oryza barthii*.

— Celui sur sols sablo-limono-argileux non inondés, avec des Graminées constituant le fond des pâturages et de nombreuses autres espèces (Légumineuses et autres familles).

Composition floristique sommaire

Pour les plantes ligneuses : *Anogeissus leiocarpus*, *Terminalia macroptera* (Combrétacées), *Bombax costatum* (Bombacacée), *Khaya senegalensis* (Méliacée), *Parkia biglobosa*, *Prosopis africana* (Mimosacées), *Ptilostigma reticulatum* (Césalpiniacée), *Pteleopsis suberosa* (Papilionacée), *Vitellaria paradoxa* (Sapotacée).

Pour les plantes herbacées, les Graminées les plus communes sont : *Andropogon gayanus*, *Andropogon pseudapricus*, *Imperata cylindrica*.

Ce sont les pâturages du second type qui prédominent et correspondent à la savane à *Andropogon pseudapricus*. Parmi les Légumineuses on peut signaler les espèces suivantes qui sont toutes des Papilionacées : *Aeschynomene indica*, *Alysicarpus ovalifolius*, *Alysicarpus rugosus*, *Crotalaria cylindrocarpa*, *Crotalaria gareensis*, *Crotalaria retusa*, *Desmodium asperum*, *Indigofera astragalina*, *Indigofera leprieurii*, *Indigofera nummulariifolia*, *Tephrosia bracteolata*, *Tephrosia mossiensis*, *Tephrosia pedicellata*, *Vigna filicaulis*, *Vigna racemosa*, *Vigna reticulata*, *Zornia glochidiata*.

1.4.2. Les groupements végétaux de la vallée du Lido

La vallée du Lido, drainée par le ruisseau du Farako, comporte des groupements végétaux très variés. C'est une station humide, en grande partie influencée par le cours d'eau.

Composition floristique sommaire

Pour les arbres et les arbustes : *Albizia boromensis*, *Albizia lebeck* (Mimosacées), *Cassia glauca* (Césalpiniacée), *Ficus vallis* (Moracée), *Syzygium guineense* (Myrtacée), *Raphia sudanica* (Palme). Pour les plantes herbacées, qui sont les plus variées, les Cypéracées sont les plus évidentes : *Cyperus* spp., *Fimbristylis* spp., *Fuirena umbellata*, *Kyllinga blepharinotha*, *Rhynchospora corymbosa*, *Scleria depressa*. Parmi les Graminées on peut citer : *Andropogon gayanus*, *Coix lacrymajobi*, *Pennisetum asperifolia*, *Schizachyrium brevifolium*.

Pour les autres plantes herbacées : *Ammania auriculata* (Lythracée), *Anubius afzelii* (Aracée), *Centella asiatica* (Ombellifère), *Merremia pterigocaulos* (Convulvacée), *Polygonum salicifolium* (Polygonacée), *Sphegnoclea zeylanica* (Sphénocléacée).

Il faut noter qu'il existe aussi des fougères et des mousses et, parmi les premières : *Adiantum philippense*, *Cyclosorus dentatus*, *Cyclosorus goggilodus*, *Cyclosorus proliferus*.

Aux périodes sèches de l'année, les Cypéracées demeurent les plus abondantes et les plus courantes. Certaines Légumineuses, surtout thérophytes, semblent très étroitement liées au milieu humide : *Alysicarpus rugosus*, *Crotalaria cleomefolia*, *Crotalaria mucronata*, *Desmodium salicifolium*, *Psophocarpus pulustris*, *Sesbania leptocarpa*, *Sesbania pachycarpa*.

La végétation de ces deux biotopes est donc assez différente quant à la composition floristique, mais certaines espèces se rencontrent dans l'un et l'autre; cette différence ressort du régime des pluies, du microclimat et, dans une certaine mesure, des conditions édaphiques.

2. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES RHIZOBIUM DES LÉGUMINEUSES ÉTUDIÉES

2.1. TECHNIQUE D'EXTRACTION DES RHIZOBIUM ET ISOLEMENT EN CULTURE PURE

Les nodosités étudiées proviennent soit de germinations en pot de graines de Légumineuses, soit directement de plantules récoltées *in situ* pendant la saison humide.

Les nodosités sont lavées proprement à l'eau courante et stérilisées superficiellement par passages successifs de 5 minutes dans une solution de HgCl_2 à 3 ‰, puis dans l'éthanol à 95 % et rincées 5 à 6 fois à l'eau distillée stérile. Un repiquage en strie est enfin effectué à partir de cette suspension de bactéries sur des boîtes de Pétri contenant du milieu YEMA stérile à pH 6,5. Ces boîtes sont mises à incuber à 30°C. Le milieu de culture est celui de Fred, Baldwin et McCoy, milieu gélosé au mannitol et à l'extrait de levure ou encore milieu YEMA :

Solution saline concentrée 10 fois, 100 ml

Extrait de levure	0,5 g
Mannitol	10 g
Agar	16 g
Solution d'oligo-éléments	1 ml
H ₂ O	900 ml

Le pH est ajusté à 6,5. Le milieu est autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

Solution saline concentrée 10 fois

K ₂ HPO ₄	5 g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	2 g
NaCl	1 g
H ₂ O	1 000 ml

Solution d'oligo-éléments

H ₃ BO ₃	2,84 g
MnCl ₂ 4 H ₂ O	1,80 g
ZnCl ₂	0,105 g
Mo O ₄ Na ₂ 2 H ₂ O	0,65 g
CuSO ₄	0,08 g
H ₂ O	1 000 ml

Les colonies de *Rhizobium* sont bombées, plus ou moins gommeuses, translucides ou laiteuses. Les colonies présentant cet aspect, si elles sont bien isolées sans contaminant, sont repiquées aseptiquement dans des tubes contenant du milieu YEMA gélosé incliné.

En cas de contamination, on procède à une dilution de la suspension microbienne dans de l'eau distillée stérile, puis de nouvelles boîtes de Pétri contenant du milieu YEMA à l'actidione et au rose Bengale sont ensemencées; l'actidione s'oppose au développement des bactéries et le rose Bengale à celui des moisissures et

des champignons. Ce milieu a la composition suivante :

— YEMA simple à chaud :	1 000 ml
— rose Bengale (1 g dans 300 ml d'eau) :	10 ml
— actidione (3 g dans 250 ml d'éthanol à 95 %) :	2,5 ml

2.2. VÉRIFICATION DE LA NATURE DU SYMBIOTE

En l'absence de critère biochimique absolu, le seul critère d'appartenance au genre *Rhizobium* est la capacité des souches isolées de provoquer la formation de nodosités observables sur les racines des Légumineuses d'origine (en environnement stérile) après réinoculation.

Les graines de Légumineuses ont un pouvoir germinatif très faible, surtout celles des Légumineuses spontanées. Nous avons essayé divers traitements pour réaliser un pourcentage élevé de germination. La scarification, qui a pour objet de fissurer, de faire éclater ou de provoquer l'abrasion des téguments, se fait à l'aide de papier de verre. Les graines sont placées entre deux feuilles de papier de verre puis frottées jusqu'à abimer partiellement le tégument mais en prenant soin de ne pas altérer les cotylédons. Le ramollissement du tégument de la graine par l'acide sulfurique concentré représente un procédé probablement très efficace, mais il a l'inconvénient de nécessiter des précautions et une surveillance très strictes à cause de la manipulation dangereuse de l'acide. Les graines sont mises dans un récipient contenant du H₂SO₄ concentré pendant 30 minutes au moins; après élimination de l'acide, on lave abondamment les graines à l'eau courante.

Après ces traitements, les graines sont stérilisées superficiellement par passages successifs de 5 minutes dans HgCl_2 à 3 ‰ et dans l'éthanol à 95 %, puis rincées et mises à germer dans des boîtes de Pétri contenant du milieu nutritif (nutriment agar à 8 ‰, qui permet de contrôler la stérilité). Les boîtes ainsi ensemencées sont incubées à 30°C.

Après 4 jours à 30°C, la germination peut être appréciée; les résultats obtenus sont récapitulés au tableau VI qui résume les pourcentages de germination obtenus pour 27 espèces de Légumineuses à l'aide des deux méthodes.

Le pourcentage de germination a été important avec les deux traitements, mais la scarification semble meilleure. L'acide sulfurique exerce probablement une action défavorable et pour l'éliminer, Renault (1970) conseille un lavage d'environ 3 heures à l'eau courante.

La souche à tester est cultivée sur milieu YEMA liquide à pH 6,5 dans un agitateur (250 mouvements/minute) thermostaté à 30°C, pendant 10 jours. Le dispo-

TABLEAU VI
POURCENTAGES DE GERMINATION DES ESPECES DE
LEGUMINEUSES ETUDIEES, DANS LE CAS DE DEUX
TRAITEMENTS DES GRAINES

Espèces de Légumineuses	Localité	Scarification	Bain acide
<i>Aeschynomene indica</i>	Sotuba	63	27
<i>Alysicarpus ovalifolius</i>	Sotuba	79	39
<i>Alysicarpus rugosus</i>	Lido	88	0
<i>Crotalaria goreensis</i>	Sotuba, Lido	22	24
<i>Crotalaria ononoides</i>	Sotuba	23	76
<i>Crotalaria retusa</i>	Sotuba, Lido	98	90
<i>Desmodium asperum</i>	Sotuba, Lido	73	42
<i>Desmodium salicifolium</i>	Lido	60	52
<i>Desmodium tortuosum</i>	Lido	96	43
<i>Desmodium velutinum</i>	Sotuba	81	20
<i>Eriosema psoraleoides</i>	Sotuba, Lido	59	99
<i>Indigofera astragalina</i>	Sotuba	98	41
<i>Indigofera heudelotii</i>	Sotuba	95	0
<i>Indigofera lepreurii</i>	Sotuba	72	35
<i>Indigofera linearis</i>	Sotuba	70	0
<i>Indigofera pulchra</i>	Sotuba	0	0
<i>Indigofera secundiflora</i>	Sotuba, Lido	0	28
<i>Mucuna pruriens</i>	Sotuba	80	72
<i>Phaseolus adenanthus</i>	Sotuba	60	66
<i>Sesbania pachycarpa</i>	Lido	99	0
<i>Tephrosia mossiensis</i>	Sotuba	80	60
<i>Tephrosia purpurea</i>	Sotuba	30	0
<i>Tephrosia sp.</i>	Sotuba	40	0
<i>Uraria picta</i>	Sotuba	96	96
<i>Vigna racemosa</i>	Sotuba	70	0
<i>Vigna reticulata</i>	Sotuba	84	46

sitif de mise en culture et d'inoculation des graines est constitué de vases (Leonard-jars) confectionnés suivant la technique préconisée par Burton, Martinez et Curley (1972) (cf. fig. 3) et contenant un mélange de vermiculite et de sable. L'ensemble du dispositif est stérilisé pendant 2 heures à 120°C. Des germinations de Légumineuses obtenues aseptiquement selon la méthode décrite plus haut sont plantées dans les vases et inoculées après 3 jours avec 10 ml de culture de *Rhizobium*. L'ensemble est placé dans un endroit éclairé et les plantules sont arrosées une fois par semaine avec 10 ml de milieu minéral Thornton dont la composition est la suivante :

Ca ₃ (PO ₄) ₂ :	2 g
K ₂ HPO ₄ :	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O :	0,2 g
NaCl :	0,1 g
FePO ₄ :	1 g
FeCl ₃ :	0,01 g
Oligo-éléments :	1 ml
H ₂ O :	1 000 ml

Le pH est ajusté à 6,5. Le milieu est stérilisé par autoclavage durant 20 minutes à 120 °C. Après 30 jours de croissance, on déterre soigneusement les plantules; on les lave à l'eau courante et on observe leur système radical.

L'examen a porté sur 80 souches provenant de 15 espèces de Légumineuses spontanées provenant des deux biotopes choisis (Lido et Sotuba). Les souches dont l'inoculation n'a pas été suivie de la formation de nodosités ont été écartées et seules ont été retenues pour les expériences ultérieures celles ayant donné lieu à une nodulation caractéristique. Parmi ces dernières, 24 sont maintenues en culture pure.

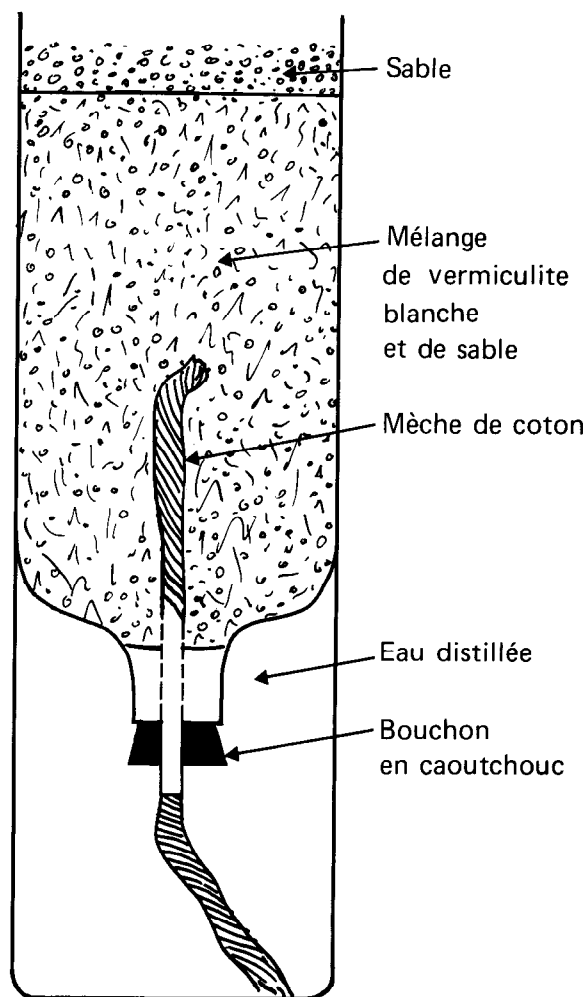


Fig. 3. — Vase pour la mise en culture et l'inoculation des germinations (Leonard-jar).

2.3. EXAMEN MICROSCOPIQUE ET ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE DES SOUCHES DE *Rhizobium* ISOLÉES

Les frottis fixés par la méthode habituelle peuvent être colorés par les colorants basiques. Bien que la gomme hydrosoluble dans laquelle les bactéries sont noyées puisse interférer dans une certaine mesure avec la coloration, ce procédé simple met en évidence la morphologie et la présence de granules dans la cellule (Vincent, 1970). Ces derniers ont été décrits comme des vacuoles, mais ils renferment des polymères d'acide poly- β -hydroxybutyrique qui apparaissent sur la préparation non colorée comme des granules très réfringents et qui peuvent être colorés directement avec le noir soudan. Le colorant utilisé pour ces frottis est la fuchsine basique :

fuchsine basique :	1 g
éthanol à 95 % :	10 ml
solution de phénol à 5 % :	100 ml

Nous avons étudié la croissance des souches de *Rhizobium* isolées de 15 espèces de Légumineuses, en mesurant à intervalles réguliers la densité optique de la culture à l'aide d'un photocolorimètre (fig. 4).

La croissance des souches étudiées est comparée à celle de la souche C.B. 756 (souche australienne provenant de nodosités d'arachide). On remarque que les souches s'adaptent plus ou moins rapidement au milieu de culture puisque les phases de latence observées varient entre 6 et 24 heures. Le temps de génération de la souche de référence est de 1,5 jour. C'est une souche à croissance lente. Toutes les souches étudiées présentent des temps de génération variant entre 1 et 2 jours. Toutes sont donc également des souches à croissance lente :

Dénomination de la souche	Temps de génération (en jours)
C.B. 757	1,5
<i>Aes. ind.</i> 3	2
<i>Aly. ov.</i> 4	1
<i>Aly. rug.</i> 1	1,5
<i>Aly. rug.</i> 3	1,5
<i>Cro. ret.</i> 1	1,5
<i>Cro. ret.</i> 3	1,5
<i>Des. asp.</i> 4	1
<i>Des. asp.</i> 12	1
<i>Ind. ast.</i> 7	1,5
<i>Ind. ast.</i> 8	1,5
<i>Ind. num.</i> 5 B	1
<i>Ind. num.</i> 9	1
<i>Pso. pal.</i> 1	2
<i>Pso. pal.</i> 4	2

<i>Ses. lept.</i> 2	1
<i>Ses. lept.</i> 3	1
<i>Ses. pac.</i> 2	1
<i>Vig. rac.</i> 2	2
<i>Vig. rac.</i> 5	2
<i>Vig. ret.</i> 2	1
<i>Vig. ret.</i> 9	1
<i>Vig. sin.</i> A 2	1
<i>Vig. sin.</i> A 4	1

Les *Rhizobium* du groupe *cow-pea* acidifient ou alcalinisent le milieu YEMA liquide au cours de leur croissance. Le milieu utilisé est du YEMA liquide à pH 6,5 auquel on ajoute 5 ml/l d'une solution aqueuse de bleu de bromothymol à 0,4 %. A pH acide, la couleur du milieu est jaune, puis verte à la neutralité, pour devenir bleue si le pH devient alcalin. Le milieu YEMA est sans CaCO₃.

On inocule aseptiquement le milieu avec la souche microbienne. L'incubation se fait dans l'agitateur thermostaté à 30 °C. Au bout de 10 jours ou plus, on mesure le pH de la culture. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau VII (les valeurs de pH représentent la moyenne de deux répétitions).

On peut conclure que toutes les souches sont acidifiantes sauf celles de *Vigna* qui présentent les deux propriétés.

Norris (1965) a testé 717 souches de *Rhizobium* pour l'acidification ou l'alcalinisation du milieu YEMA. Il a constaté que 61,4 % des souches étaient alcalinisantes, alors que seulement 38,6 % étaient acidifiantes. Les premières ont une croissance lente, alors que le second groupe renferme des souches à croissance rapide.

2.4. IDENTIFICATION DES SOUCHES PAR INOCULATION CROISÉE

Une souche de *Rhizobium* ne peut pas infecter et noduler indifféremment n'importe quelle espèce de Légumineuse. Des essais systématiques d'inoculation avec des souches provenant de Légumineuses diverses ont permis de définir des groupes de *Rhizobium*, dits groupes d'inoculation croisée; on a rangé à l'intérieur d'un même groupe toutes les souches susceptibles de noduler un ensemble donné d'espèces de Légumineuses; ces souches sont incapables d'induire la nodulation en dehors de cet ensemble de plantes. Fred *et al.* (1932) ont ainsi défini 16 groupes d'inoculation croisée, dont le nombre a été porté à 22 par Allen et Allen (1947). Six d'entre eux sont parmi les mieux connus et ont été considérés comme des « espèces » : *Rh. leguminosarum*, *Rh. trifolii*, *Rh. phaseoli*, *Rh. meliloti*, *Rh. lupini*, *Rh. japonicum*. Ceux du groupe *cow-pea* seraient rattachés à *Rh. japonicum*.

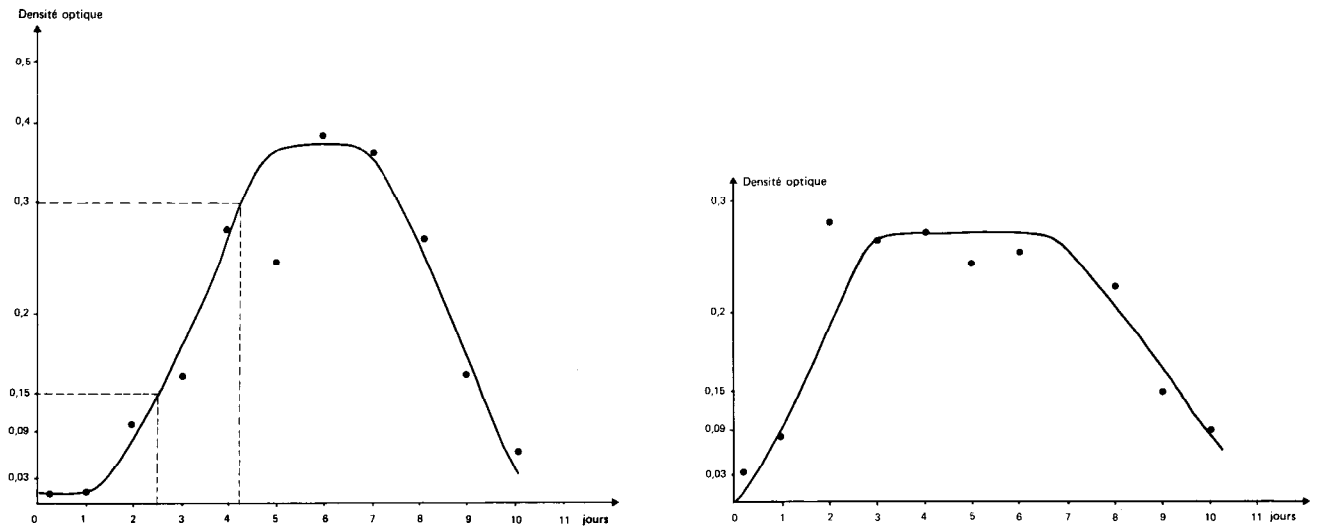


Fig. 4 a, b. — *A gauche* : Courbe de croissance de la souche C.B. 756; temps de génération (t.g.) = 15 j. *A droite* : Courbe de croissance de la souche Aly, ova 4 (*Alysicarpus ovalifolius*); t.g. = 1 j.

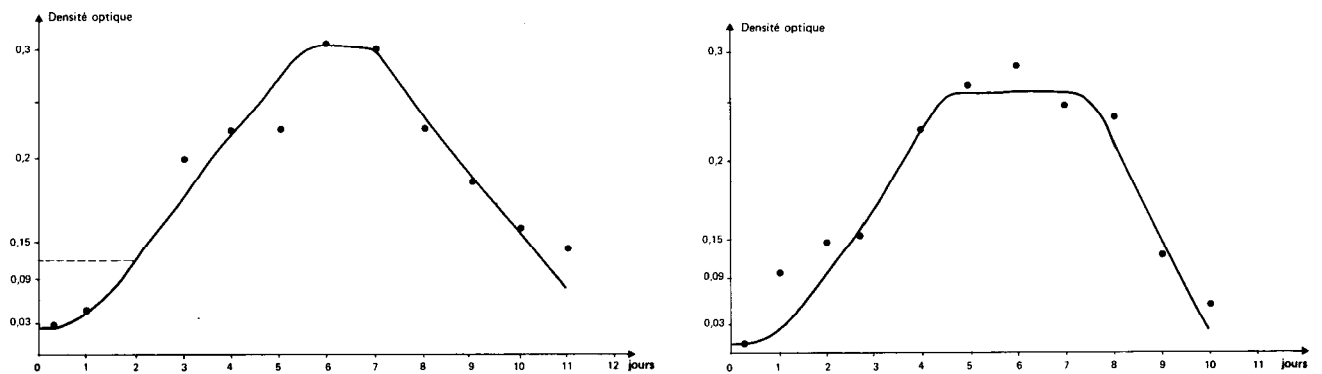


Fig. 4 c, d. — *A gauche* : Courbe de croissance de la souche Cro ret 3 (*Crotalaria retusa*); t.g. = 1,5 j. *A droite* : Courbe de croissance de la souche Ind. ast. 8 (*Indigofera astragalina*); t.g. = 1,5 j.

La méthode utilisée pour cette inoculation croisée est identique à celle des « vases de végétation », décrite plus haut et elle a été faite en deux temps : d'abord par inoculation des plantules de *Vigna sinensis* avec les souches de *Rhizobium* isolées; ensuite par inoculation des plantules des espèces de Légumineuses spontanées. Au bout de 30 jours de croissance, les plantules sont observées et les nodosités si elles sont présentes, sont récoltées avec les racines et leur activité nitrogénastique mesurée par la méthode de réduction de l'acétylène en éthylène; les résultats sont exprimés en $nMC_2H_4/g/h$ (voir plus loin la description de cette technique).

Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux VIII et IX. Les contraintes matérielles nous ont conduit à réaliser l'inoculation pour 19 souches de *Rhizobium*

sur 8 espèces de Légumineuses. Pour le choix de ces dernières, on s'est efforcé de les choisir dans chaque tribu de la famille des Papilionacées : *Crotalaria retusa* (Génistées), *Desmodium asperum* (Hédysarées), *Glycine max* (Phaséolées), *Mucuna pruriens*, *Psophocarpus palustris*, *Sesbania leptocarpa* (Galégées), *Vigna racemosa*, *Vigna sinensis* (cultivé).

La formation de nodosités a été constatée chez *Crotalaria*, *Desmodium*, *Sesbania* et les deux espèces de *Vigna*; elle a été irrégulière chez *Psophocarpus* et *Glycinemax*, et nulle chez *Mucuna pruriens*. Quant à la mesure de l'activité nitrogénastique par les plantules ayant formé des nodosités, elle a été mesurée sur les racines des plantules de *Vigna sinensis*, car c'est avec cette espèce que nous avons obtenu les meilleurs résultats et que nous pouvions comparer l'efficacité

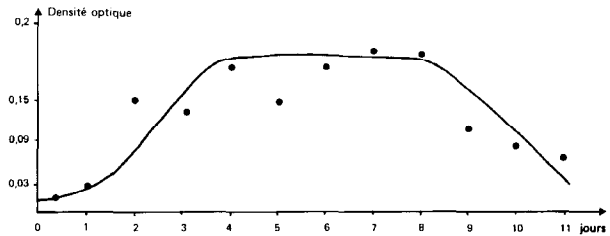
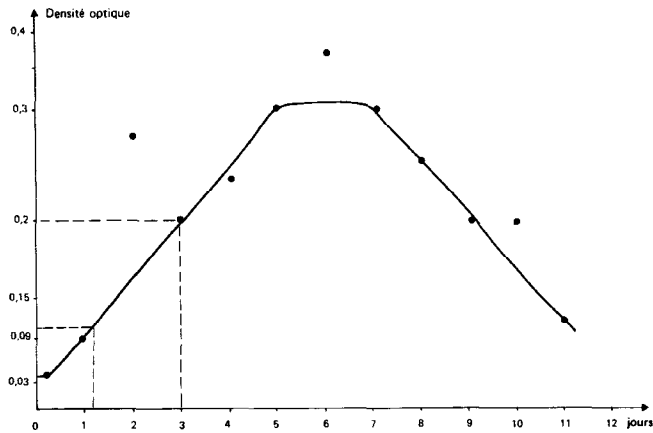


Fig. 4 e, f. — A gauche : Courbe de croissance de la souche Pso pal. 1 (*Psophocarpus palustris*) ; t.g. = 2 j. A droite : Courbe de croissance de la souche Tep. brac. 1 (*Tephrosia bracteolata*) ; t.g. = 1,5 j.

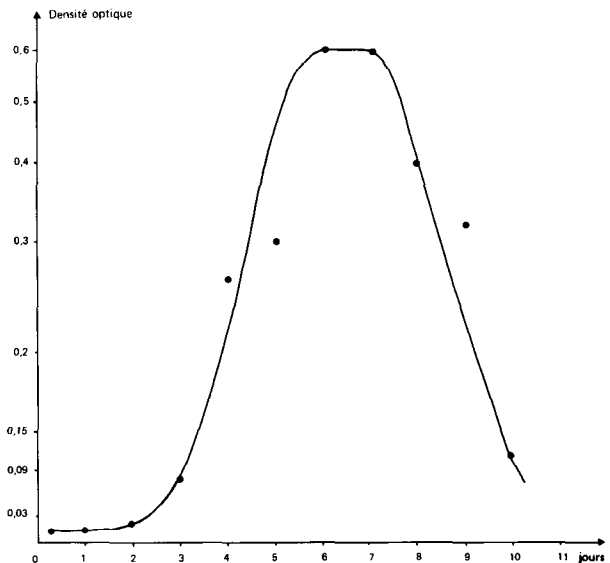
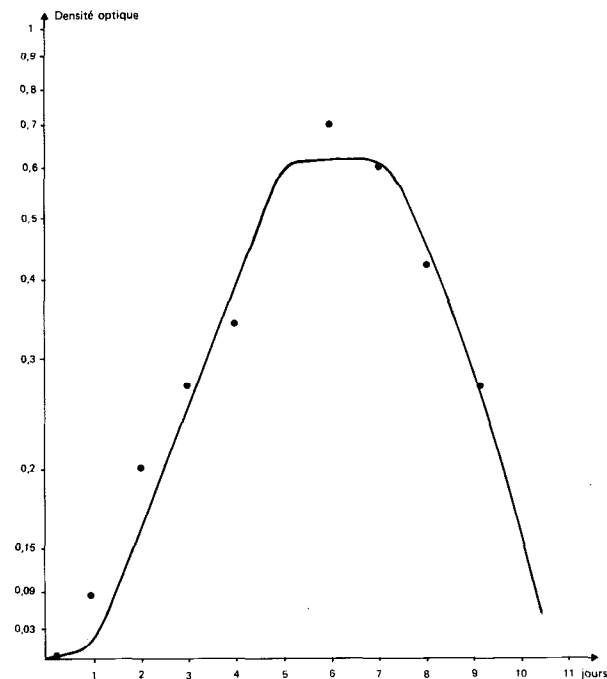


Fig. 4 g, h. — A gauche : Courbe de croissance de la souche Vig. rac. 2 (*Vigna racemosa*) ; t.g. = 1 j. A droite : Courbe de croissance de la souche Vig. sin. A 4 (*Vigna sinensis*) ; t.g. = 1 j.

de souches différentes vis-à-vis de la même plante hôte, qui est en outre une variété sélectionnée, c'est-à-dire que la variabilité génétique de l'un des partenaires de la symbiose était réduite au maximum.

2.5. DÉNOMBREMENT DES *Rhizobium* LIBRES DANS LE SOL

Le dénombrement des *Rhizobium* qui constituent dans le sol une fraction négligeable de la population

microbienne, se fait indirectement, en utilisant leur capacité de former des nodosités sur la Légumineuse spécifique. Le principe de cette méthode indirecte de mise en évidence et de dénombrement a été suivi par de nombreux chercheurs (Vincent, 1958, 1962; Vincent, et al., 1962; Brockwell, 1963; Date, 1968) qui se sont surtout intéressés à l'évaluation des populations de *Rhizobium* dans le sol et à leur évolution dans ce milieu.

TABLEAU VII
ACIDIFICATION OU ALCALINISATION DU MILIEU DE CULTURE
PAR LES SOUCHES DE *RHIZOBIUM* ISOLEES

Légumineuses	Désignation de la souche	pH mesuré	Propriété de la souche
<i>Aeschynomene indica</i>	Aes. ind. 3	5,2	acidifiante
<i>Alysicarpus ovalifolius</i>	Aly. ova. 4	5,2	acidifiante
<i>Alysicarpus rugosus</i>	Aly. rug. 1	5,6	acidifiante
	Aly. rug. 3	4,2	acidifiante
<i>Crotalaria retusa</i>	Cro. ret. 1	4,5	acidifiante
	Cro. ret. 3	5,5	acidifiante
<i>Desmodium asperum</i>	Des. asp. 4	4,0	acidifiante
	Des. asp. 12	4,6	acidifiante
<i>Indigofera astragalina</i>	Ind. ast. 7	4,7	acidifiante
	Ind. ast. 8	5,9	acidifiante
<i>Indigofera nummulariifolia</i>	Ind. num. 5 B	4,9	acidifiante
	Ind. num. 9	5,8	acidifiante
<i>Psophocarpus palustris</i>	Pso. pal. 1	4,25	acidifiante
	Pso. pal. 4	4,9	acidifiante
<i>Sesbania leptocarpa</i>	Ses. lep. 2	4,45	acidifiante
	Ses. lep. 3	5,75	acidifiante
<i>Sesbania pachycarpa</i>	Ses. pac. 2	5,5	acidifiante
<i>Tephrosia bracteolata</i>	Tep. brac. 1	4,3	acidifiante
<i>Vigna racemosa</i>	Vig. rac. 2	8,2	alcalinisante
	Vig. rac. 5	5,6	acidifiante
<i>Vigna reticulata</i>	Vig. ret. 2	8,5	alcalinisante
	Vig. ret. 9	5,1	acidifiante
<i>Vigna sinensis</i>	Vig. sin. A 2	7,5	alcalinisante
	Vig. sin. A 4	7,8	alcalinisante

TABLEAU VIII
RESULTATS DES INOCULATIONS CROISEES

SOUCHE ET LEGUMINEUSE D'ORIGINE	LEGUMINEUSE INOCULEE	Galégées	Génistées	Hédysarées	Phaséolées				
		<i>Sesbania leptocarpa</i>	<i>Crotalaria retusa</i>	<i>Desmodium asperum</i>	<i>Mucuna pruriens</i>	<i>Psophocarpus palustris</i>	<i>Vigna racemosa</i>	<i>Vigna sinensis</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Indigofera astragalina</i>	Ind. ast. 7	+	+	I.	—	—	+	+	I.
	Ind. ast. 8	+	+	I.	—	—	+	+	I.
<i>Indigofera nummulariifolia</i>	Ind. num. 5B	+	+	—	—	—	+	+	+
	Ind. num. 9	+	+	—	—	+	+	+	+
<i>Sesbania leptocarpa</i>	Ses. lep. 2	+	+	+	—	+	+	+	I.
	Ses. lep. 3	+	+	+	—	+	+	+	+
<i>Crotalaria retusa</i>	Cro. ret. 1	+	+	+	—	—	+	+	—
	Cro. ret. 3	+	+	+	—	—	+	+	—
<i>Desmodium asperum</i>	Des. asp. 4	—	+	+	—	—	+	+	+
	Des. asp. 12	+	+	+	—	—	+	+	+
<i>Alysicarpus rugosus</i>	Aly. rug. 1	+	+	+	—	—	+	+	—
	Aly. rug. 3	+	+	+	—	—	+	+	—
<i>Aeschynomene indica</i>	Aes. ind. 3	+	+	—	+	—	+	+	—
<i>Vigna racemosa</i>	Vig. rac. 2	+	+	+	—	—	+	+	—
	Vig. rac. 5	+	+	+	—	—	+	+	—
<i>Vigna reticulata</i>	Vig. ret. 2	+	+	+	—	—	+	+	+
	Vig. ret. 9	+	+	+	—	+	+	+	+
<i>Psophocarpus palustris</i>	Pso. pal. 1	+	—	+	—	+	+	+	—
	Pso. pal. 4	+	+	+	—	+	+	+	—
<i>Arachis hypogaea</i>	C.B. 756	+	—	—	—	—	—	—	—

+ : formation de nodosités. I : illisible. — : pas de nodosités.

TABLEAU IX
ACTIVITE NITROGENASIQUE DES PLANTULES DE
VIGNA SINENSIS INOCULEES ET AYANT FORME DES
NODOSITES

Désignation de la souche	Localité	Activité nitrogénasique (nMC ₂ H ₄ /g/h)	Remarques*
Aes. ind. 3	Sotuba	36 536	M
Aly. rug. 1	Lido	5 022	L
Crot. ret. 1	Sotuba	51 118	Ef
Crot. ret. 3	Sotuba	103 412	H.
Des. asp. 4	Sotuba	87 537	Ef
Des. asp. 12	Sotuba	80 516	Ef
Ind. ast. 7	Sotuba	148 548	H.
Ind. ast. 8	Sotuba	136 314	H.
Ind. num. 5B	Sotuba	8 875	L.
Ind. num. 9	Sotuba	48 450	M.
Pso. pal. 1	Lido	9 239	L.
Pso. pal. 4	Lido	0	0
Ses. lept. 2	Lido	50 244	Ef
Ses. lept. 3	Lido	37 028	M.
Ses. pac. 2	Lido	118 784	M.
Vig. rac. 2	Sotuba	45 875	M.
Vig. rac. 5	Sotuba	55 706	Ef
Vig. ret. 2	Sotuba	40 960	M.
Vig. ret. 9	Sotuba	5 026	L.
Vig. sin. A2	Sotuba	3 662	L.
Vig. sin. A4	Sotuba	378	L.

* H. hautement efficiente (150 000 à 100 000 nMC₂H₄/g/h) ;
Ef. efficiente (100 000 à 50 000 nMC₂H₄/g/h) ;
M. moyennement efficiente (50 000 à 10 000 nMC₂H₄/g/h) ;
L. légèrement efficiente (< 10 000 nMC₂H₄/g/h).

Le dénombrement a été fait pour le sol de Sotuba, dans le cas d'échantillons prélevés à une profondeur de 0 à 10 cm; la Légumineuse choisie pour le dénombrement fut le *Desmodium asperum*, à cause de sa germination très rapide et du lot important de graines dont nous disposions. L'inoculation des plantules suivant la technique déjà décrite (vases de végétation), se fait par les 6 suspensions-dilutions de sol de 5 en 5, et à raison de 4 répétitions par dilution. Le nombre le plus probable de germes a été déterminé en utilisant les tables de Brockwell (1963) :

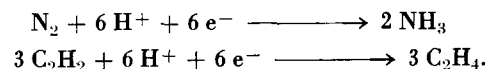
Date du prélèvement	Nombre de plus probable de Rhizobium/g de sol
30 avril 1975 (après 20 mm de pluie)	10 à 68
30 juin 1975 (après 123 mm de pluie)	31 à 208

Ce sol paraît très pauvre en *Rhizobium*, mais leur nombre peut augmenter d'une saison à une autre. En avril, la température moyenne enregistrée est de 31 °C, mais elle atteint quelquefois des valeurs extrêmes de 40 et 42 °C, qui sont léthales pour les *Rhizobium*. Outre la température, l'humidité du sol joue un rôle important dans la survie des *Rhizobium*. Selon Parker et Chatel (1973) cette survie durant l'été et l'automne, en Australie, varie suivant les souches; ces auteurs ont pu noter à 14 h des températures comprises entre 41 °C et 62 °C à la surface du sol, à l'ombre, qui sont léthales pour la plupart des *Rhizobium*. Cette opinion est partagée par Vincent (1974). Bowen et Kennedy (1959) ont montré que *Rh. trifolii* était sensible à des températures de l'ordre de 40 °C, dans le sol humide. On a émis l'hypothèse que les *Rhizobium* pouvaient migrer dans les horizons édaphiques plus profonds, à quelques centimètres, et induire la formation de nodosités sous le collet des plantes. Fred *et al.* (1932), MARSHALL (1968) pensent que les particules argileuses du sol jouent un rôle important dans la survie des *Rhizobium* dans des conditions défavorables.

Il est très probable que dans les sols du Mali, en région soudano-sahélienne, les températures très élevées des horizons édaphiques superficiels expliquent dans une large mesure la rareté de ces bactéries après la saison pluvieuse.

3. ACTIVITÉ NITROGÉNASTIQUE *IN SITU* DE L'ASSOCIATION LÉGUMINEUSE-RHIZOBIUM

En 1966, Dilworth, puis Schollhörn et Burris découvrirent que le complexe enzymatique fixateur d'azote (nitrogénase) catalysait la réduction de C₂H₂ en C₂H₄. C'est en fait l'une des enzymes les moins spécifiques que l'on connaisse. En 1967, Hardy et Knight ont proposé l'utilisation de la vitesse de réduction de C₂H₂ en C₂H₄. On sait que, lors de la réduction de N₂ en NH₃, 6 e⁻ sont mis en jeu :



Il se forme théoriquement 3 molécules de C₂H₄ là où une molécule d'azote aurait été fixée à condition de fournir à la nitrogénase de l'acétylène à la place du N₂. Théoriquement on se trouve ramené à un dosage d'éthylène. Cette méthode a l'avantage sur les précédentes (utilisation de ¹⁵N par exemple) d'être plus sensible et moins onéreuse.

3.1. MESURES *in situ* DE L'ACTIVITÉ NITROGÉNASIQUE DE QUELQUES LÉGUMINEUSES SPONTANÉES

Les mesures d'activité nitrogénasique ont concerné cinq espèces parmi les Légumineuses spontanées croissant dans les pâturages naturels du CNRZ de Sotuba. Ces mesures de fixation *in situ* ont été effectuées entre les mois de juin et d'octobre 1975, à divers stades du développement des plantes, en utilisant la méthode de réduction de C_2H_2 en C_2H_4 . Deux protocoles expérimentaux ont été utilisés.

3.1.1. La méthode du cylindre

Préconisée par Balandreau et Dommergues (1973), mais le cylindre employé est d'une seule pièce; il s'agit d'un cylindre de chlorure de polyvinyle de 15 cm de haut et 15,5 cm de diamètre, recouvert par un disque de « plexiglass » transparent percé d'un trou bouché par un septum de caoutchouc (fig. 5). Balandreau préconise l'utilisation du carbure de calcium comme source de C_2H_2 , mais nous avons injecté de l'acétylène dans le dispositif à raison de 1/10^e du volume total de l'enceinte. Le premier prélèvement de gaz (T_0) est fait 60 mn après l'injection (temps de diffusion du gaz) et le second, 30 mn après le premier (T_{30}). Les échantillons sont rapportés au laboratoire et analysés au chromatographe en phase gazeuse.

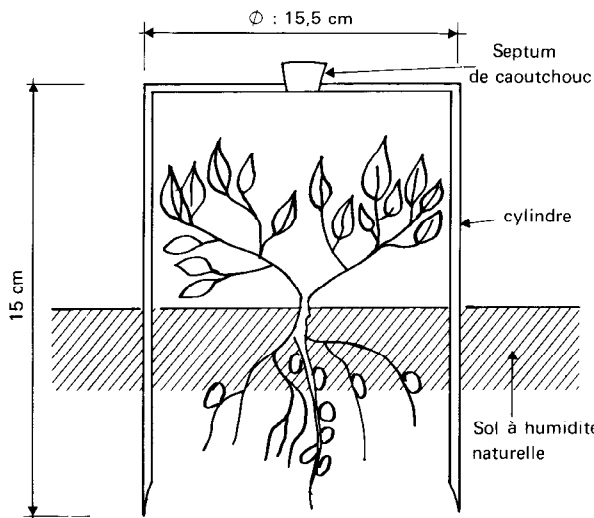


Fig. 5. — Coupe schématique du dispositif de mesure *in situ* de l'activité nitrogénasique (cylindre de Balandreau modifié).

3.1.2. La méthode du flacon (ou méthode de Stewart) consiste à déterrer la plante, à couper la partie supérieure de celle-ci et à placer le système radical, débar-

raissé rapidement du sol, dans un flacon à sérum de 500 ml dans lequel on introduit 10 % de C_2H_2 . Le premier prélèvement (T_0) est fait aussitôt après injection. Après 30 mn d'incubation, on prélève, à l'aide d'une seringue 20 ml de l'atmosphère d'incubation, que l'on injecte dans une fiole à sérum de 10 ml dans laquelle on a fait au préalable le vide (prélèvement T_{30}). Les dosages sont effectués dès le retour au laboratoire à l'aide d'un chromatographe à phase gazeuse (Perkin Elmer 990) sur colonne de sphérosil de 2 m de long et 1/8^e de pouce de diamètre.

La méthode du cylindre a servi uniquement à la mesure de l'activité nitrogénasique *in situ* durant le cycle nyctéméral complet dans le cas de *Indigofera nummulariifolia* (5 septembre 1975 : période de fructification optimale de la plante), afin de déterminer les périodes de fixation maximale d'azote atmosphérique (voir fig. 6).

In situ, les autres mesures ont été faites pour les quatre autres espèces de Légumineuses spontanées ainsi que pour *I. nummulariifolia*, à l'aide de la technique du flacon, entre 11 h et 13 h, deux fois par mois pour chaque espèce, de juin à octobre 1975, afin de suivre cette fixation en fonction de l'évolution du cycle végétatif et reproducteur des plantes.

Nous avons vérifié dans le cas de *I. nummulariifolia* que la réduction de C_2H_2 en C_2H_4 était linéaire pendant 30 mn (fig. 7); les mesures pouvaient donc être faites à des intervalles de 30 mn pendant deux heures (entre 11 h et 13 h), soit une période pendant laquelle les nodosités demeurent dans un état physiologique satisfaisant.

Pour chaque mesure au temps T_0 , T_{30} , T_{60} , T_{90} et T_{120} , on prélevait 10 systèmes radicaux de 10 plantes de la même espèce qu'on introduisait dans 10 flacons à sérum. Les résultats, exprimés en nanomoles de C_2H_4 par gramme de nodosité sèche et par heure (nM C_2H_4 /g/h), indiqués sur les courbes de fixation, représentent la moyenne de ces 10 mesures.

L'étude du cycle nyctéméral (fig. 6) a consisté à suivre les fixations d'azote, *in situ*, pendant 24 heures, de 6 h à 6 h. Des études faites sur le soja indiquent que cette fixation présente un seul maximum diurne (Mague et Burris, 1972), tandis qu'avec l'arachide on note deux maximums, l'un de jour et le second de nuit (Balandreau, Miller et Dommergues, 1974).

Nos propres mesures faites, le 5 septembre 1975, sur *Indigofera nummulariifolia* sont en faveur de l'existence de deux maximums. Parallèlement à cette activité nitrogénasique, nous avons effectué des mesures d'éclairement et de température de l'air. La courbe de variation de la fixation d'azote est étroitement liée à la photo-

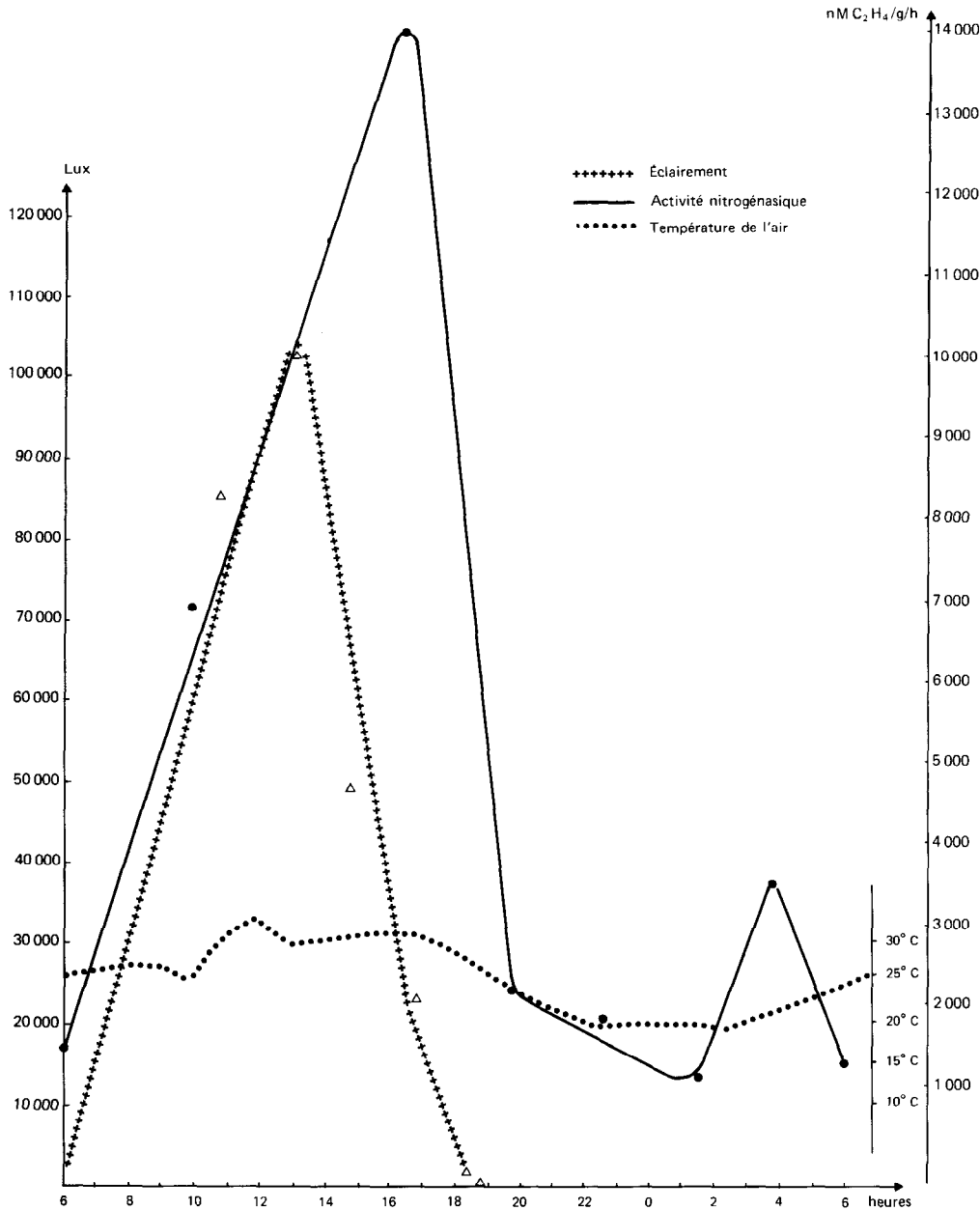


Fig. 6. — Activité nitrogénasique au cours du cycle nyctéméral complet de *Indigofera nummulariifolia*.

synthèse (Bergersen, 1970; Balandreau et Villemin, 1973; Sloger *et al.*, 1974); on enregistre vers 13 h le maximum d'éclairement et de température de l'air, mais seulement 3 heures plus tard, vers 16 h, le maximum de la fixation d'azote; la courbe traduit ensuite la diminution d'intensité du phénomène, le minimum se situant vers 01 h; on enregistre à 04 h le

second maximum de fixation. Balandreau et Villemin (1973), ont estimé qu'un délai de 3 heures était nécessaire pour la migration des photosynthétats des feuilles aux racines et que le premier maximum d'activité nitrogénasique s'expliquait par l'exsorption au niveau des racines des glucides nouvellement synthétisés; que le second maximum nocturne était lié à l'exsorption

dans la rhizosphère de produits d'hydrolyse des réserves amylacées accumulées pendant la phase diurne. Entre l'arrêt (19-20 h) et le début de cette hydrolyse, un arrêt de la formation des glucides migrants pourrait expliquer la dépression d'activité nitrogénasique enregistrée entre 0 h et 01 h.

La courbe de variation de l'activité nitrogénasique en fonction du temps (fig. 7) n'est pas linéaire au-delà de 30 minutes, alors que certains auteurs (Sprent, 1969) ont estimé que c'était le cas pendant au moins 8 heures avec des nodosités de soja, à condition que celles-ci occupent moins de 14 % du volume de l'enceinte. La courbe de la fig. 7 montre en outre que l'activité nitrogénasique reste tout-à-fait satisfaisante durant deux heures; c'est pourquoi les expériences suivantes ont été effectuées pendant une durée équivalente.

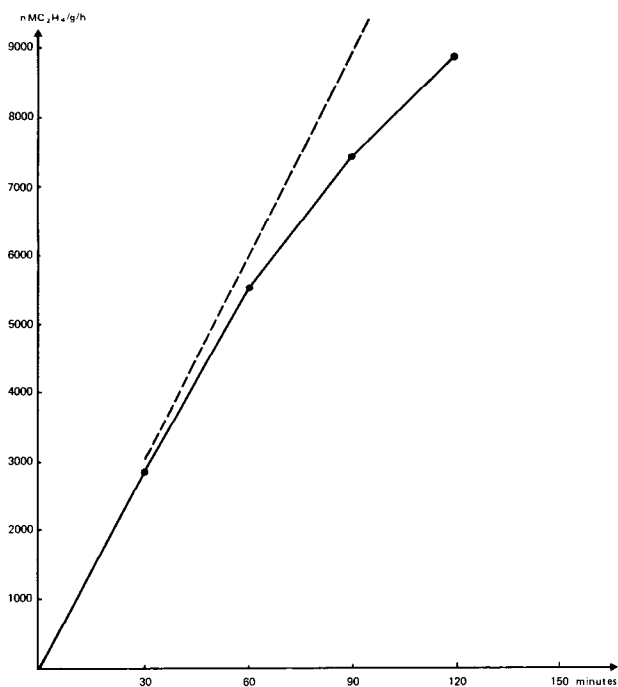


Fig. 7. — Influence du temps d'incubation sur l'activité nitrogénasique de *Indigofera nummulariifolia* (méthode du flacon).

L'étude de l'activité nitrogénasique *in situ* et de son évolution en fonction du cycle végétatif a concerné les 5 espèces suivantes :

a. *Vigna racemosa* (fig. 8)

Les *Vigna* ont une croissance très lente, bien que les premiers pieds apparaissent dès le début des pluies;

la floraison et la fructification se situent au cours de la première quinzaine du mois d'octobre qui correspond à la fin de la saison humide. L'activité nitrogénasique maximale (25 309 nM C₂H₄/g/h) est enregistrée durant le premier tiers du mois d'octobre.

b. *Zornia glochidiata* (fig. 9)

Le cycle végétatif de cette espèce est relativement plus court que celui du *Vigna*, car il s'étend du début de l'hivernage au 10 octobre; à ce moment, tous les pieds observés sont desséchés, les fruits étant alors entièrement formés. Cette Légumineuse est héliophile, sa taille est de 15 cm au plus et sa biomasse faible. L'activité nitrogénasique maximale est de 20 000 nM C₂H₄/g/h et elle est enregistrée à la fin d'août, au moment de la floraison et au début de la fructification. Elle diminue par la suite, pour s'annuler vers le 10 octobre.

c. *Desmodium asperum* (fig. 10)

Ce serait une Légumineuse vivace introduite au Mali, et que l'on rencontre actuellement à l'état spontané. Sa taille peut atteindre quelquefois 90 cm. Le cycle végétatif se termine vers la fin de septembre ou au début d'octobre; mais la plante ne meurt pas, seules les nodosités disparaissent. L'activité nitrogénasique maximale de 25 000 nM C₂H₄/g/h est enregistrée à la floraison et au début de la fructification, c'est-à-dire vers la fin du mois de septembre.

d. *Indigofera nummulariifolia* (fig. 11)

Plante prostrée, avec une biomasse importante, elle pousse en mélange avec *Zornia glochidiata* (du moins à Sotuba). Son cycle végétatif très court va de la mi-juin au début octobre. A la période de floraison, on a enregistré une activité nitrogénasique de 30 000 nM C₂H₄/g/h. Après la formation des fruits, les nodosités commencent à se nécroser et la plante se dessèche une fois les fruits mûrs.

e. *Vigna reticulata* (fig. 12)

Il s'agit d'une espèce spontanée de *Vigna*, à port rampant; sa floraison intervient à la fin de la saison des pluies, au début du mois d'octobre. A la différence des quatre autres espèces de Légumineuses, l'activité nitrogénasique maximale est observée *avant* la floraison, à la fin du mois d'août; cette activité diminue ensuite sérieusement. Cette observation curieuse nous a conduit à examiner de plus près le système radical des plantes de cette espèce et nous avons alors constaté que les nodosités globuleuses, efficaces et réparties sur l'ensemble des racines, cédaient la place, après la

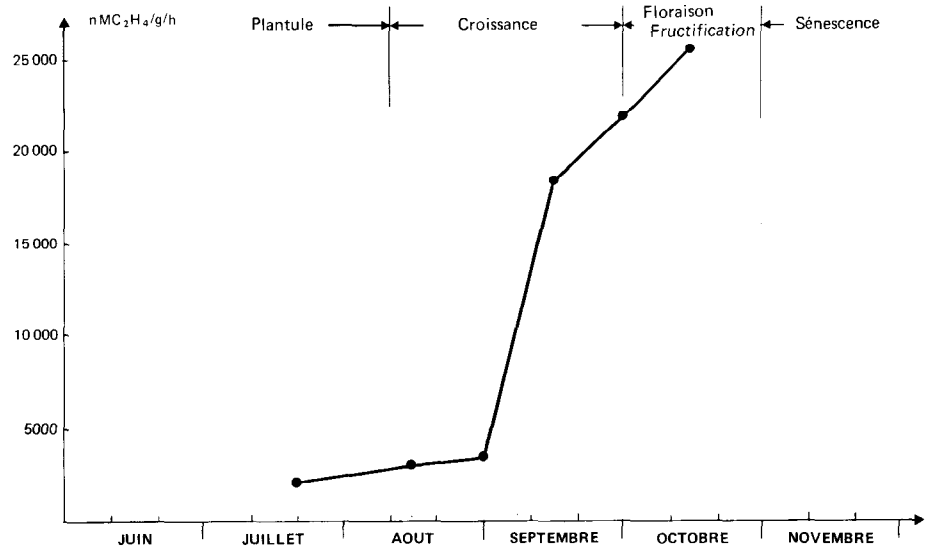
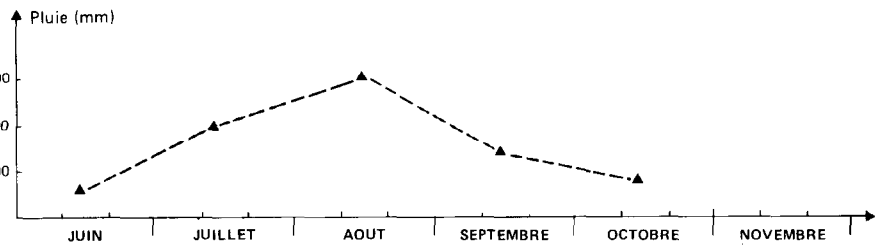


Fig. 8. — Activité nitrogénasique de *Vigna racemosa* en fonction du cycle végétatif.

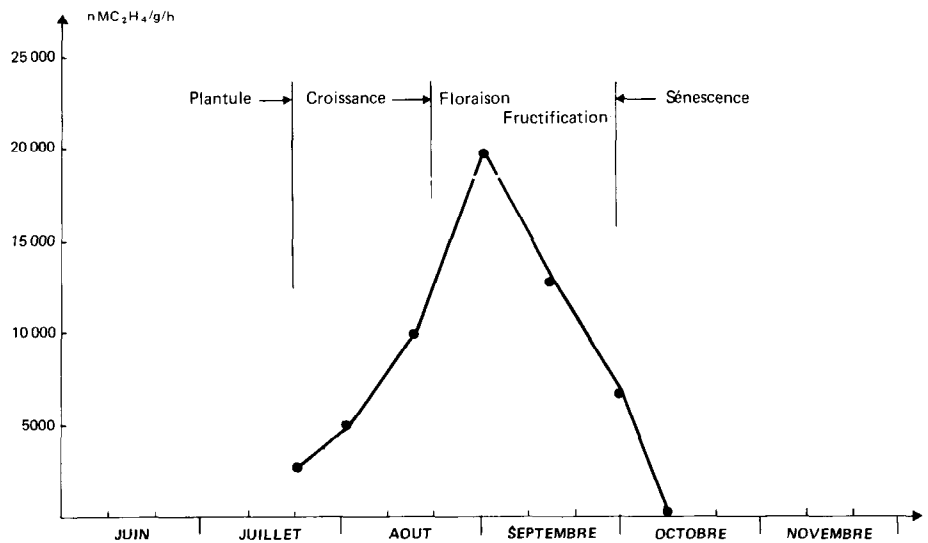
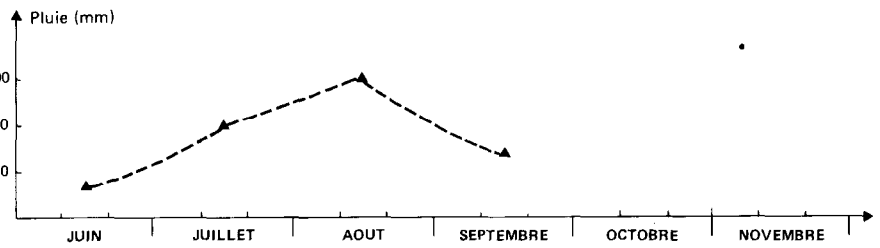


Fig. 9. — Activité nitrogénasique de *Zornia glochidiata* en fonction du cycle végétatif.

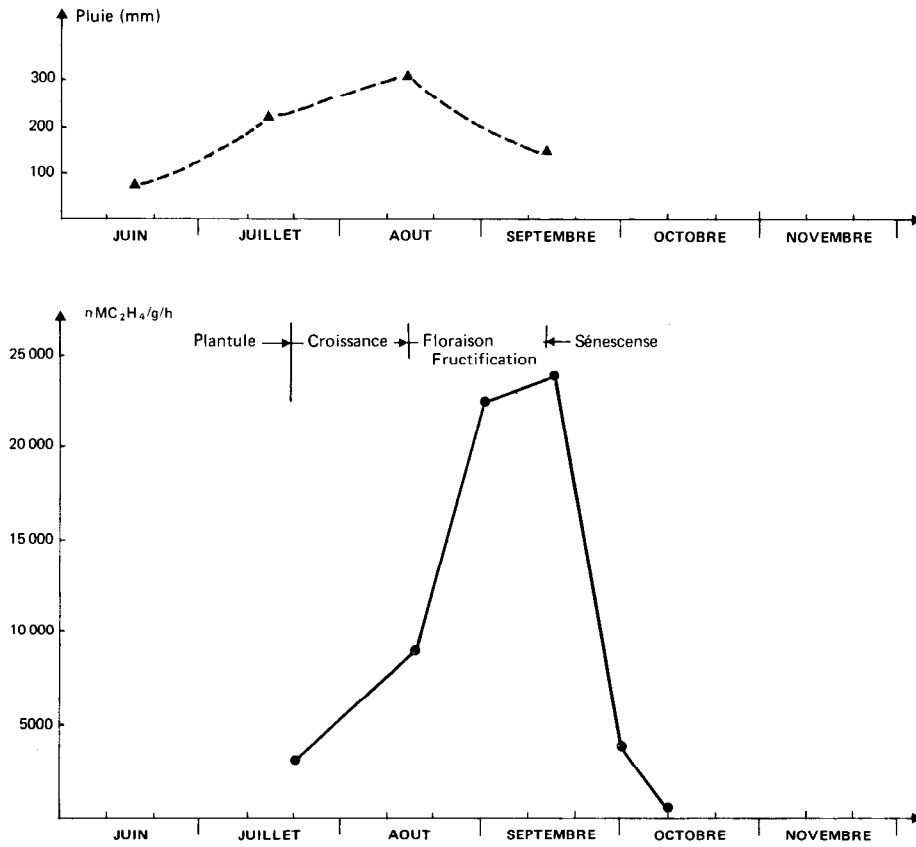


Fig. 10. — Activité nitrogénasique de *Desmodium asperum* en fonction du cycle végétatif.

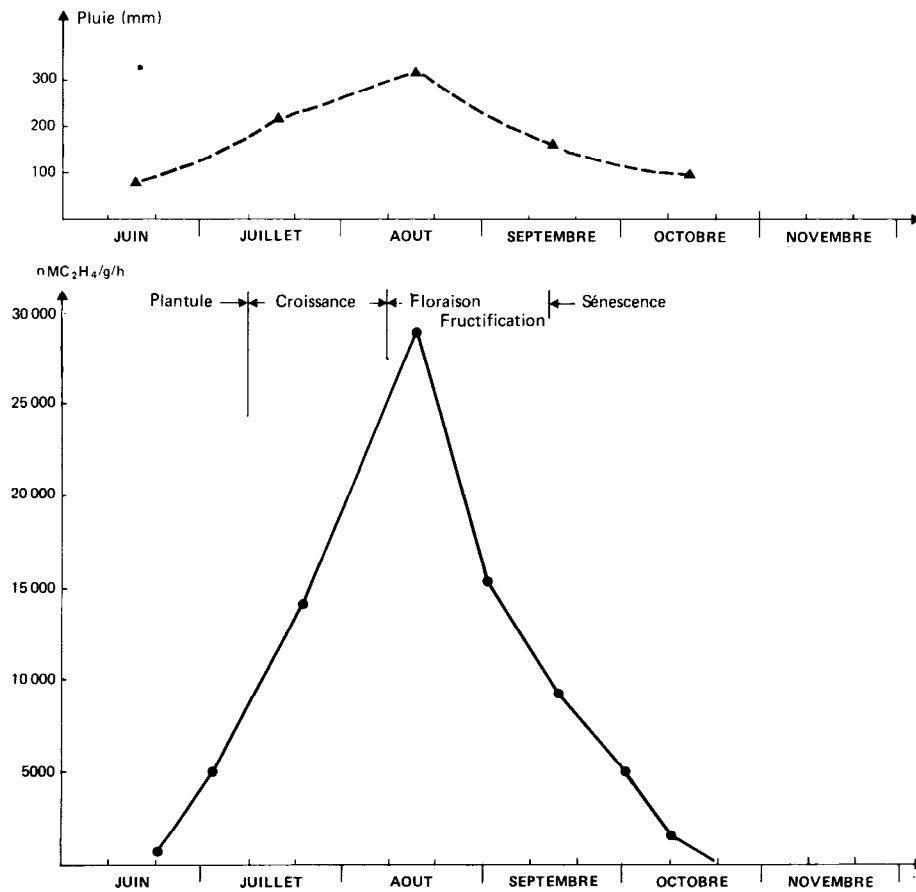


Fig. 11. — Activité nitrogénasique de *Indigofera nummulariifolia*, en fonction du cycle végétatif.

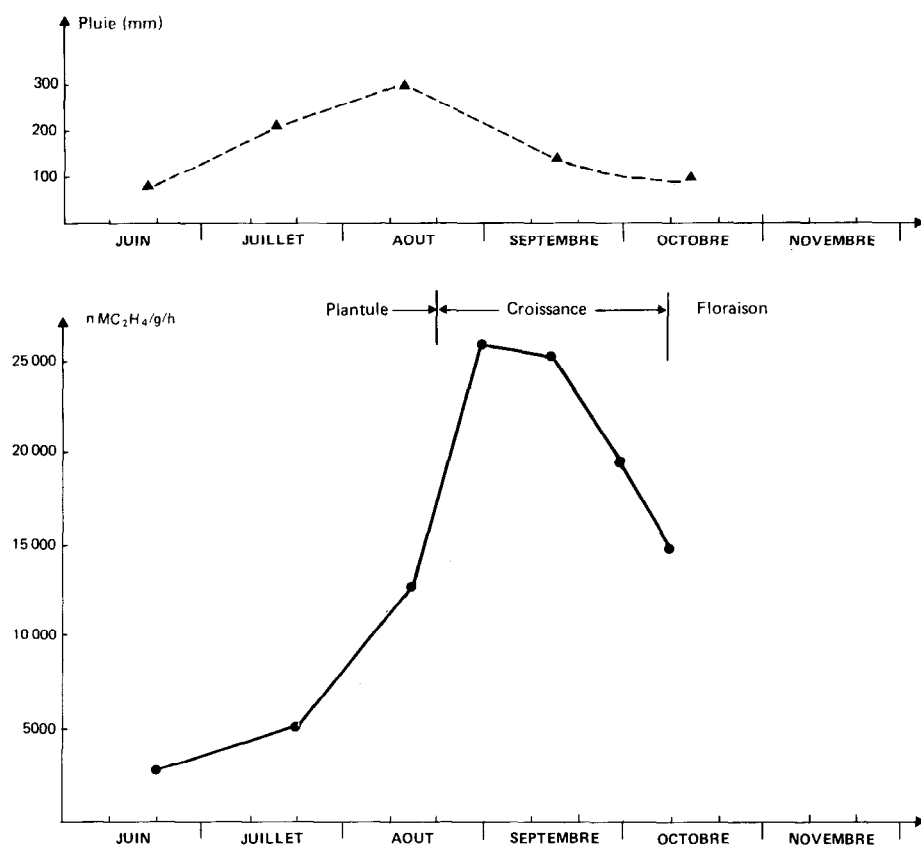


Fig. 12. — Activité nitrogénasique de *Vigna reticulata*, en fonction du cycle végétatif.

fin du mois d'août, à des excroissances situées sur ces racines et apparemment inefficaces. Il y a donc là un fait d'observation à vérifier.

4. CONCLUSIONS

Les espèces de Légumineuses spontanées, dont quelques-unes sont connues pour leur valeur fourragère, dans les deux biotopes choisis pour notre étude, forment des nodosités qui ont pu être observées surtout lors de la saison des pluies du climat soudano-sahélien de cette région. Ces nodosités se présentent, suivant les espèces, sur la racine principale ou sur les racines secondaires; leur morphologie est variable: punctiformes, ovoïdes, oblongues ou coralloïdes. Nous avons isolé de ces nodosités plusieurs souches de *Rhizobium* dont 24 correspondant à 13 espèces de Légumineuses sont actuellement maintenues en culture pure. Ces souches ont été examinées sur des préparations microscopiques pour en vérifier l'identité, cultivées en milieu liquide pour en établir la courbe de croissance, ino-

culées aux germinations des espèces dont elles avaient été auparavant isolées, et enfin inoculées à des plantules de quelques Légumineuses, afin de connaître le groupe d'inoculation croisée auquel il convenait de les rattacher (cf. tabl. VII). S'agissant de souches capables de provoquer la formation de nodosités sur les racines de deux espèces de *Vigna*, l'une cultivée (*V. sinensis*), l'autre spontanée (*V. racemosa*), et bien entendu sur des germinations de la même espèce que celle ayant servi à leur isolement, on en a conclu qu'il s'agissait de *Rhizobium* à rattacher au vaste groupe *cow-pea*. La croissance de ces souches (24 examinées en milieu liquide et sur milieu solide) était uniformément lente, comme on le suppose généralement pour les *Rhizobium* de ce groupe. Pour comparer l'efficacité fixatrice de 21 souches (y compris une souche de référence australienne C.B. 756, isolée de nodosités d'arachide) nous avons mesuré l'activité nitrogénasique des plantules de *Vigna sinensis* (c'est-à-dire une variété cultivée sélectionnée, donc une plante hôte présentant les propriétés requises de stabilité génétique) auxquelles avaient été inoculées les souches,

en employant la technique des vases de végétation en milieu aseptique. La nodulation des plantules a été complète et les mesures d'activité nitrogénasique par la technique de réduction de l'acétylène en éthylène, en chromatographie en phase gazeuse, ont permis de distinguer des souches très efficaces, efficaces, moyennement et peu efficaces (cf. tabl. IX). A cet égard, la grande variation au sein des souches de ce groupe *Rhizobium* se trouvait vérifiée.

Il s'est agi enfin de retrouver cette activité nitrogénasique *in situ*, c'est-à-dire par les plantes elles-mêmes dans les conditions naturelles, afin de juger de leur contribution éventuelle à la fertilisation naturelle du sol en azote et par suite de l'intérêt de leur utilisation fourragère et pastorale.

La mesure de l'activité nitrogénasique et de son évolution au cours d'un cycle nyctéméral complet, dans le cas de *Indigofera nummulariifolia*, en septembre 1975, par la méthode du cylindre (Balandreau et Dommergues, 1973), a fait apparaître, à l'instar des résultats obtenus par ces chercheurs, l'existence de deux maximums d'activité, l'un diurne et l'autre au cours de la nuit. Auparavant, de juin à octobre 1975, pour quatre autres espèces de Légumineuses spontanées, les mesures d'activité nitrogénasique avaient été faites entre 11 h et 13 h, à des intervalles de 30 minutes; et cela sur l'ensemble du système radical et dans les conditions naturelles, par la méthode du flacon à sérum. Ces mesures furent donc effectuées au cours du cycle végétatif des plantes, c'est-à-dire avant la floraison et le début de la fructification, au moment de ces deux phases capitales et à la suite de ces dernières (fig. 8 à 12) en procédant aux répétitions d'usage. Le fait d'avoir, pour cinq espèces de Légumineuses représentatives (il ne nous a pas été possible faute de temps et de moyens d'étendre ces mesures à toutes les espèces choisies, douze au total), une activité nitrogénasique maximale au moment de la floraison et au début de la fructification (c'est-à-dire d'une façon générale vers la fin de la saison des pluies) n'est guère surprenante, car c'est là un résultat bien établi chez plusieurs espèces de Légumineuses cultivées; mais il restait à le retrouver chez les plantes spontanées tropicales. Par ailleurs, cette activité présentait une intensité élevée (de l'ordre de 30 000 nM C₂H₄/g/h pour *Indigofera nummulariifolia*) et probablement inférieure au maximum, car l'étude du cycle nyctéméral montre que ce maximum est atteint vers 16 h plutôt que vers 13 h (on avait en effet mesuré l'activité nitrogénasique à 13 h). Ces résultats justifient, au moins dans les conditions favorables de la période humide, l'hypothèse d'une contribution importante de ces Légumineuses à la teneur en azote du sol et à la fertilité de ce dernier. Dans des conditions d'irrigation permettant de limiter les effets

léthaux des hautes températures sur les *Rhizobium* dans les horizons édaphiques superficiels, certaines Légumineuses pourraient améliorer la valeur fourragère des pâturages, tout en protégeant le sol, grâce à leur port prostré (c'est le cas de *Indigofera astragalina*, qui est appréciée du cheptel ovin et dont une souche de *Rhizobium* s'est révélée particulièrement efficace, 148 548 nM C₂H₄/g/h).

En conclusion, ces premières investigations sur les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote des espèces de Légumineuses spontanées du Mali apportent la preuve de l'existence de *Rhizobium* efficaces et d'une activité nitrogénasique *in situ* par les plantes, dont les caractères généraux rappellent ceux du phénomène étudié dans les régions tempérées, mais qui pourrait donner lieu en milieu tropical à des applications de sélection des souches et d'inoculation en vue de l'amélioration des pâturages et de leur valeur fourragère. Malgré les contraintes de nature matérielle, qui nous ont empêché de multiplier les essais et d'étudier le plus grand nombre d'espèces, nos résultats, obtenus en prenant les précautions habituelles d'échantillonnage et de lots témoins, nous semblent significatifs et devraient permettre à l'avenir une étude approfondie de la variation au sein des souches isolées et des tentatives d'inoculation des graines de Légumineuses spontanées en vue d'atteindre une fixation optimale *in situ*.

REMERCIEMENTS

L'auteur exprime sa gratitude au Professeur Sasson qui a dirigé ses recherches, à la Direction Générale de l'ORSTOM et aux chercheurs du laboratoire de microbiologie des sols de l'ORSTOM à Dakar, pour leur aide précieuse pendant les trois années qu'ont duré ses recherches et pour la publication de ses résultats.

Manuscrit reçu au Service des Publications le 20 avril 1977

BIBLIOGRAPHIE

- ADAM (J. C.), 1959. — Contribution à l'étude floristique des pâturages du Soudan. Vigot Frères Ed., Paris.
- ALLEN (O. N.), ALLEN (E. K.), 1936. — Root nodule bacteria of some tropical Leguminous plants : I. Cross inoculation studies with *Vigna sinensis* L. *Soil Science*, 42 : 61-77.
- ALLEN (O. N.), ALLEN (E. K.), 1939. — Root nodule bacteria of some tropical Leguminous plants : II. Cross inoculation tests within the cowpea group. *Soil Science*, 47 : 63-76.

- ALLEN (O.N.), ALLEN (E.K.), 1940. — Response of the peanut plant to inoculation with Rhizobia, with special reference to morphological development of the nodules. *Botanical Gazette*, 102, 1 : 121-142.
- ALLEN (O.N.), ALLEN (E.K.), 1947. — A survey of nodulation among Leguminous plants. *Soil Science*, 12 : 203-208.
- ALLEN (O.N.), 1949. — Experiments in soil. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota, U.S.A.
- BAGNOULS (F.), GAUSSEN (H.), 1958. — Saison sèche et indice xérothermique. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse*, 88 : 193-239.
- BALANDREAU (J.), DOMMERCUES (Y.), 1973. — *Bull. Ecol. Res. Commun.* (Stockholm), 17 : 247-254.
- BALANDREAU (J.), VILLEMIN (G.), 1973. — Fixation biologique de l'azote moléculaire en savane de Lamto (Basse Côte d'Ivoire). Résultats préliminaires. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, 10 : 25-33.
- BALANDREAU (J.), MILLIER (C.), DOMMERCUES (Y.), 1974. Diurnal variations of nitrogenase activity in the field. *Applied Microbiology*, 27, 4 : 662-665.
- BERGERSEN (F.J.), 1970. — The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene-reduction essay. *Aust. J. Biol. Sci.*, 23 : 1015-1025.
- BERHAUT (R.P.), 1967. — Flore du Sénégal. Librairie Clairafrique, Dakar.
- BONNIER (C.), 1957. — Symbiose *Rhizobium*. Légumineuse en région équatoriale. *INEAC, sér. Sci.*, 72.
- BONNIER (C.), SEEGER (J.), 1958. — Symbiose *Rhizobium*. Légumineuse en région équatoriale. *INEAC, sér. Sci.*, 76 : 88.
- BURTON (J.C.), 1952. — Host specificity among certain plants in cowpea cross inoculation group. *Soil Sci.*, 4 : 356-358.
- BURTON (J.C.), MARTINEZ (C.J.), CURLEY (R.L.), 1972. — Methods of testing and suggested standards for Legume inoculants and preinoculated seed. *Nitragin Sales Corp.*
- CHARREAU (C.), DOMMERCUES (Y.), 1959. — Etude des sols du Centre fédéral de recherches zootechniques. Vigot Frères Ed., Paris.
- CHATEL (D.L.), PARKER (C.A.), 1973. — *Soil Biol. Bioch.*, 5 : 415-423.
- DARS (R.), 1961. — Les formations sédimentaires et les dolérites du Soudan occidental. *Mémoires BRGM*, n° 12.
- DUBEY (H.D.), WOODBURY (R.), RODRIGUEZ (L.R.), 1972. — New records of tropical legume nodulation. *Bot. Gaz.*, 133 (1) : 35-38.
- HARDY (R.W.F.), BURNS (R.C.), HOLSTEN (R.D.), 1973. — Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil. Biol. Bioch.*, 5 : 47-81.
- MACUE (T.H.), BURRIS (R.H.), 1972. — Reduction of C_2H_2 and nitrogen by field grown soybeans. *New Phytol.*, 71 : 275-286.
- NORRIS (D.O.), 1965. — Acid production by *Rhizobium*. A unifying concept. *Plant and Soil*, XXII (2) : 143-166.
- RENAULT (P.), 1970. — Traitement des graines de Légumineuses de couverture. *Oléagineux*, 25 (4) : 205-206.
- RINAUDO (G.), 1972. — Etude de la fixation d'azote dans la rhizosphère du riz. *Rapport ORSTOM*, Dakar.
- SASSON (A.), 1970. — Rôle des micro-organismes dans la biosphère et l'avenir de la microbiologie appliquée. *Trav. Inst. Sc. Chérifien, Rabat (Maroc)*.
- SLOGER (C.), *et al.*, 1974. — Seasonal and diurnal variation in (C_2H_2) fixing activity in field soybeans. IBP, PPN Section International Synthesis meeting (Edinburgh), Cambridge University Press.
- SPRENT (J.), 1969. — Prolonged reduction of C_2H_2 by detached soybean nodules. *Planta (Berl.)*, 88 : 372-375.
- THOMSON (J.A.), VINCENT (J.M.), 1967. — Methods of detection and estimation of Rhizobia in soil. *Plant and Soil*, XXVI (1) : 72-84.
- VADUNINA (A.F.), KORCHAGINA (Z.A.), 1973. — (En russe). Méthodes d'observation, propriétés physico-chimiques des sols. Moscou (URSS).
- VINCENT (J.M.), 1970. — A manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP. Handbook n° 15. Blackwell Sc. Publ. Oxford.