

Fixation symbiotique de l'azote atmosphérique par des Légumineuses cultivées au Mali

M. LAHBIB*
Albert SASSON**
J. RENAUT***

* Microbiologiste, professeur à l'Ecole Normale Supérieure de Bamako, Mali.

** Microbiologiste, UNESCO, Paris, France.

*** Microbiologiste, assistant à la Faculté des sciences de Rabat, actuellement Faculté des sciences de Pau.

Mots-clés : *Rhizobium* - fixation d'azote - *Vigna sinensis* - *Arachis hypogaea* - Mali.

Key words : *Rhizobium* - nitrogen fixation - *Vigna sinensis* - *Arachis hypogaea* - Mali.

INTRODUCTION

Nous avons étudié la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique chez deux espèces de Légumineuses cultivées au Mali : le niébé (*Vigna sinensis*, variétés 465 et 8863) et l'arachide (*Arachis hypogaea*, variété Virginia 28 206). En dénombrant la population des *Rhizobium* libres dans le sol, nous

avons tenté de cerner les effets de certains facteurs climatiques et édaphiques sur leur survie dans le sol. des souches de *Rhizobium* ont été isolées au laboratoire, capables d'induire la formation des nodosités sur les racines de ces deux espèces de Légumineuses ; les relations entre les souches issues de ces plantes et celles de *Rhizobium japonicum* ont été également examinées par la technique des inoculations croisées.

TABLEAU I

Analyse granulométrique des sols*

Echantillon		Argile ($< 2\mu$)	Limon fin ($2 - 20\mu$)	Limon grossier ($20 - 50\mu$)	Sable fin ($50 - 200\mu$)	Sable grossier ($200 - 2000\mu$)
Mars 1975	SSA	7,7	8,4	23,5	48,2	10,5
	SPA	15,6	7,4	16,3	42,9	16,0
	SSV	9,7	7,6	17,0	47,2	17,0
	SPV	11,4	7,7	17,7	47,8	12,8
Juillet 1976	SSA	13,3	8,0	21,7	42,0	13,1
	SPA	13,5	7,3	26,0	39,7	12,1
	SSV	12,6	6,6	18,8	47,8	13,5
	SPV	12,6	6,5	19,9	46,7	12,7

SS : sol de surface

A : arachide

SP : sol profond

V : *Vigna*

* Résultats exprimés en pourcentages du sol sec.

1. CONDITIONS MÉSOLOGIQUES

Le site d'expérimentation retenu est un terrain de 2 100 m² appartenant à l'Institut de Recherches Agronomiques Tropicales et situé à Sotuba, à 7 km à l'est de Bamako. Ce terrain a été divisé en deux parcelles, l'une réservée à la culture de l'arachide, l'autre à celle du niébé, ces deux plantes ayant été cultivées sur ces mêmes parcelles auparavant.

Le terrain est constitué par les alluvions du Niger recouvrant des grès d'origine littorale et datés du Cambrien.

Les résultats des analyses granulométriques et chimiques du sol de surface et de profondeur de chaque parcelle sont consignés dans les tableaux I et II.

Le sol des parcelles est un sol beige à brun clair, sablo-limoneux, riche en éléments fins, répondant au type ferrugineux tropical à C/N de 12 à 13 (AUBERT et BOULAINÉ, 1972) et à pH acide (5,5-6,5). Ce sol est pauvre en azote mais présente un rapport C/N satisfaisant ; il est pauvre en calcium, magnésium et P₂O₅. On note des variations dans sa composition d'une saison à l'autre, et d'une parcelle à l'autre, qui peuvent être attribuées aux variations climatiques et aux effets des pratiques culturales.

Les conditions climatiques sont celles du climat tropical sahélo-soudanien caractérisé, par une saison sèche de novembre à mai, avec une période fraîche en décembre-janvier, et des températures élevées de mars à mai dues à l'installation de vents chauds (har-

TABLEAU II

Analyses chimiques des sols*

Echantillon	pH		C %	N %	C/N	P ₂ O ₅ (total) %	Bases échangeables (méq./100 g)					Capacité d'échange (T)	Σ/T	
	à l'eau	au KCl IN					Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	K ⁺	Na ⁺	BE			
Mars 1975	SSA	5,6	4,6	0,39	0,03	11,9	0,16	1,67	1,01	0,08	0,02	2,78	5,34	52,1
	SPA	5,7	4,8	0,43	0,04	11,9	0,34	2,02	0,96	0,08	0,15	3,21	5,62	57,1
	SSV	5,7	4,7	0,38	0,04	10,4	0,17	2,48	0,53	0,15	0,02	3,15	5,76	54,7
	SPV	5,5	4,5	0,40	0,03	12,5	0,23	2,30	0,46	0,08	0,02	2,86	2,24	—
Juillet 1976	SSA	5,6	4,8	0,37	0,04	9,3	0,02	1,50	0,80	0,01	0,07	2,38	5,34	45
	SPA	5,5	4,6	0,40	0,05	8,5	0,02	1,37	0,75	0,31	0,10	2,35	4,20	56
	SSV	5,7	4,8	0,44	0,05	9,6	0,02	1,85	1,00	0,08	0,10	3,03	1,51	saturé
	SPV	5,6	4,8	0,41	0,05	8,9	0,02	1,50	0,93	0,10	0,10	2,63	1,42	saturé

* Résultats exprimés en pourcentages du sol sec

TABLEAU III

Données climatiques à 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 relative de l'air (%)	M 50,68	43,48	45,24	58	76,92	89,64	95,92	97,16	97,24	92,92	76,84	60,68	
Evaporation (mm)	14,76	13,20	12,88	18,84	30,24	41,42	57,52	64,32	58,52	44,44	24,68	18,96	
Indice xérothermique (*)	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
	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 < 2T (moyenne mensuelle des températures, °C). C'est ce rapport P/T qui exprime l'indice xérothermique de Gaussen.

mattan) ; une saison humide ou hivernage, de juin à octobre, avec des précipitations variables et des températures minimales supérieures à celles de décembre (tabl. III, fig. 1).

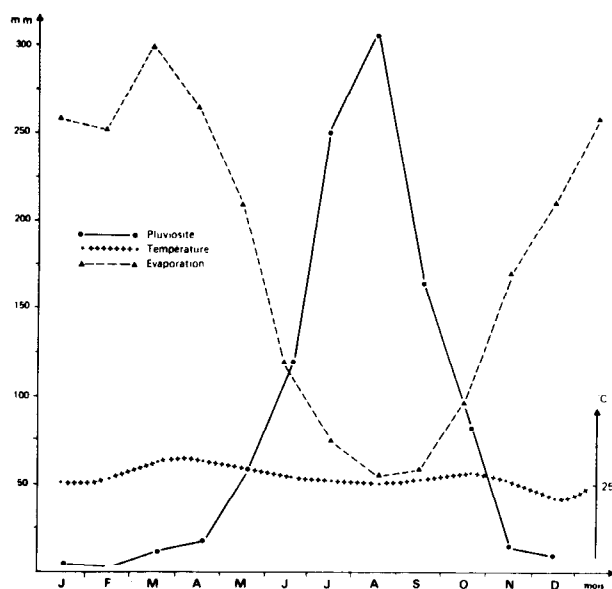


FIG. 1. - Données climatiques de Bamako (moyennes annuelles sur 25 ans).

2. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES *RHIZOBIUM*

Les *Rhizobium* ont été isolés des nodosités de germinations en pot sur sol d'origine ou de plantes récoltées *in situ*.

Les nodosités sont écrasées après avoir été soigneusement lavées et stérilisées par passages successifs de 5 minutes, dans une solution aqueuse à 1‰ de HgCl₂, et dans de l'éthanol à 95 %, puis rincées à

l'eau distillée. Le broyat dilué est étalé en boîte de Pétri sur milieu gélosé au mannitol et extrait de levure (milieu YEMA (1)) de FRED. BALDWIN et MCCOY ; l'incubation se fait à 30° C.

Les colonies de *Rhizobium*, reconnaissables, au bout de 7 à 10 jours, à leur aspect gommeux et translucide, sont purifiées par repiquages successifs sur milieu YEMA. Les souches purifiées sont maintenues en tube à essai sur milieu gélosé YEMA incliné, additionné de 3 g de CaCO₃ par litre.

Les tests d'identification des souches et le dénombrement des *Rhizobium* dans le sol ont été faits par réinoculation de cultures pures, ou de suspensions-dilutions de sol, à des plantules obtenues en environnement stérile. Les plantules proviennent de la germination de graines stérilisées par l'hypochlorite de sodium pour l'arachide, et par une solution aqueuse à 1‰ de HgCl₂ pour le niébé, et qui, après rinçage, sont mises à germer en boîte de Pétri sur gélose nutritive (2), dont on ajuste le pH à 4-5 pour l'arachide. L'incubation est faite à 32-34° C. Les germinations non contaminées sont prélevées dans des vases (Leonard-jars), confectionnées selon la technique préconisée par BURTON, MARTINEZ et CURLEY (1972) et contenant un mélange de vermiculite et de sable lavé et carbonaté à raison de 1 g de CaCO₃ par kilogramme, et humidifié par du milieu de Thornton (3) ; le dispositif est préalablement stérilisé pendant 2 heures à 120° C (fig. 2).

Après 3 jours sous un éclairage continu de 3 000 lux, les plantules sont inoculées avec des suspensions-dilutions de sol, ou des cultures pures de *Rhizobium* (âgées de 10 jours et obtenues sur milieu YEMA liquide réparti en fioles d'Erlenmeyer de 250 ml à raison de 100 ml par fiole) et mises à incuber en agitateur thermostaté à 30° C. Aussitôt après inoculation, le sable humide est recouvert de 1 à 3 cm de

(1) Milieu YEMA (cf. VINCENT, 1970) :

Solution saline concentrée	100 ml
(K ₂ HPO ₄ , 5 g ; MgSO ₄ , 7H ₂ O, 2 g ; NaCl, 1 g ; H ₂ O, 1 000 ml)	
Extrait de levure	0,5 g
Mannitol	10 g
Solution d'oligo-éléments	1 ml
(H ₃ BO ₃ , 2,84 g ; MnCl ₂ , 4H ₂ O, 1,80 g ; ZnCl ₂ , 0,105 g ; MoO ₄ Na ₂ .2H ₂ O, 0,65 g ; CuSO ₄ , 0,08 g ; H ₂ O, 1 000 ml)	
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

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

(2) K₂HPO₄, 1,5 g ; glucose, 10 g ; extrait de levure, 5 g ; agar, 10 g ; eau distillée, 1 000 ml.

(3) Milieu de Thornton : Ca₃(PO₄)₂, 2 g ; K₂HPO₄, 0,5 g ; MgSO₄, 7H₂O, 0,2 g ; NaCl, 0,11 g ; FePO₄, 1 g ; FeCl₃, 0,01 g ; oligo-éléments, 1 ml ; eau distillée, 1 000 ml. pH 6,5.

sable paraffiné afin de limiter l'évaporation et d'empêcher les contaminations (VAN SCHREVEN, 1959).

Dans le cas des dénombrements de *Rhizobium*, l'inoculation par des dilutions décimales de sol se fait à raison de 2 plantes inoculées pour chaque dilution. La lecture a lieu après 4 semaines en notant la présence ou l'absence de nodosités sur le système radical et on en déduit le nombre le plus probable de germes par gramme de sol au moyen des tables de FISCHER et YATES (1963, in VINCENT, 1970). Cette méthode indirecte de dénombrement a été mise au point par VINCENT (1958, 1962, in VINCENT, 1970).

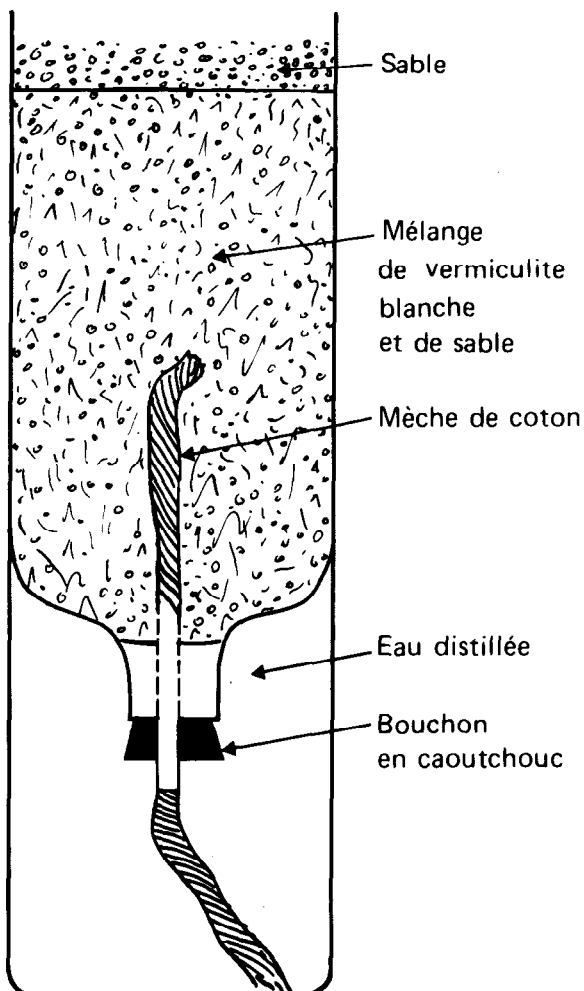


FIG. 2. - Vase pour la mise en culture et l'inoculation des germations de légumineuses (Leonard-jar).

Dans le cas des inoculations croisées pour l'identification des souches, les plantules et un témoin, le soja, sont inoculés par les cultures pures, à raison de

2 ml et 3 répétitions par souche. La lecture se fait après 4 semaines.

L'examen des *Rhizobium in situ* ou isolés se fait par les méthodes habituelles après coloration à la fuchsine basique (VINCENT, 1970).

La mesure du pouvoir fixateur d'azote des nodosités isolées et de l'activité nitrogénasique *in situ* des plantes entières, a été faite par la méthode de réduction de l'acétylène en éthylène (HARDY *et al.*, 1973). Deux dispositifs ont été utilisés :

- le cylindre de BALANDREAU et DOMMÈGUES (1973) modifié : il est fait d'une seule pièce en chlorure de polyvinyle, la partie supérieure étant un disque d'alutglass percé en son centre d'un septum en caoutchouc ; le dispositif coiffe la plante *in situ* et de l'acétylène est injecté à travers le septum à raison de 10 % du volume total. Un gaz marqueur, le propane, est également injecté à raison de 0,25 ml (fig. 3) ;
- le flacon à sérum, dans lequel le système radical de la plante déterrée est introduit et où on injecte un volume d'acétylène égal à 10 % du volume total.

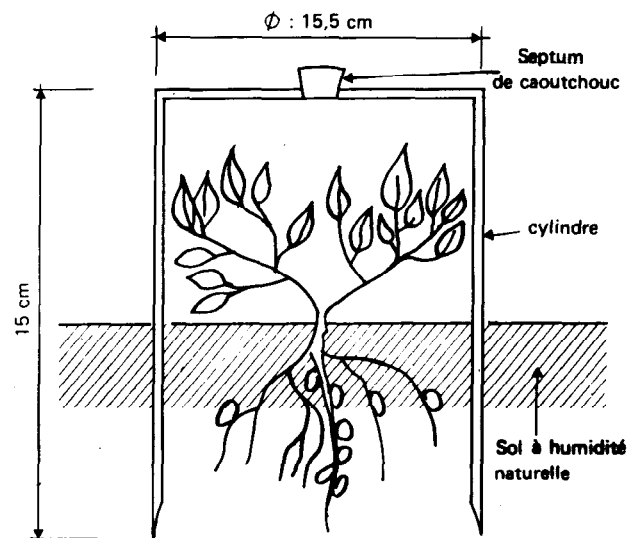


FIG. 3. - Coupe schématique du dispositif de mesure *in situ* de l'activité nitrogénasique (cylindre de BALANDREAU et DOMMÈGUES modifié).

Un prélèvement de 10 ml de l'atmosphère du cylindre ou du flacon est effectué immédiatement après injection de ou des gaz, un deuxième prélèvement étant fait après incubation de 30 minutes, à l'aide d'une seringue ou d'un tube « vacutainer ». Les échantillons gazeux ramenés au laboratoire sont analysés dans un chromatographe en phase gazeuse Perkin Elmer 990, équipé d'une colonne au « Sphérosyl » de 2 m de long et de 2 mm de diamètre.

L'activité nitrogénasique est exprimée en nano-moles d'éthylène/g de nodosités sèches/heure.

3. RÉSULTATS

3.1. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SOUCHES

De nombreuses souches de *Rhizobium* ont été isolées à partir des nodosités de *Vigna* et d'arachide et la plupart d'entre elles identifiées par inoculation croisée et examen microscopique. Toutes les souches ont été également inoculées à des plantules de soja.

Les résultats de ces inoculations sont consignés dans le tableau IV et montrent que toutes les souches issues de l'arachide induisent la formation de nodosités chez le *Vigna*, mais, par contre, à trois exceptions près, toutes les souches issues du *Vigna* n'entraînent pas la formation de nodosités chez l'arachide.

TABLEAU IV

Identification des souches de *Rhizobium* par inoculations croisées à des plantules de *Vigna sinensis*, d'*Arachis hypogaea* et de *Glycine max*

Plante Souche *	<i>V. sinensis</i>	<i>A. hypogaea</i>	<i>G. max</i>
RA 2	+	+	-
SA 4	+	+	-
SA 6	+	+	+
SA 61	+	+	+
SA 612	+	+	+
SA 6123	+	+	-
SA 551	+	+	-
SA 22	+	+	-
SA 88	+	+	-
SA 99	+	+	+
SA 999	+	+	+
SA 910	+	-	-
RV 2	+	+	-
SV 2	+	+	+
SV 22	+	-	+
SV 222	+	-	+
SV 3	+	-	+
SV 33	+	-	+
SV 4	+	-	+
SV 44	+	-	+
SV 5	+	-	+
SV 51	+	-	+
SV 6	+	+	+

* RA et SA : souches isolées de l'arachide. RV et SV : souches isolées du *Vigna*.

Pour ce qui est de l'inoculation du soja, toutes les souches issues du *Vigna*, sauf une, sont capables d'y induire la formation de nodosités, alors que seules quelques souches issues de l'arachide peuvent le faire.

Ces résultats permettent d'affirmer, en accord avec d'autres chercheurs (POCHON et de BARJAC, 1958 ; DOMMERGUES et MANGENOT, 1970), que les *Rhizobium* du groupe *cow-pea* peuvent être inclus dans celui du *Rhizobium japonicum*, mais qu'il existe des sous-groupes à l'intérieur de ce dernier. Les *Rhizobium* du groupe *cow-pea* pourraient infecter dans les sols du Mali des plantules de soja, sans qu'il soit nécessaire de les inoculer artificiellement par *Rh. japonicum*. Mais pratiquement il serait indispensable de procéder à une inoculation préalable par des souches issues de *Vigna* et sélectionnées pour leur grande efficacité.

3.2. EFFICACITÉ DES SOUCHES DE RHIZOBIUM

L'efficacité des souches isolées a été évaluée en mesurant l'activité nitrogénasique des nodosités formées sur les racines des plantules inoculées pour l'identification de ces souches. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau V :

- 1 : efficacité faible, inférieure à 10 000 nmoles C_2H_4 /g nodosités sèches/heure ;
- 2 : efficacité moyenne, de 10 000 à 50 000 nmoles ;
- 3 : bonne efficacité, de 50 000 à 100 000 nmoles ;
- 4 : forte efficacité, de 100 000 à 150 000 nmoles ;
- 5 : très forte efficacité, supérieure à 150 000 nmoles.

Les souches issues de l'arachide sont toutes très efficaces avec cette plante, mais les résultats sont variables avec le *Vigna*. Les quelques souches nodulant le soja sont peu efficaces, à une exception près (la souche SA 6).

Les souches issues du *Vigna* donnent des résultats variables mais assez bons avec cette plante ainsi qu'avec le soja. Des trois souches induisant la formation de nodosités sur l'arachide, une seule s'est montrée très efficace, la souche SV 2, avec $1,5 \cdot 10^6$ nmoles de C_2H_4 /g de nodosités sèches/heure.

3.3. DÉNOMBREMENT DES RHIZOBIUM LIBRES DANS LE SOL

Les résultats des dénombrements effectués à différentes périodes de l'année sont indiqués dans le tableau VI, ainsi que les variations saisonnières de quelques caractéristiques physico-chimiques des sols.

Ces résultats montrent que les populations de *Rhizobium* libres dans le sol subissent des variations

saisonniers, qui semblent surtout liées à l'humidité du sol. En période sèche, la population de *Rhizobium* est faible du fait de la dessiccation et de la température élevée des horizons superficiels. Seuls les horizons profonds conservent une flore plus nombreuse. Dès le début des pluies, en juin, les populations augmentent pour atteindre leur valeur maximale en juillet et septembre dans les parcelles à *Vigna*, et entre août et novembre pour les parcelles à arachide.

3.4. MESURE *IN SITU* DE L'ACTIVITÉ NITROGÉNASIQUE DES PLANTS DE *VIGNA* ET D'ARACHIDE

Les variations de l'activité nitrogénasique ont été mesurées en utilisant la méthode du flacon pendant deux cycles de végétation, en 1975 et 1976, chez *Vigna sinensis* et *Arachis hypogaea*, ainsi qu'en 1978 chez *Vigna unguiculata*. Il convient de noter, malgré les précautions prises, une hétérogénéité des échantillons due au caractère aléatoire de la nodulation

TABLEAU V

Efficiences des souches de *Rhizobium* isolées de *Vigna sinensis* et d'*Arachis hypogaea*

Souche	Plante hôte	Activité nitrogénasique en nmoles de C ₂ H ₄ /g de nodosités sèches/h	Efficiences*	Souche	Plante hôte	Activité nitrogénasique en nmoles de C ₂ H ₄ /g de nodosités sèches/h	Efficiences*
RA 2	<i>V. sinensis</i>	92 648	3	RV 2	<i>V. sinensis</i>	54 125	2
	<i>A. hypogaea</i>	803 247	5		<i>A. hypogaea</i>	8 453	1
SA 4	<i>V. sinensis</i>	255 855	5	SV 2	<i>V. sinensis</i>	483 479	5
	<i>A. hypogaea</i>	340 965	5		<i>A. hypogaea</i>	1 506 154	5
					<i>G. max</i>	209 212	5
SA 6	<i>V. sinensis</i>	44 115	2	SV 22	<i>V. sinensis</i>	28 049	2
	<i>A. hypogaea</i>	105 788	4		<i>G. max</i>	52 408	3
	<i>G. max</i>	305 386	5				
SA 61	<i>V. sinensis</i>	252 664	5	SV 222	<i>V. sinensis</i>	273 030	5
	<i>A. hypogaea</i>	560 604	5		<i>G. max</i>	340 591	5
	<i>G. max</i>	3 894	1				
SA 612	<i>V. sinensis</i>	70 395	3	SV 3	<i>V. sinensis</i>	875 814	5
	<i>A. hypogaea</i>	97 973	3		<i>G. max</i>	31 376	2
	<i>G. max</i>	7 866	1	SV 33	<i>V. sinensis</i>	131 449	4
			<i>G. max</i>		100 394	4	
SA 6123	<i>V. sinensis</i>	30 568	2	SV 4	<i>V. sinensis</i>	372 573	5
	<i>A. hypogaea</i>	363 099	5		<i>G. max</i>	121 194	4
SA 551	<i>V. sinensis</i>	34 435	2	SV 44	<i>V. sinensis</i>	42 388	2
	<i>A. hypogaea</i>	864 908	5		<i>G. max</i>	70 045	3
SA 22	<i>V. sinensis</i>	175 796	5	SV 5	<i>V. sinensis</i>	392 738	5
	<i>A. hypogaea</i>	412 670	5		<i>G. max</i>	290 461	5
SA 88	<i>V. sinensis</i>	229 233	5	SV 51	<i>V. sinensis</i>	578 933	5
	<i>A. hypogaea</i>	242 821	5		<i>G. max</i>	30 317	2
SA 99	<i>V. sinensis</i>	194 377	5	SV 6	<i>V. sinensis</i>	140 307	4
	<i>A. hypogaea</i>	350 387	5		<i>A. hypogaea</i>	9 465	1
	<i>G. max</i>	111 327	4		<i>G. max</i>	366 555	5
SA 999	<i>V. sinensis</i>	626 212	5				
	<i>A. hypogaea</i>	370 740	5				
	<i>G. max</i>	38 537	2				
SA 910	<i>V. sinensis</i>	444 571	5				

* 1 : efficacité faible ; 2 : efficacité moyenne ; 3 : bonne efficacité ; 4 : forte efficacité ; 5 : très forte efficacité.

(MAGUE et BURRIS, 1972). De plus, la mesure de l'activité nitrogénasique a probablement été sous-estimée : d'une part, parce que le système radical des plantes est très étendu et difficilement récupérable en

totalité ; d'autre part, parce qu'il occupe un volume supérieur à 20 % de l'enceinte d'incubation, limitée au-delà de laquelle il y a diminution de l'activité (DART *et al.*, 1972 ; MAGUE et BURRIS, 1972).

TABLEAU VI

Variations saisonnières des populations de *Rhizobium* dans le sol et caractéristiques édaphiques

Echantillon	Date des prélèvements	Humidité du sol (% par rapport au poids sec)	pH		Matière organique				Nombre le plus probable de <i>Rhizobium</i> /g de sol
			à l'eau	au KCl 1N	C %	Humus %	N %	C/N	
SSV	26 juin 1975	18,4	5,8	4,6	0,31	0,84	0,02	15,5	5,8
SPV	—	17,6	5,7	4,6	0,35	0,95	0,03	11,6	0,6
SSA	—	17,8	5,9	4,8	0,32	0,87	0,03	10,6	170
SPA	—	15,5	5,6	4,8	0,31	0,84	0,03	10,3	17
SSV	12 septembre 1975	15,6	6,2	5,0	0,31	0,84	0,02	15,5	17
SPV	—	15,7	6,1	4,8	0,31	0,84	0,03	10,3	17
SSA	—	15,0	6,2	5,0	0,29	0,78	0,02	14,5	17
SPA	—	14,2	6,0	4,7	0,30	0,81	0,03	10,0	0,6
SSV	21 novembre 1975	4,4	6,5	5,3	0,34	0,92	0,04	8,5	58
SPV	—	5,6	6,0	4,8	0,36	0,98	0,03	12,0	1 700
SSA	—	3,7	6,3	5,1	0,25	0,68	0,02	12,5	17
SPA	—	5,7	5,9	4,7	0,33	0,89	0,02	16,5	0
SSV	20 mars 1976	0,2	6,3	4,8	0,30	0,81	0,05	6,0	17
SPV	—	0,6	6,3	5,0	0,32	0,87	0,04	8,0	170
SSA	—	0,5	6,3	4,8	0,25	0,68	0,03	8,3	0
SPA	—	0,2	5,8	4,5	0,21	0,57	0,04	5,2	6
SSV	28 juin 1976	8,6	6,3	4,8	0,39	1,06	0,05	7,8	58
SPV	—	11,8	5,8	4,4	0,34	0,92	0,07	4,8	580
SSA	—	8,3	6,2	4,7	0,36	0,98	0,05	7,2	58
SPA	—	13,1	6,0	4,5	0,37	1,00	0,03	12,3	170
SSV	28 juillet 1976	16,4	6,1	4,6	0,33	0,89	0,06	5,5	1 700
SPV	—	15,5	6,1	4,6	0,35	0,95	0,05	7,0	1 700
SSA	—	16,3	6,2	4,6	0,33	0,89	0,04	8,2	170
SPA	—	16,3	6,2	4,7	0,34	0,92	0,05	6,8	580
SSV	30 août 1976	12,8	6,2	4,6	0,32	0,87	0,05	6,4	1 700
SPV	—	13,5	6,1	4,5	0,34	0,92	0,04	8,5	170
SSA	—	12,9	6,3	4,7	0,31	0,84	0,04	7,7	58
SPA	—	15,3	6,1	4,5	0,35	0,95	0,05	7,0	1 700
SSV	30 septembre 1976	13,7	6,3	4,8	0,34	0,92	0,04	8,5	580
SPV	—	13,3	6,3	4,7	0,35	0,95	0,06	5,8	58
SSA	—	14,5	6,1	4,5	0,38	1,03	0,05	7,6	1 700
SPA	—	15,4	5,9	4,4	0,41	1,11	0,06	6,8	170
SSV	12 novembre 1976	5,5	6,3	4,7	0,34	0,92	0,04	8,5	580
SPV	—	9,8	6,0	4,4	0,38	1,03	0,05	7,6	580
SSA	—	6,8	6,4	4,8	0,34	0,92	0,03	11,3	1 700
SPA	—	9,8	6,2	4,6	0,38	1,03	0,05	7,6	170

Chez *Vigna sinensis* (fig. 4), on a noté la formation des nodosités, une dizaine de jours après le semis, et une durée brève du phénomène par rapport à la durée totale du cycle de végétation. Les nodosités sont relativement grosses (0,5 cm de diamètre) avec une réticulation caractéristique. Les bactéroïdes qu'elles contiennent sont claviformes. En fin de cycle, au moment de la fructification, on constate une diminution du nombre des nodosités et un accroissement de leur masse. Simultanément, on observe la réduction du chevelu de radicules et l'accroissement en diamètre des racines.

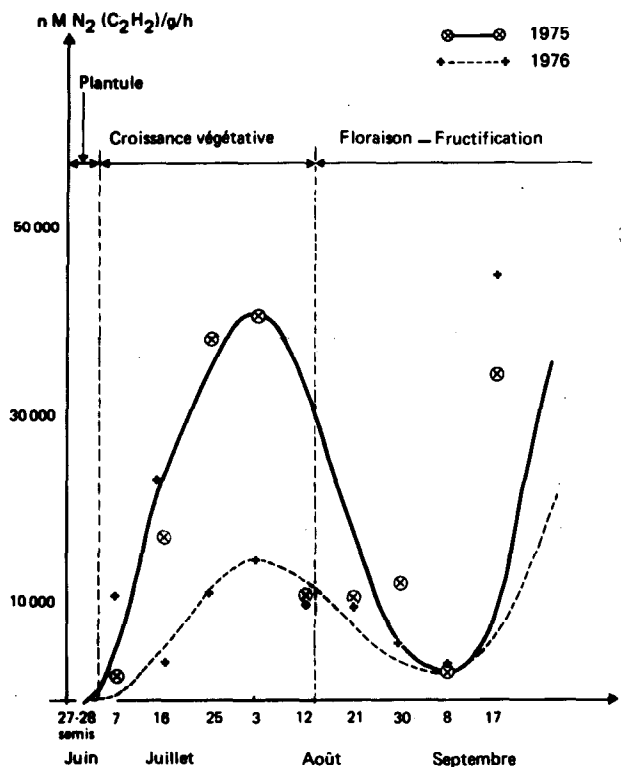


FIG. 4. - Variation de l'activité nitrogénasique chez *Vigna sinensis* au cours de deux cycles végétatifs consécutifs.

Les courbes de variation de l'activité nitrogénasique, exprimée en nanomoles de N₂ par gramme de nodosités sèches et par heure (en utilisant le rapport N₂/C₂H₂ = 1/3), montrent un maximum au début du mois d'août peu avant la floraison. La même observation a été faite chez deux espèces spontanées du Mali, *Vigna racemosa* et *Vigna reticulata* (SANOGHO, 1977). Au début de la fructification, en même temps que la diminution du nombre des nodosités, on observe une reprise de l'activité fixatrice, phénomène déjà observé par Mague et Burris chez certaines va-

riétés de soja et attribué par eux à une intense activité des nodosités en cette période. L'activité nitrogénasique diminue ensuite, malgré le nombre encore élevé de nodosités ; cette diminution peut être attribuée à un début de nécrose des nodosités ainsi qu'à un effet dépressif, dû au détournement des substances nutritives au profit de la fructification et de l'accroissement des racines.

Chez *Vigna unguiculata* (fig. 5), les mesures ont été faites à raison de 10 répétitions à chaque mesure, ce qui a permis un travail statistique pour exprimer les intervalles de confiance. On retrouve chez cette espèce une activité nitrogénasique maximale au début du mois d'août et une brève reprise de l'activité à la fin du mois au moment de la fructification.

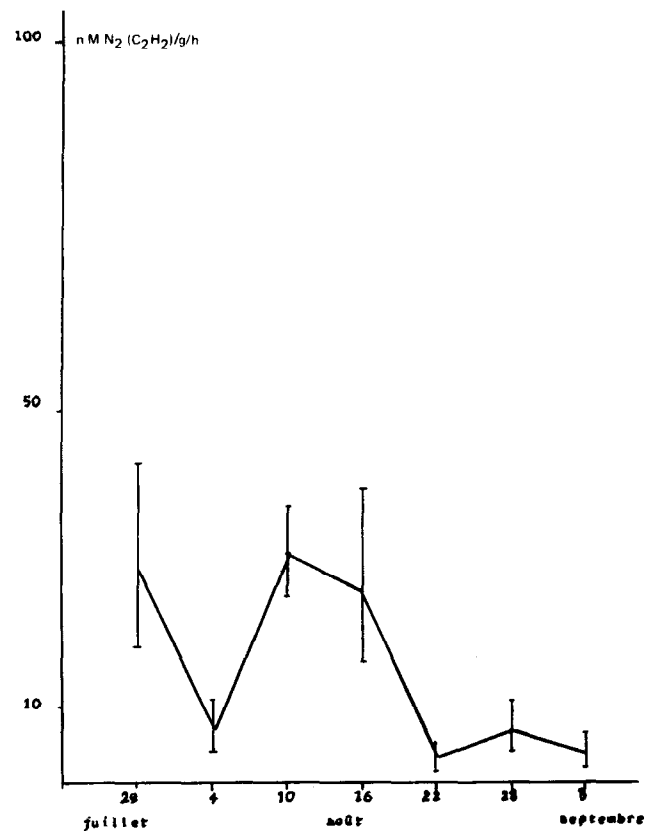


FIG. 5. - Variation de l'activité nitrogénasique chez *Vigna unguiculata* au cours du cycle végétatif (1978).

Chez *Arachis hypogaea* (fig. 6), les nodosités se forment plus tardivement que chez *Vigna*, trois semaines environ après le semis et peu avant la floraison, mais cette formation se maintient jusqu'à la sénescence de la plante. Les nodosités sont petites

(0,2 à 0,3 cm de diamètre) et sont lisses. Les bactéroïdes sont sphériques.

La courbe de variation de l'activité nitrogénasique, obtenue par dix répétitions à chaque mesure, montre une activité maximale au début du mois d'août, c'est-à-dire au moment de la floraison. Ce phénomène a été observé par HAVELKA et HARDY (1975) chez l'arachide et chez le pois.

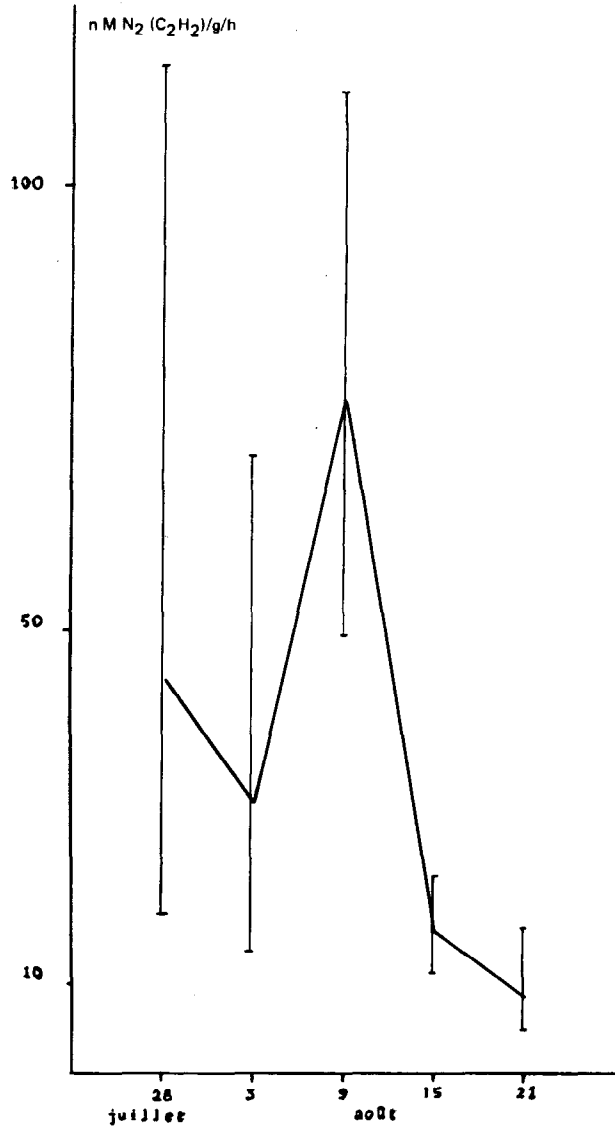


FIG. 6. - Variation de l'activité nitrogénasique chez *Arachis hypogaea* au cours du cycle végétatif (1978).

En conclusion, l'activité nitrogénasique est maximale dans le cas du *Vigna* à la fin de la période de croissance végétative ; l'azote est fixé durant la première moitié du cycle de végétation et semble alors se

concentrer dans les feuilles avant de se retrouver dans les fruits à la fin du cycle. L'activité nitrogénasique est par contre maximale chez l'arachide au moment de la floraison et 90 % de l'azote sont fixés au cours de la deuxième moitié du cycle de végétation.

Les variations nyctémérales de l'activité nitrogénasique permettent de mettre en évidence l'effet de l'éclairement. Elles ont été mesurées, pour *Vigna sinensis*, pendant les périodes de croissance végétative, au début et en fin de floraison, qui correspondent à l'activité fixatrice maximale. Pour l'arachide, l'activité nyctémérale a été mesurée pendant la période de floraison-fructification du cycle de végétation. Les mesures ont été effectuées en utilisant les deux méthodes du cylindre et du flacon.

Chez *Vigna sinensis* (fig. 7), pendant la période de croissance végétative, la courbe d'activité nitrogénasique présente une activité maximale vers 9 heures, puis une diminution brutale entre 12 et 15 heures, en raison des fortes intensités d'éclairement qui inhibent la photosynthèse et l'activité nitrogénasique. Une reprise de celle-ci s'observe vers 18 heures, lorsque l'éclairement atteint des valeurs compatibles avec le fonctionnement des systèmes fixateurs.

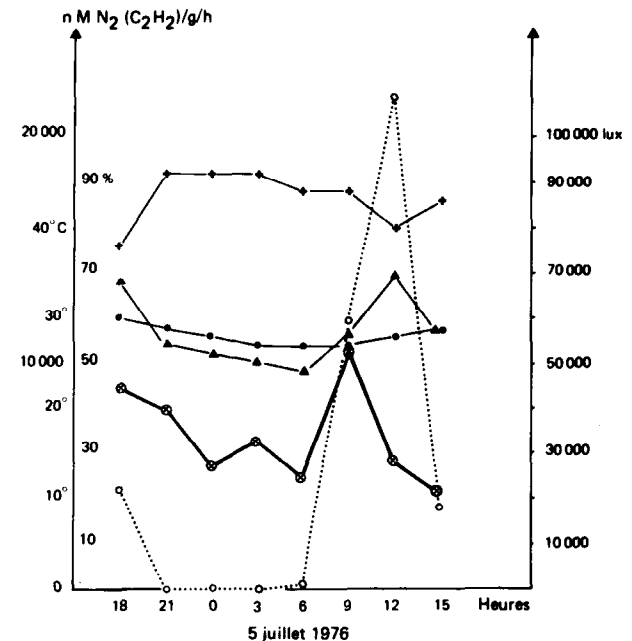


FIG 7. - Activité nitrogénasique nyctémérale chez *Vigna sinensis* pendant la période de croissance végétative (1976), déterminée par la méthode du flacon.

Pendant la période de floraison (fig. 8), on retrouve une courbe d'activité comparable, les maximums diurnes survenant trois heures après les maximums d'éclairement, ce délai étant considéré par BALANDREAU et VILLEMEN (1973) comme le laps de temps nécessaire à la migration des photosynthétats des feuilles aux racines. Pendant la période de post-floraison, on retrouve une activité diurne semblable mais plus d'activité nocturne, sans doute parce que les photosynthétats sont mobilisés pour la fructification.

Les courbes d'activité nitrogénasique nyctémérale d'*Arachis hypogaea* (fig. 9 et 10) sont tout à fait comparables à celles du *Vigna*, avec les deux phases d'activité diurne et nocturne, la première suivant étroitement les variations de l'intensité d'éclairement, l'autre survenant vers 0 heure et due aux migrations des photosynthétats vers les racines.

4. CONCLUSIONS

A côté des Légumineuses spontanées dont la valeur fourragère pour les pâturages du Mali a été reconnue (SANOGHO, 1977), les Légumineuses cultivées comme l'arachide et le niébé jouent un rôle important dans l'agriculture de ce pays et dans l'enrichissement en azote de ses sols. Les mêmes souches de *Rhizobium* pouvant induire la formation de nodosités chez ces deux espèces, il paraît tout à fait possible, malgré les contraintes du milieu tropical, d'envisager la sélection de souches efficaces pour l'inoculation des graines, avant le semis, afin d'assurer une fixation d'azote maximale. L'induction de nodosités sur les racines de soja par des souches issues du *Vigna* serait en faveur de l'introduction du soja au Mali, en inoculant les graines, dans des conditions bien définies, avec des souches efficaces provenant de *Vigna sinensis* et appartenant donc au groupe *cow-pea*.

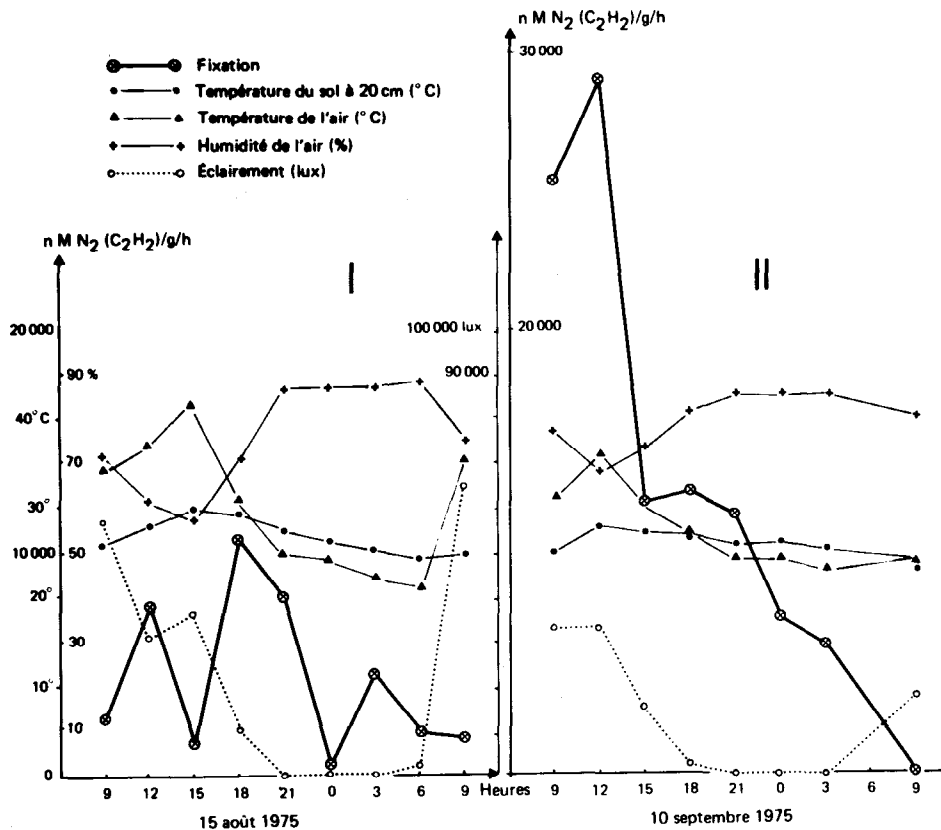


FIG. 8. - Activité nitrogénasique nyctémérale chez *Vigna sinensis* pendant les périodes de floraison (I) et de post-floraison (II) (1975), déterminée par la méthode du cylindre.

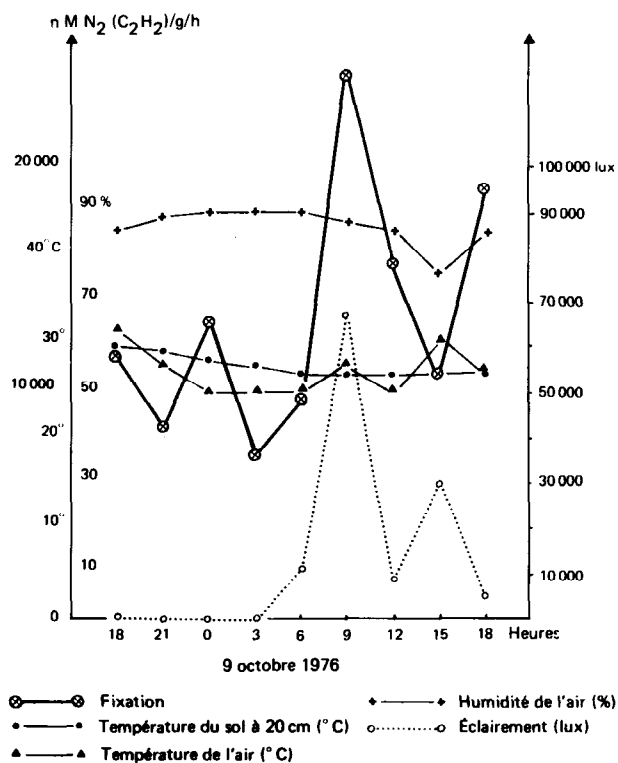


FIG. 9. - Activité nitrogénasique nycthémerale chez *Arachis hypogaea* pendant la période de floraison-fructification (1976), déterminée par la méthode du flacon.

Nous avons mis en évidence que l'activité nitrogénasique de l'arachide et du niébé *in situ*, variait, comme cela a été montré pour d'autres Légumineuses, au cours du cycle de végétation : elle était maximale pendant et après la floraison pour la première espèce, avant et pendant la floraison pour la seconde. Cette activité variait également au cours de la journée et présentait une phase diurne, étroitement fonction des variations de l'intensité d'éclairement, dont les valeurs élevées semblent être inhibitrices ; et une

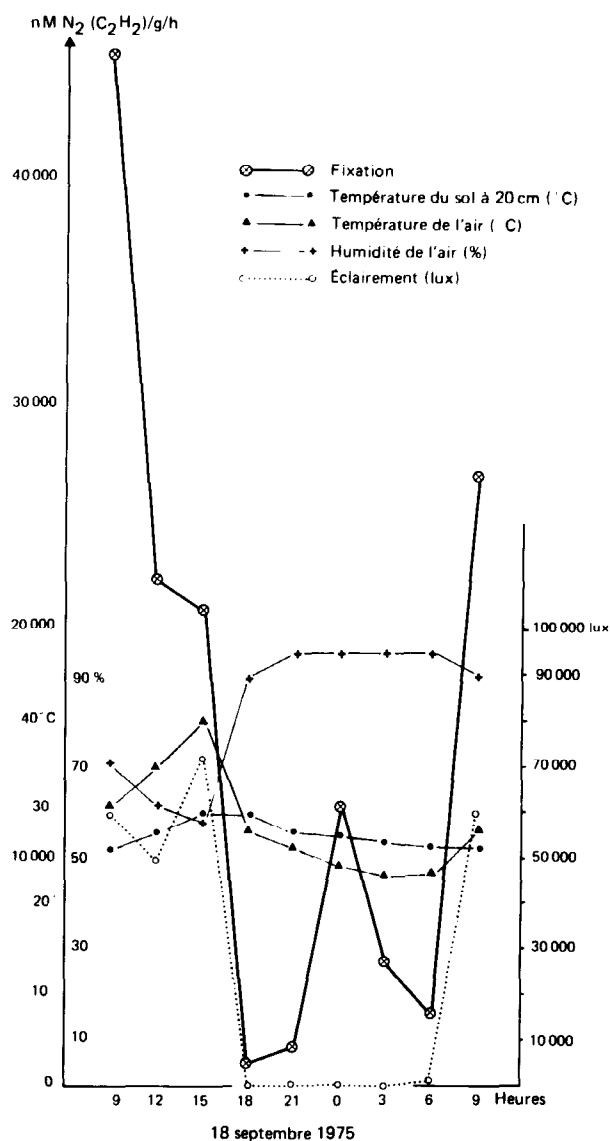


FIG. 10. - Activité nitrogénasique nycthémerale chez *Arachis hypogaea* pendant la période de post-floraison (1975), déterminée par la méthode du cylindre.

phase nocturne, due à la migration des photosynthétats vers le système racidal.

REMERCIEMENTS

M. LAHBIB exprime sa gratitude 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.

Manuscrit reçu au Service des Publications de l'ORSTOM, le 6 août 1980.

BIBLIOGRAPHIE

- AUBERT (G.), BOULAIN (J.), 1972. - La Pédologie. P.U.F., Paris.
- BALANDREAU (J.), DOMMARGUES (Y.), 1973. - Mesure *in situ* de l'activité nitrogénasique. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 273 : 2020-2023.
- BALANDREAU (J.), VILLEMEN (G.), 1973. - Fixation biologique de l'azote moléculaire en savane de Lamto (Côte-d'Ivoire). Résultats préliminaires. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, 10 : 25-33.
- 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., Minneapolis, Minnesota.
- DART (P.J.), DAY (J.M.), HARRIS (D.), 1972. - Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction. FAO/International Atomic Energy Agency, Technical booklet on Grain legume production.
- DIXON (R.O.D.), 1969. - Rhizobia. *Ann. Rev. Microbiol.* :23-137.
- DOMMARGUES (Y.), MANGENOT (F.), 1970. - Ecologie microbienne du sol. Masson, Paris.
- HARDY (R.W.F.), BURNS (R.C.), HOLSTEN (R.C.), 1973. - Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Bioch.*, 5 : 47-81.
- HAVELKA (U.D.), HARDY (R.W.), 1975. - Legume N₂ fixation as a problem in carbon nutrition. Du Pont de Nemours and Company, Central Research Department, Experimental station, Wilmington, Delaware, USA.
- LEONARD (L.T.), 1943. - Methods of testing bacterial cultures and results of tests of commercial inoculants. U.S.D.A. circ. 703, Washington.
- MAGUE (T.H.), BURRIS (R.H.), 1972. - Reduction of acetylene and nitrogen by field grown soybeans. *New Phytol.* 71 : 275-286.
- POCHON (J.), de BARJAC (H.), 1958. - Traité de Microbiologie des sols ; applications agronomiques. Dunod, Paris.
- SANOUGH (S.), 1977. - Contribution à l'étude des *Rhizobium* de quelques espèces de Légumineuses spontanées de la région de Bamako (Mali). *Cah. ORSTOM, sér. Biol.*, vol. XII, n° 2 : 145-165.
- STEWART (W.D.P.), FITZGERALD (G.P.), BURRIS (R.), 1967. - *In situ* studies on N₂ fixation using the acetylene reduction technique. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 58 : 2071-2078.
- THOMPSON (H.G.), VINCENT (J.M.), 1967. - Methods of detection and estimation of Rhizobia in soil. *Plant and Soil*, 26 : 72-84.
- THORNTON (H.G.), 1930. - The early development of the root-nodule of lucerne (*Medicago sativa*). *Ann. Bot.*, 44 :385-392.
- VAN SCHREVEN (D.A.), 1959. - Effects of added sugars and nitrogen on nodulation of legumes. *Plant and Soil*, 11 : 93-112.
- VINCENT (J.M.), 1970. - A manual for the practical study of root-nodule bacteria. I.B.P. Handbook 15, Blackwell Scientific publ., Oxford.